UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FFCLRP – DEPARTAMENTO DE FÍSICA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FÍSICA APLICADA À MEDICINA E BIOLOGIA

**Nanopartículas de Ouro para
Radioterapia com Energia Modulada**

Tatiana Marques Pinto

RIBEIRAO PRETO

2013

TATIANA MARQUES PINTO

**Nanopartículas de Ouro para
Radioterapia com Energia Modulada**

Tese apresentada ao Departamento de Física da
Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de
Ribeirão Preto para obtenção do título de
Doutorado em Ciências.

Área de Concentração: Física Aplicada à
Medicina e Biologia.

Versão original.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Patrícia Nicolucci

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Ribeirão Preto

2013

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

FICHA CATALOGRÁFICA

Marques Pinto, Tatiana

Nanopartículas de Ouro para Radioterapia com
Energia Modulada / Tatiana Marques Pinto;

Orientadora Patrícia Nicolucci – Ribeirão Preto, 2013.

121 p.: il.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo, 2013

1 – Radioterapia 2 – Nanopartícula de Ouro 3 – Câncer

4 – Simulação Monte Carlo 5 – Radiobiologia

Dedico esta tese aos meus pais, Beatriz de Mello Marques e Antonio Augusto Pinto Netto, e
aos meus irmãos Joana Paula Mota Pinto e Adib Francisco Marques Pinto.

Família iluminada na qual tive a bênção de nascer e crescer.

“The possibilities are limited only by
our imagination and determination, and
not by the physics.”

Mike Duke

*Office of Biological and Physical Research
Space Research Center - NASA*

Agradecimentos

Agradeço à espiritualidade que me ofereceu a oportunidade e as condições materiais e mentais para a realização desta pesquisa. Agradeço aos meus pais profundamente por escolherem formar a nossa família - linda como ela é: sólida e embasada nos princípios do amor e da verdade – e por lutarem incansavelmente para proporcionar educação e estrutura financeira a mim e aos meus irmãos. Agradeço à minha mãe – educadora e supervisora, no trabalho e na vida rotineira - por me proteger, apoiar, entender, guiar e ensinar ao longo de todo o caminho, desde a gestação até hoje, sem sessar os olhos carinhosos e atentos. Agradeço ao meu pai por ser companheiro e exemplo forte, carinhoso e emotivo, mas em especial por me mostrar duas coisas na vida: a beleza da matemática e a importância da espiritualidade.

Agradeço imensamente à minha professora amada, amiga e orientadora, Patrícia Nicolucci, por inumeráveis ensinamentos, na física e na vida, mas principalmente por transmitir a mim a paixão pela pesquisa científica. Agradeço a ela por enxergar meu potencial quando eu ainda era crua, e por todos os dias, noites e incontáveis madrugadas carinhosamente dispendidas em longas conversas sobre física da radioterapia (acompanhadas de deliciosos cafés, é claro). Agradeço ainda por me impulsionar em todos os momentos em que considerei desistir – sem sua energia, eu jamais teria chegado onde cheguei.

Agradeço ao professor Baffa pela imensa inspiração na ciência, na academia e na vida política. Agradeço-o em especial pelas discussões criativas e pelo impulso constante ao crescimento e evolução mental sem limites, regada pelas ideias geniais, malucas e, principalmente, por me ensinar o gosto da experimentação em física médica. O agradeço também por me entregar em mãos a semente deste projeto em nanomedicina, a partir do qual crescerei a árvore da minha carreira científica.

Agradeço ao professor Marcelo Mulato por me ensinar mecânica quântica, mudando minha perspectiva da vida, e ao amigo e parceiro pelas inúmeras conversas e conselhos carinhosos. Agradeço-o em especial pela ajuda incessante e pelos diversos convites e oportunidades de participação nas atividades acadêmicas da universidade.

Agradeço ao professor Carlos Garrido pelas inúmeras contribuições intelectuais e, em especial, pelo exemplo de paixão e ética científica. Ao professor Adilton Carneiro, que tanto admiro na vida, na ciência, e na academia, por acrescentar ao meu horizonte o lado político da ciência e da tecnologia, sempre com base na honra e na responsabilidade social.

Agradeço aos meus amigos de laboratório por todas as experiências, estudos, momentos de emoção, apoio e cooperação. Em especial agradeço à amiga querida Franciely, ao companheiro de nanoplasmonica Éder (Néder) e ao parceiro Marcelo; Também aos colegas do CIDRA e do laboratório de EPR. Agradeço à amiga Valéria pela super ajuda nas diversas etapas químicas desse estudo e por toso os momentos alegres que vivemos nos Estados Unidos.

Agradeço ao parceiro de pesquisa Gustavo Barbi, físico médico do HCFMRP, que por inúmeras vezes viabilizou e planejou comigo experimentos e medidas fundamentais para o desenvolvimento das hipóteses desse e de outros trabalhos. Agradeço ao professor Harley de Oliveira por me inspirar na radiobiologia e sempre – sem exceção – abrir as portas do hospital

das clínicas para as pesquisas que vislumbrei - mesmo para aquelas sem resultados publicáveis, mas que contribuiriam para o sólido aprendizado; E agradeço ao amigo por todos os momentos alegres vividos juntos. Agradeço a ele e à todo o time clínico do Serviço de Radioterapia do HCFMRP pelo impagável treinamento clínico essencial para a execução deste trabalho.

Agradeço ao professor Zucolotto pela oportunidade científica ímpar por ele criada na Rede Nanobiomed - ideia executada com excelência - da qual tive a honra de fazer parte, dividindo e aprendendo constantemente.

I deeply acknowledge Dr. Sunil Krishnan for receiving me (twice) with all doors opened at MD Anderson, inspiring, supporting and constantly teaching me radiation oncology and physics. I thank him for being kind and sweet - as a family member - during all the moments when science somehow failed and what lasted in Texas was a flat lonely desert far away from home... I specially thank him for constantly promoting my medical physics carrier by engaging me in all the possible opportunities for learning and experiencing science.

I intensely thank Dev for teaching me nanotechnology, medicine and oncology, discussing and performing experiments, but especially for being an inestimable partner in research and for turning up (or down) my perception of science and life through philosophy innumerous times.

I also thank professors Shanta and Amit for inexhaustibly teaching me, never hesitating to answer a question or helping me. I specially thank Amit and his wife, Aditi, for the warm friendship. Last but not at all less, I thank Jihyoun for sharing happy and tough moments of absolute relevance for the development of these experiments (as of the Korean noodles in between the animal experiments). Also thank my very good friends in the Unites States Ola (Aleksandra), Travis, Paula, Ana and Mike, Ana and Evan, Lara and Matt (and Julia, of course)

and Daniel for listening, helping and supporting when needed, and for the uncountable great happy moments.

Agradeço ao governo Brasileiro que, através da CAPES, financiou toda a pesquisa do meu doutorado, proporcionando inclusive a experiência profissional nos Estados Unidos. Agradeço também à Universidade de São Paulo pela educação privilegiada que obtive na instituição ao longo da última década.

Agradeço ainda a Deus, por iluminar todos os caminhos da minha vida e em especial neste momento por abençoar minha existência com a vivência do amor... Thanks God Lord for bringing me to the *love of my life*, my so beloved husband Adam Wolfe, in the very end of this thesis...

Sumário

Lista de Figuras	i
Lista de Tabela	vii
Lista de Abreviaturas	viii
1. Nanopartículas de Ouro (AuNP) em Radioterapia	10
2. Radioterapia com Energia Modulada por AuNP: <i>Estudo por Simulação Monte Carlo</i>	15
2.1 Estudo da Nanopartícula Isolada	15
2.1.1 Elétrons e Fótons Secundários	21
2.1.1.A Elétrons Ejetados das AuNP	25
2.1.1.B Fótons Secundários Ejetados das AuNP	27
2.1.2 Deposição Local de Energia e Densidade de Ionização	29
2.2 Estudo da Célula com Nanopartículas Incorporadas	33
3. Nanopartículas de Ouro Bioconjugadas para Terapia de Câncer de Próstata	45
3.1. Nanopartículas Bioconjugadas	45
3.2. Arquitetura e Síntese de AuNR Bioconjugados com Goserelin	49
3.3. Estudo <i>in vitro</i> da Toxicidade de gAuNR	59
3.4. Dinâmica de Captação de gAuNR e pAuNR	61
4. Ensaios Clonogênicos com gAuNR e pAuNR	72
4.1. Fonte de Braquiterapia de Alta Taxa de Dose (HDR) de Ir-192	75
4.2. Irradiador Experimental de Cs-137	78
4.3. Acelerador Linear Clínico de 6MV	79
4.4. Curvas de Sobrevivência Celular	80
5. Ensaios Pré-Clínicos com gAuNR em Radioterapia de Câncer de Próstata	84
5.1. Feixe Clínico de 6MV: Planejamento, Dosimetria e Tratamento	94
5.2. Braquiterapia HDR com Ir-192: Planejamento, Dosimetria e Tratamento	96
5.3. Medidas de Crescimento Tumoral	101
Conclusão e Perspectivas	109
Referências	110
Anexos	117

Lista de Figuras

Figura 1 - Ilustração da interação do feixe primário com a AuNP nas simulações Monte Carlo. As linhas em preto representam a trajetória de elétrons secundários, evidenciando sua probabilidade de escape da AuNP. As linhas em azul descrevem fótons secundários.

Figura 2- Espectros primários dos feixes utilizados nas simulações Monte Carlo. Em (a), (b) e (c) são apresentados os espectros coletados da literatura de referência (Tech. 2009). Em (d) o espectro do feixe de 6MV apresentado foi coletado no eixo central de um campo $5 \times 5 \text{ cm}^2$ na profundidade de *build-up*, incluindo as componentes espalhas do feixe como descrito em trabalho prévio (Marques, Schwarcke et al. 2010, Marques, Schwarcke et al. 2011).

Figura 3 - Secções de choque de eventos Compton e fotoelétrico de interação da radiação ionizante com ouro, tecido-mole e mistura homogênea de tecido-mole com 0,1% de ouro. A descrição adotada para o material tecido-mole considera o Report No. 44 da *International Commission of Radiation Units and Measurements* (ICRU). As linhas verticais vermelha e verde indicam as energias de pico do espectro dos feixes de 250kV e 6MV respectivamente.

Figura 4 - Razão de fluências de partículas secundárias $Y_{d,E}$ geradas por interação dos feixes primários com a AuNP no *Estudo da Nanopartícula Isolada*. Na figura, Δ representa para cada energia a variação máxima da função $Y_{d,E}$ com o diâmetro das AuNP. A representação gráfica do desvio padrão (σ) – sempre menor que 0,02% - foi omitida para permitir clareza na observação dos resultados.

Figura 5 - Distribuição de elétrons secundários ejetados das AuNP segundo o efeito físico de interação originário de cada elétron. A esquerda da figura são indicados os diâmetros de nanopartículas estudados entre 2-100nm.

Figura 6 - Distribuição de fótons secundários ejetados das AuNP segundo o efeito físico de interação originário de cada elétron. A esquerda da figura são indicados os diâmetros de nanopartículas estudados entre 2-100nm.

Figura 7 – Ilustração da distribuição de nanopartículas de diferentes diâmetros no citoplasma da célula simulada no PENELOPE.

Figura 8 – Fração de reforço na densidade de ionização ($\varphi_{d,E,C_{Au}}$) resultante da presença de 0,1 % w/w AuNP dentro do citoplasma celular.

Figura 9 - Célula real simulada no PENELOPE contendo *clusters* de nanopartículas.

Figura 10 - Distribuições de dose depositada por elétrons ejetados das nanopartículas (*rod shaped*) internalizadas em uma célula PC3.

Figura 11 – Fração de reforço da densidade de ionização estudada pelo *Estudo da Célula com Nanopartículas*.

Figura 12 – Ilustração da reação de formação da ponte amina entre os terminais carboxila e amina induzida por Sulfo-NHS.

Figura 13 - Protocolo de conjugação de AuNR com goserelin acetato.

Figura 14 – Ilustração do protocolo de conjugação de AuNR com goserelin acetato.

Figura 15 - Sensibilidade do kit Micro-BCA de análise de proteínas para a detecção do peptídeo Goserelin conjugado em nanopartículas de ouro. Nesta figura, PEP-PEG-AuNR indica a solução de gAuNR após uma hora de incubação com o kit Micro-BCA (*Pierce Protein* – Thermo Scientific); Após incubação com o mesmo kit, a solução PEG-AuNR não apresenta coloração alguma.

Figura 16 - Espectro de absorbância medidos no intervalo UV-Vis para nanopartículas de ouro (*rod-shaped*) conjugadas com *Goserelin* por três formulações distintas que consideram diferentes razões molares [PEG:Goserelin] em solução aquosa. As flechas indicam, respectivamente, o pico de densidade óptica (OD) das nanopartículas em 758nm e o pico característico do peptídeo Goserelin em solução aquosa em 264nm. A curva para pAuNR também é apresentada em sobreposição, evidenciando a contribuição do Polietileno-Glicol para absorção antes de 300nm.

Figura 17 - Teste de toxicidade e viabilidade celular (XTT kit assay - Sigma).

Figura 18 - Estudo comparativo de proliferação celular avaliada para concentrações de nanopartículas gAuNR com $0,01 < OD < 1$, representativas do intervalo de fração em massa (W_{Au}/W_{meio}) entre 0,0001% e 0,3% w/w. Para o cálculo das frações em massa, a densidade do meio de cultura foi considerada como $1,09 \text{ g/cm}^3$.

Figura 19 - Células mantidas na incubadora a atmosfera de 35°C e 5% de CO_2 .

Figura 20 - Imagens de Microscopia Eletrônica (TEM) de células PC3 incubadas com nanopartículas bioconjugadas gAuNR por diferentes intervalos de tempo.

Figura 21 - Imagens de Microscopia Eletrônica (TEM) de células PC3 incubadas com nanopartículas cobertas com PEG, pAuNR, por diferentes intervalos de tempo.

Figura 22 - Dinâmica de *uptake* nanopartículas gAuNR e pAuNR por células PC3.

Figura 23 - Ilustração da placa de cultura clonogênica.

Figura 24 - *Setup* de irradiação de células com a fonte de Braquiterapia HDR de Ir-192.

Figura 25 - Plano para entrega de dose (a); Em (b) são apresentados os filmes EBT2 irradiados com as doses de 0Gy e 4Gy ilustrando a homogeneidade da dose entregue às células no *setup* de irradiação planejado.

Figura 26 - Irradiador experimental de Cs-137 do *Experimental Radiation Oncology Department* - MD Anderson Cancer Center, Houston.

Figura 27 - Acelerador Linear de 6MV utilizado nos experimentos *in vitro*.

Figura 28 - Curvas de sobrevivência celular obtidas por ensaios clonogênicos para células PC3 irradiadas com doses entre 0-6Gy na fonte de braquiterapia HDR de Ir-192 (a), no irradiador experimental de Cs-137 (b) e no acelerador linear de 6 MV (c). A linha tracejada indica a fração de 10% de sobrevivência e as flechas indicam as doses D_{gAuNR} , D_{pAuNR} e D consideradas para o cálculo da fração de reforço da radiosensibilização (REF).

Figura 29 - Evolução tumoral em *nude mice* após o implante xenográfico de células PC3 na porção superior do membro inferior direito.

Figura 30 - *Setup* utilizado para anestesia com o gás inalante Ibuprofeno (a); Ilustração do procedimento seguido para administração sistêmica de nanopartículas via *tail vein injection*.

Figura 31 - Órgãos coletados no estudo comparado da biodistribuição de nanopartículas bioconjugadas e não bioespecíficas, respectivamente, gAuNR e pAuNR.

Figura 32 – Ilustração do procedimento de medida dos eixos *a* e *b* dos tumores em estudo. A direita, a parábola representa o formato geométrico pressuposto para o cálculo dos volumes tumorais segundo a equação 9.

Figura 33 - *Setup* de irradiação dos animais no acelerador linear de 6MV *Varian Clinac*.

Figura 34 - Aplicador projetado e construído para Braquiterapia HDR com Ir-192 em modelos xenográficos em *nude mice*.

Figura 35 - *Setup* de aquisição das imagens de CT utilizadas no planejamento (a) e (b). Em (c) são apresentadas as imagens ‘dicom’ nos planos de referência anatômica.

Figura 36 – Plano para entrega de dose realizado no sistema de planejamento Oncentra[®]. Em (a) são apresentados os cateteres definidos manualmente; Em (b) são apresentados parcialmente histogramas de tempo de parada relativo da fonte em cada posição; Em (c) é apresentado o plano final do tratamento.

Figura 37 – *Setup* de tratamento dos tumores xenográficos de próstata em *nude mice* com Braquiterapia HDR com Ir-192.

Figuras 38 – Progressão de volume tumoral relativo dos grupos tratados com 6MV (a) e Braquiterapia HDR com Ir-192 (b).

Figura 39 – Ilustração dos procedimentos e cálculos seguidos para a calibração do filme EBT2 para dosimetria da fonte de Braquiterapia HDR de Ir-192.

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Energia média cedida por alcance médio dos elétrons secundários $\left(\frac{\tau}{\lambda}\right) \frac{keV}{\mu m}$

Tabela 2 – Número de AuNP distribuídas dentro da célula nas simulações Monte Carlo

Tabela 3 - Potencial zeta medido para AuNR em diferentes estágios da conjugação

Tabela 4 – Análise quantitativa do número de moléculas de goserelin conjugadas por AuNR

Tabela 5 – Descrição dos reagentes para preparo do *buffer* de lize celular completa

Tabela 6 - Reforços de radiosensibilização detectados nos ensaios clonogênicos

Tabela 7 - Grupos de tratamento do estudo *in vivo*

Lista de Abreviaturas e Símbolos

AuNP	Nanopartículas de Ouro	PBS	<i>Buffer</i> salino
EPR	Efeito de Permeabilidade e Retenção	OD	Densidade Ótica
PEG	Polietileno Glicol	ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
<i>mfp</i>	<i>Mean-free path</i>	HDR	<i>High Dose Rate</i>
FEI	Fluência e Efeito de Interação	IORT	<i>Intraoperative Radiation Therapy</i>
ICRU	<i>International Commission of Radiation Units and Measurement</i>	PE	Eficiência do plaqueamento
C_{Au}	Concentração de Ouro	SF	Fração de sobrevivência celular
w/w	Fração em massa	CT	Tomografia computadorizada
d_{cell}	Diâmetro da célula	REF	Fator de Radiossensibilização
d_{NP}	Diâmetro da Nanopartícula	LET	Transferência linear de energia
AuNR	<i>Nanorod</i> de Ouro	DVH	Histograma dose-volume
E	Energia	PTV	<i>Planning Target Volume</i>
Δ	Variação	PSA	<i>Prostate specific antigen</i>
TEM	Microscopia Eletrônica de Transmissão	MV	Megavoltage
σ_{ph}	Secção de choque fotoelétrica	kV	Kilovoltage
σ_C	Secção de choque Compton	LH	<i>Lutheizing Hormone</i>
Z	Número atômico	FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
DHT	Dehidrotestosterona	EGFR	<i>Epidermal Growth Factor</i>
GnRH	<i>Gonadotrophine Release Hormone</i>		

Resumo

Nanopartículas de ouro (AuNP) compõem o *estado da arte* da medicina oncológica atual sendo extensivamente investigadas para aplicações em radioterapia de câncer. O acúmulo seletivo em tecidos tumorais de vascularização desordenada causa retenção aumentada das AuNP no microambiente tumoral e aumenta a permeabilidade de drogas terapêuticas por elas carregadas. A radiosensibilização observada em células em cultura tratadas com AuNP é, contudo, resultado da resposta biológica à ambos os fenômenos bioquímicos de interação com a célula alvo e físicos de interação da AuNP com a radiação ionizante. A presença do ouro metálico no citoplasma celular durante a terapia com radiação ionizante aumenta a secção de choque de absorção fotoelétrica no tecido alvo, o que contribui para o aumento potencial do dano biológico letal. Neste contexto, o objetivo principal deste trabalho é avaliar a radiosensibilização causada por nanopartículas de ouro em radioterapia em termos de parâmetros físicos e radiobiológicos. Simulação Monte Carlo com o código PENELOPE foi utilizada para estudar como a densidade de ionização local é alterada pela criação de elétrons secundários em nanopartículas de 2-100nm após interação com os feixes primários de fótons de interesse clínico de 200kV, Ir-192, Cs-137, 6MV e Co-60. O *Estudo da Nanopartícula Isolada* demonstrou que a densidade de ionização é fortemente aumentada com a redução da energia do feixe primário (E) de ionização, sendo, entretanto, fracamente dependente do diâmetro das AuNP. O diâmetro da AuNP (d) modula, no entanto, o espectro de elétrons secundários ejetados ao tecido-mole disposto ao redor porque modifica o número de elétrons internamente absorvidos em cada nanopartícula. Quando concentrações de ouro (C_{Au}) entre 0,001% e 1%, são consideradas no *Estudo da Célula com Nanopartículas*, é possível observar que a C_{Au} internalizada no citoplasma aumenta a fração de reforço da densidade de ionização no tecido alvo em até 200% para baixas energias, não ultrapassando 160% para feixes de megavoltagem. A principal conclusão desta etapa é que o reforço na densidade de ionização local é resultado do balanço entre os parâmetros estudados E e C_{Au} , e o diâmetro da AuNP, modifica o número de fotoelétrons ejetados ao meio, influenciando portanto o potencial efeito biológico. A partir dos resultados do estudo por Monte Carlo, foram desenhados os estudos radiobiológicos *in vitro* e *in vivo* com células PC3 de adenocarcinoma de próstata. Nanopartículas – *rod shaped* (AuNR) - conjugadas com *Goserelin* (gAuNR) – princípio ativo do quimioterápico *Zoladex*[®] – foram sintetizadas com sucesso para aplicações nos sistemas biológicos e nanopartículas conjugadas com polietileno glicol (pAuNR) foram utilizadas como controle biocompatível e não bioespecífico em todos os ensaios. A dinâmica de *uptake* celular foi estudada *in vitro* demonstrando que a presença do biomarcador na superfície das nanopartículas aumenta a concentração efetiva de ouro internalizada nas células alvo em 5 vezes quando comparada com pAuNR. Radiosensibilização aumentada foi observada em ensaios clonogênicos, apresentando essencialmente efetividade radiobiológica relativa 27% maior para o tecido com gAuNR incorporados, quando irradiado como feixe de 6MV, 58% e 78% maior quando irradiado com os feixes de Cs-137 e Ir-192 respectivamente. O estudo de biodistribuição *in vivo* em *nude mice* demonstrou que as nanopartículas bioconjugadas gAuNR tem acúmulo 3 vezes maior em tumores xenográficos de próstata do que pAuNR, e o seguimento tumoral acompanhado em 55 animais demonstrou expressiva efetividade terapêutica do uso de gAuNR em Radioterapia. Foi observado T_{delay} de 24 e 20 dias para os grupos tratados com gAuNR e pAuNR irradiados com 6MV; Este número cresce para 28 e 18 quando as irradiações são realizadas com a fonte de Braquiterapia HDR de Ir-192. Os resultados consonantes dos estudos por Monte Carlo e ensaios radiobiológicos conduzem à proposição deste trabalho à luz de sua principal conclusão: Nanopartículas de ouro bioconjugadas, gAuNR, apresentam terapêutica efetiva na Radioterapia de câncer de próstata porque modulam o espectro de elétrons no citoplasma celular causando aumento local da densidade de ionização e reforço da probabilidade de dano letal.

Abstract

Gold nanoparticles (AuNP) comprise the *state of the art* in medical oncology being extensively investigated for applications in cancer radiation therapy. The selective accumulation in tissues with disordered vascularization increases retention of AuNP in the tumor microenvironment, what leads to enhanced permeability of conjugated drugs carried by the AuNP. The radiosensitization observed in cells treated with AuNP however is result of a combined biological response to both biochemical and physical interactions of the conjugated AuNP with ionizing radiation. The presence of metallic gold in the cell cytoplasm during radiation therapy increases the photoelectric absorption cross-section in the target tissue, thus potentially increasing the lethal biological damage. In this context, the aim of this study is to evaluate the radiosensitization caused by gold nanoparticles in radiation therapy in terms of physical and radiobiological parameters. In order to investigate the density of ionizations in cells containing AuNP, the PENELOPE Monte Carlo code was used to simulate creation of secondary electrons in nanoparticles of 2-100nm after interaction with photon beams of clinical interest: 250kV, Ir-192, Cs-137, 6MV and Co-60. The theoretical analysis was performed in two steps: the *Single AuNP Study* and the *Cell with AuNP Study*. The first study predicts that enhancing nanoparticle diameter (d) from 2-10nm keeps the density of ionization enhanced in 22-28% for all kilovoltage beams and from 38-46% for all megavoltage beams, however increasing more than 5 times the yield of electrons ejected from the AUNP to the surrounding soft-tissue when the primary beam has its energy decreased from 6MV to 250kV. In the *Cell with AuNP Study*, the final concentration of gold in the cytoplasm (C_{Au}) was increased from 0.001% to 1%, showing that concentration of gold strongly modifies the density of ionization in the cell, being up to 2 and 1.6 fold for low and high energies respectively. Sequentially, conjugated AuNP were synthesized with *Goserelin Acetate* (gAuNR) to target PC3 prostate cancer cells, and AuNP coated with polyethylene glycol (pAuNR) were used as non-biospecific control. The radiobiological assays were following designed based on the Monte Carlo results with 6MV, Cs-137 and the Ir-192 HDR Brachytherapy source. The *in vitro* cellular uptake study demonstrate that the biomarker in the surface of the nanoparticles increases the effective concentration of gold in the cytoplasm by 2.4 fold compared to pAuNR. The clonogenic assays demonstrate that the relative radiobiological effectiveness is enhanced in 27%, 58% and 78% for 6MV, Cs-137 and Ir-192 respectively when cells are treated with gAuNR for 24h prior irradiation. The conjugated nanoparticles were also submitted to ICP-MS based biodistribution study that demonstrate gAuNR accumulate 3 fold in xenografts prostate tumors than pAuNR. Following these results, a tumor re-growth study in *nude mice* was designed considering irradiations with the 6MV and the Ir-192 HDR Brachytherapy beam energies. Nanoparticles were administrated intravenously and tumors were followed for a maximum of 30 days. Tumor delay (T_{delay}) of 20 and 24 days were observed for groups respectively treated with gAuNR and pAuNR and the 6MV beam; And T_{delay} of 28 and 18 days were observed for groups respectively treated with gAuNR and pAuNR and the Ir-192 HDR Brachytherapy source. Both *in vitro* and *in vivo* studies, in consonance with the Monte Carlo predictions, demonstrate that conjugated AuNP, gAuNR, improve therapeutic effectiveness for treating prostate tumors because the gold nanoparticles modulate the effective spectrum of secondary electrons in the cytoplasm, locally enhancing the density of ionizations and thus increasing probability of lethal cellular damage.

1 Nanopartículas de Ouro (AuNP) em Radioterapia

Radiossensibilização aumentada vem sendo observada em tecidos biológicos marcados com materiais de alto número atômico há mais de três décadas, quando (Matsudaira, Ueno et al. 1980) reportou a redução na fração de sobrevivência de células de câncer em cultura tratadas com sal de iodo e radioterapia. A presença de metais em próteses terapêuticas (como implantes ósseos e ou fios de titânio utilizados na reconstrução mandibular) de pacientes submetidos à radiação ionizante é reportada na literatura como causa primária de necrose dos tecidos vizinhos há mais de meio século (Castillo, Button et al. 1988).

Consecutiva aos relatos médicos e microbiológicos do efeito necrótico resultante do reforço de dose causado pela presença de metais em tecidos biológicos, a consideração dosimétrica dos perfis de dose em interfaces de alto número atômico (como interfaces osso/tecido-mole, pulmão/tecido-mole e implantes metálicos) passou a integrar a rotina clínica da radioterapia (De Gersem, Derycke et al. 1999, Vanderstraeten, Reynaert et al. 2006, aljarrah, Niemierko et al. 2007, Pasciuti, Iaccarino et al. 2011). Mais recentemente, os sistemas computacionais de planejamento clínico incorporaram métodos de cálculo de dose baseados em simulação Monte Carlo (Jabbari 2011), permitindo a consideração precisa da fluência de elétrons nas vizinhanças das interfaces de interesse, o que resultou efetivamente na entrega controlada de dose nas regiões de interface em pacientes de radioterapia (Aljarrah, Niemierko et al. 2007, Pasciuti, Iaccarino et al. 2011). A partir de então, o reforço de dose –

tipicamente representado pelo aumento da curva de dose-profunda no plano normal à interface metálica - foi incorporado à dose prescrita para o tratamento (Drzymala, Mohan et al. 1991, Stein, Mohan et al. 1997, Smith, Verhey et al. 1998, Datta, Das et al. 2000).

Paralelamente, as propriedades anti-inflamatórias dos sais de ouro - historicamente utilizados no tratamento de artrite reumatoide (Delicati 1934, Ellman, Lawrence et al. 1940, Hersperger 1952, Thompson 1974) – foram reinvocadas pela medicina moderna, passando efetivamente a compor o leque de possibilidades promissoras do uso de nanopartículas de ouro biocompatíveis para terapia e diagnóstico médico (Liu, Lloyd et al. 2008, Zheng and Sanche 2009, Kim, Jeong et al. 2010, Krishnan, Diagaradjane et al. 2010, Lim, Li et al. 2011, Jain, Hirst et al. 2012). Na última década, uma grande gama de estudos teóricos vem sendo conduzidos com o objetivo principal de estudar a física de interação das radiações com AuNP (Cho 2005, Cho, Vassiliev et al. 2006, Chien, Wang et al. 2007, Cho and Krishnan 2007, Marques, Schwarcke et al. 2010, Marques, Schwarcke et al. 2011).

Devido às propriedades óticas do ouro nanoparticulado, o intervalo de energia das radiações de potencial interesse para aplicações em medicina inclui frequências desde o infravermelho ao ultravioleta, além das energias ionizantes de alcance radioterapêutico. A investigação síncrona da nanoplasmônica com a física das radiações ionizantes compõe o escopo de estudos da fronteira atual da Nanomedicina, principalmente direcionada para o diagnóstico médico e a terapia câncer.

O uso de nanopartículas de ouro (AuNP) como droga radiosensibilizante, no entanto, passou a compor o *estado da arte* da pesquisa em radioterapia oncológica após (Hainfeld, Slatkin et al. 2004) relatar o retardo de crescimento tumoral em modelos animais de carcinoma mamário tratados com AuNP e radioterapia. Desde então, a experimentação do efeito biológico em resposta ao reforço de dose causado por AuNP tem sido a principal rota investigativa escolhida pela comunidade científica na busca da aplicação efetiva de AuNP na

radioterapia de câncer requerendo, portanto, a investigação dos efeitos físicos que resultam no reforço localizado de dose (Cho and Krishnan 2007, Cho, Jones et al. 2009, Chithrani, Jelveh et al. 2010, Jones, Krishnan et al. 2010, Lechtman, Chattopadhyay et al. 2011).

A estabilidade em meio biológico aliada à afinidade do ouro com substâncias como o polietileno glicol garante às AuNP baixa biotoxicidade em mamíferos e a possibilidade de baixo acúmulo no fígado ou rins (Lipka, Semmler-Behnke et al. 2010, Hirn, Semmler-Behnke et al. 2011, Khlebtsov and Dykman 2011). É possível ainda conjugar AuNP a anticorpos específicos causando acúmulo significativo em células malignas a fim de aliar a terapia com alvos guiados a outras técnicas de tratamento oncológico, como radioterapia, terapia fotodinâmica e hipertermia (Diagaradjane, Shetty et al. 2008). Mesmo quando não conjugadas com carreadores específicos, AuNP metálicas podem ainda ser preferencialmente retidas em células de tecidos com alta vascularização desordenada, em resposta ao efeito de permeabilidade e retenção (efeito EPR) (Maeda, Wu et al. 2000, Iyer, Khaled et al. 2006).

Recentemente, modificações em curvas de sobrevivência celular e significativas reduções de volume tumoral foram apresentadas na literatura para situações de acúmulo passivo e ativo de AuNP em células carcinogênicas (Diagaradjane, Shetty et al. 2008, Chithrani, Jelveh et al. 2010). Foi observado que a dinâmica de captação celular, internalização e acúmulo de AuNP é diferente para diferentes tecidos e que a resposta radiobiológica é função não apenas do diâmetro das nanopartículas, mas também do metabolismo do tecido alvo (Zhang, Xing et al. 2008, Khlebtsov and Dykman 2011). Dois mecanismos competitivos são apontados como a principal razão das diferenças observadas: a perturbação na densidade de ionizações no microambiente celular resultante da presença das AuNP e a interferência das nanopartículas na cascata de reparos dos danos no DNA.

Como variável fundamental da radiobiologia, a dose depositada no DNA, seguida pelas ionizações no microambiente e no meio intracelular, lideram a cadeia de efeitos tóxicos

que sinalizam morte celular em volumes irradiados (Hall and Giaccia 2006). Para modelar a reposta tecidual à radiação ionizante é necessário conhecer não apenas o valor absoluto da dose depositada no volume, mas também o padrão de densidades de ionização em alcances intracelulares (Rossi and Zaider 1996). Quando AuNP estão internalizadas nas células, o padrão de deposição de dose é alterado localmente e a dose depositada no DNA muda.

A incorporação de AuNP em células alvo é baseada fundamentalmente em dois fenômenos biológicos de interação celular com o microambiente vizinho à célula: o efeito EPR e o grau hipóxico no qual a célula se encontra (Diagaradjane, Shetty et al. 2008, Zhang, Xing et al. 2008, Brun, Sanche et al. 2009, Zheng and Sanche 2009). Este último é reflexo da vascularização do tecido alvo e não varia em culturas de células, apenas em volumes tumorais. Ambos os efeitos se apresentam aumentados quando AuNP metálicas (de alto peso molecular) com dimensões entre 1-100nm se encontram no meio extracelular de volumes tumorais (Maeda, Wu et al. 2000). Isso acontece porque a dimensão limite para a penetração de moléculas através de membranas celulares de mamíferos está em torno de 400nm (Hobbie 1997) e a superfície de tumores é altamente vascularizada (Maeda, Wu et al. 2000). Entretanto, a captação celular de AuNP depende do tamanho das AuNP (Jin, Bai et al. 2008, Chithrani, Jelveh et al. 2010). Estudos recentes evidenciam que há citotoxicidade aumentada conseqüente de altos níveis de retenção para dimensões entre 1-2nm, baixa captação celular entre 2-10nm (Khlebtsov and Dykman 2011) e que o efeito EPR atinge um máximo para AuNP de 50nm (Chithrani, Jelveh et al. 2010).

Biologicamente, estudos de cinética de captação celular consideram interações de superfície entre a molécula a ser incorporada e a membrana da célula, refletindo a necessidade da consideração de parâmetros como dimensão, peso molecular e distribuição superficial de cargas. Para a radioterapia ainda, a modelagem física do problema deve ser fundamentada também em parâmetros de interação com a radiação ionizante, como a fluência e a energia

cedida por unidade de caminho dos elétrons criados nas AuNP após a interação da radiação ionizante com o tecido alvo.

O uso de fontes de Braquiterapia e feixes de raios-x de kilovoltagem é promissor em Radioterapia com AuNP porque estes feixes têm sua fluência total distribuída em torno das energias para as quais as alterações nas características de atenuação dos tecidos marcados com AuNP são mais relevantes (Cho, Vassiliev et al. 2006, Cho and Krishnan 2007). Estudos teóricos descrevem que a interação da radiação ionizante com o metal incorporado no tecido dispara uma cascata de eventos de deposição de dose que levam à morte celular (Zhang, Gao et al. 2009, Leung, Chow et al. 2011). Aplicações bem sucedidas em feixes clínicos de megavoltagem também são apresentadas na literatura em função do aumento na radiosensibilização de células em cultura (Zhang, Xing et al. 2008, Zheng, Hunting et al. 2008, Chithrani, Jelveh et al. 2010, Polf, Bronk et al. 2011).

O sucesso potencial da aplicação de AuNP em radioterapia é, portanto, fundamentado na hipótese de que a presença de interfaces metálicas – de dimensão nanométrica – no tecido alvo causa reforço da dose de radiação levando ao dano biológico letal localizado. A investigação dos parâmetros físicos de interação de feixes clínicos de radiação ionizante com AuNP é, portanto, de fundamental relevância para a entrega controlada da dose de tratamento. A medida da sensibilidade do sistema biológico ao reforço de dose resultante da presença de AuNP no microambiente intra e extra celular é consecutivamente essencial para o estabelecimento de uma metodologia de aplicação das AuNP na radioterapia de câncer. Ambos esses pilares (físico e radiobiológico) compõem os objetos de estudo desse trabalho e foram investigados por simulação Monte Carlo e ensaios radiobiológicos *in vitro* e *in vivo*.

2 Radioterapia com Energia Modulada por AuNP:

Estudo por Simulação Monte Carlo

2.1 Estudo da Nanopartícula Isolada

Nanopartículas de ouro isoladas foram consideradas na primeira etapa do estudo por simulação Monte Carlo. Os estudos desta etapa serão referidos como *Estudo da Nanopartícula Isolada*. Este estudo é proposto com o objetivo principal de estudar a distribuição de elétrons e fótons secundários criados por interação da radiação ionizante com a AuNP. O código de simulação Monte Carlo PENELOPE (*PENetration and Energy Loss Of Positrons and Electrons*) foi escolhido para todos estudos computacionais (Salvat, Fernández-Varea et al. 2008).

O código PENELOPE apresenta duas características de fundamental relevância para sua aplicação em estudos que consideram a interação de elétrons e fótons de range terapêutico com materiais metálicos de escala nanométrica: i) Contem um banco dados de secções de choque de interação que computa fluorescências das camadas K, L e M em metais; ii) Descreve o transporte de elétrons na matéria considerando a deposição de energia evento-a-evento, permitindo o controle da condensação de histórias simuladas através dos parâmetros de modelagem C_1 e C_2 referenciados na equação 1 (Salvat, Fernández-Varea et al. 2008).

Esses parâmetros variam de 0-1 e o valor nulo representa a não condensação de histórias ao longo da trajetória do elétron, abrangendo interações de alcance nanométrico.

$$\lambda_{el}(E) = \max \left\{ \lambda_{el}(E), \min \left[C_1 \cdot \lambda_{el}(E), C_2 \cdot \frac{E}{S(E)} \right] \right\} \quad (\text{Eq. 1})$$

A equação 1 apresenta o cálculo do caminho-livre médio da partícula simulada no PENELOPE. Ao longo do código, todos os alcances iniciais calculados para partículas secundárias são referidos como *mean-free-path* (*mfp*), representando alcance máximo para elétrons e caminho-livre-médio para fótons.

A modelagem do problema nesta etapa do estudo considera uma nanopartícula de ouro esférica com diâmetro variável centrada em um cubo de 1cm³ contendo material tecido-mole (Smith 2007). A figura 1 apresenta uma descrição lúdica da interação do feixe primário com a AuNP nas simulações Monte Carlo. Os feixes primários simulados são cilíndricos sem divergência geométrica (*pencil beams*) e têm diâmetro igual ao diâmetro da nanopartícula em cada simulação. Nenhuma condensação de história foi permitida nessas simulações, sendo os parâmetros C₁ e C₂ igualados a zero para fótons e elétrons em ambos os materiais: ouro e tecido-mole. Todas as partículas foram absorvidas localmente quando atingiram 50eV de energia ou quando transferiram toda energia em um evento de interação.

Figura 1 - Ilustração da interação do feixe primário com a AuNP nas simulações Monte Carlo. As linhas em preto representam a trajetória de elétrons secundários, evidenciando sua probabilidade de escape da AuNP. As linhas em azul descrevem fótons secundários.

A trajetória das partículas secundárias criadas em cada *shower* simulado foi monitorada através da adição de uma variável vetorial no código PENELOPE: 'FEI', abreviatura para 'Fluência e Efeito de Interação'. Esta variável foi definida como um vetor de sete posições, descritas com base nas variáveis contidas no código de transporte 'penelope.f' (Salvat, Fernández-Varea et al. 2008). As componentes i do vetor $FEI(i)$ são descritas respectivamente por:

- i. $FEI(1)$ = tipo da partícula - no código principal é referido como *kind of particle* e utilizado imediatamente após a linha 101 do 'penmain.f';
- ii. $FEI(2)$ = efeito de interação - esta variável é o resultado da última operação *knock* realizada pelo código 'penelope.f'. Os valores 0, 1, 2, 3, 4 e 5 podem ser assumidos por esta variável, correspondendo respectivamente à partícula primária, efeito fotoelétrico, efeito Compton, raio-x de fluorescência e outros elétrons - representando elétrons

Auger e raios delta. Todas as outras posições do vetor FEI somente são preenchidas se $FEI(2) \neq 0$, ou seja, FEI somente é armazenado para partículas secundárias;

- iii. $FEI(3)$ = energia inicial da partícula secundária simulada;
- iv. $FEI(4)$ = contador de interações;
- v. $FEI(5)$ = energia cedida em cada evento de interação (τ). Esta variável integra o valor da energia cedida ao longo da trajetória da partícula simulada, fornecendo ao final o montante de energia em eV cedido a elétrons no meio ao redor da nanopartícula simulada;
- vi. $FEI(6)$ = distância média efetiva caminhada pela partícula ao longo de sua trajetória total de interação (λ). Esta variável divide o alcance real em cada interação (dX resultante da subrotina *step* do 'penelope.f') ponderado pelo número de interações armazenado na variável $FEI(4)$;
- vii. $FEI(7)$ = marcador para eventos de interação da partícula dentro ou fora da nanopartícula. Esta variável atribui 0 ou 1 respectivamente para interação dentro ou fora da nanopartícula e integra os valores ao longo da trajetória da partícula simulada. Desta forma, $FEI(5) = 0$ quando a partícula é absorvida dentro da nanopartícula, isto significa que ela não escapou para o meio ao redor da nanopartícula. Portanto, o vetor FEI não é escrito no arquivo de saída e as informações de alcance e energia cedida não são computados para as partículas absorvidas internamente na AuNP.

O vetor FEI é então escrito no arquivo de saída com extensão '.dat' após o término da simulação de cada *shower* de partícula secundária. O número total de histórias primárias simuladas foi 2×10^9 em cada simulação e nanopartículas com diâmetros de 2nm, 10nm, 30nm, 50nm, 70nm e 100nm foram estudadas interagindo com cada um dos feixes primários referidos na figura 2, representando os feixes de 250kV, Ir-192, Cs-137, 6MV e Co-60.

Os resultados coletados das simulações Monte Carlo do *Estudo da Nanopartícula Isolada* são detalhados e discutidos na seção 2.1, e incluem:

- i. O espectro de fluência em energia dos fótons e elétrons secundários criados na nanopartícula que escapam para o tecido-mole;
- ii. O evento de interação que originou cada uma das partículas secundárias que escapam para o tecido-mole (p.ex. evento fotoelétrico ou espalhamento incoerente);
- iii. A razão entre a energia média cedida à elétrons do material tecido-mole por alcance médio desses elétrons criados em eventos de interação secundários;

Figura 2- Espectros primários dos feixes utilizados nas simulações Monte Carlo. Em (a), (b) e (c) são apresentados os espectros coletados da literatura de referência (Tech. 2009). Em (d) o espectro do feixe de 6MV apresentado foi coletado no eixo central de um campo $5 \times 5 \text{ cm}^2$ na profundidade de *build-up*, incluindo as componentes espalhas do feixe como descrito em trabalho prévio (Marques, Schwarcke et al. 2010, Marques, Schwarcke et al. 2011).

2.1.1 Elétrons e Fótons Secundários

A criação de fótons e elétrons secundários na nanopartícula é regida essencialmente pela secção de choque de interação do feixe primário de fótons com o ouro. A figura 3 apresenta as secções de choque de absorção fotoelétrica e espalhamento Compton calculadas pelo código PENELOPE para materiais homogêneos pelo modelo do átomo independente (Salvat and Fernandez-Varea 2009). O evento de interação com maior probabilidade de ocorrência varia com a energia do feixe primário, como pode ser observado na figura 3. Antes de 600keV, o evento de interação com maior probabilidade de ocorrência nas simulações do *Estudo da Nanopartícula Isolada* é a absorção fotoelétrica na borda K do átomo de ouro, apresentando secção de choque 200 vezes maior para evento fotoelétrico do que para espalhamento incoerente em 100keV.

Figura 3 - Secções de choque de eventos Compton e fotoelétrico de interação da radiação ionizante com ouro, tecido-mole e mistura homogênea de tecido-mole com 0,1% de ouro. A descrição adotada para o material tecido-mole considera o Report No. 44 da *International Commission of Radiation Units and Measurements* (ICRU). As linhas verticais vermelha e verde indicam as energias de pico do espectro dos feixes de 250kV e 6MV respectivamente.

Conforme a energia do feixe primário cresce, a secção de choque fotoelétrica decai exponencialmente e a probabilidade de espalhamento Compton mantém-se praticamente constante. A implicação imediata do comportamento das secções de choque com a energia para o estudo de AuNP é que elétrons de interesse terapêutico serão criados principalmente por absorção fotoelétrica no ouro. Imediatamente após a absorção fotoelétrica, o átomo de ouro sofre desexcitação entregando energia para o meio ao seu redor por dois fenômenos: fluorescência ou liberação de elétrons *Auger*. Ambos os fenômenos contribuem para o aumento da densidade de ionização localmente porque referem-se à elétrons e fótons de curto alcance.

As curvas para secções de choque apresentadas na figura 3 evidenciam ainda que quando uma mistura homogênea de ouro em tecido-mole é considerada, o efeito de interação com maior probabilidade de ocorrência é monotonamente o espalhamento Compton para energias maiores que 22keV, e a secção de choque para absorção fotoelétrica mantém-se entre 10^1 e 10^3 vezes menor para energias entre 100keV e 10MeV. As curvas em azul claro e verde na figura 3 representam as secções de choque Compton e fotoelétrica respectivamente para uma mistura homogênea de ouro em tecido-mole.

A principal hipótese da mistura homogênea de 0,1% w/w de ouro incorporado no tecido-mole é a atribuição de um valor médio para o rendimento de eventos secundários de fluorescência e *Auger*, os quais têm probabilidade de ocorrência reduzida drasticamente quando não há interface de ouro no meio estudado. Este resultado ressalta a relevância da consideração de AuNP independentes nos estudos dessa problemática por simulação Monte Carlo.

Para quantificar a contribuição relativa da nanopartícula na criação de elétrons e fótons no meio ao seu redor, o rendimento relativo de elétrons $Y_{d,E}$ foi definido como a fração do número de elétrons secundários criados na AuNP que escapam para o meio (ϕ_e) por fóton

originado por efeito Compton ou fluorescência no ouro (ϕ_{ph}). A equação 2 abaixo explicita o rendimento relativo de elétrons por fótons secundários criados na nanopartícula em termos das componentes ϕ_e e ϕ_{ph} , onde Y_{d,E_i} é calculada para cada diâmetro de nanopartícula (d) e energia (E) estudada. A figura 4 apresenta este resultado para todos os feixes e diâmetros de nanopartículas estudados.

$$Y_{d,E} = \frac{\phi_e}{\phi_{ph}} \quad (\text{Eq. 2})$$

Figura 4 - Razão de fluências de partículas secundárias $Y_{d,E}$ geradas por interação dos feixes primários com a AuNP no *Estudo da Nanopartícula Isolada*. Na figura, Δ representa para cada energia a variação máxima da função $Y_{d,E}$ com o diâmetro das AuNP. A representação gráfica do desvio padrão (σ) – sempre menor que 0,02% - foi omitida para permitir clareza na observação dos resultados.

O número de elétrons secundários criados na AuNP que escapam para o tecido-mole aumenta conforme o espectro primário tem sua maior componente de fluência posicionada em energias de alta probabilidade de interação fotoelétrica no ouro, ou seja, nas proximidades das bordas de absorção atômica K e L₁. A função $Y_{d,E}$ varia menos que 1% conforme o diâmetro da nanopartícula cresce de 2nm para 100nm em todas as energias estudadas, como pode ser observado nos valores de Δ calculados para cada energia e indicados no interior dos gráficos na figura 4. Contudo, o valor absoluto de $Y_{d,E}$ decai aproximadamente cinco vezes quando a energia do feixe primário cresce de 250kV para 6MV.

A principal implicação do resultado apresentado na figura 4 para aplicações em radioterapia é que a função $Y_{d,E}$ apresenta maior dependência com a energia do feixe primário do que com o diâmetro da AuNP. Os estudos detalhados da origem dos elétrons e fótons secundários ejetados da AuNP são apresentados nas seções 2.1.1.A e 2.1.1.B.

2.1.1.A Elétrons Ejetados das AuNP

A figura 5 apresenta a distribuição de elétrons secundários criados nas AuNP após interação com os feixes estudados em termos do efeito físico de interação originário de cada elétron. Na figura, a distribuição de elétrons é apresentada em três principais grupos: elétrons ejetados após absorção fotoelétrica, elétrons espalhados após colisão incoerente, e elétrons *Auger* e raios delta (Delta) – colisões fortes entre os elétrons livres que caminham no ouro e elétrons ligados aos átomos de ouro. A fluência de elétrons *Auger* e Delta no tecido-mole disposto ao redor da AuNP é sempre consecutiva à interação do fóton primário com a nanopartícula. As trajetórias de ambos os elétrons *Auger* e Delta não foram diferenciadas na simulações.

Figura 5 - Distribuição de elétrons secundários ejetados das AuNP segundo o efeito físico de interação originário de cada elétron. A esquerda da figura são indicados os diâmetros de nanopartículas estudados entre 2-100nm.

Elétrons secundários são predominantemente ejetados após absorção fotoelétrica dos feixes de 250kV, Ir-192 e Cs-137 nas AuNP independentemente do diâmetro. Contudo, quando a energia do feixe primário é da ordem de megavoltagem - ambos Co-60 e 6MV, o número de eventos Compton aumenta e consequentemente a criação de raios delta se torna mais provável.

2.1.1.B Fótons Secundários Ejetados das AuNP

A figura 6 apresenta a distribuição da fluência de fótons secundários em termos do diâmetro das AuNP e da energia do feixe primário incidente. Para nenhum dos feixes primários estudados o diâmetro das AuNP modifica radicalmente o rendimento de eventos de fluorescência de raios-x no ouro. Contudo, os eventos de fluorescência tem sua probabilidade de ocorrência reduzida quando a energia do feixe do aumenta de 250kV para 6MV, e o efeito de interação predominantemente responsável pela criação de fótons secundários nas AuNP passa a ser o espalhamento Compton.

Figura 6 - Distribuição de fótons secundários ejetados das AuNP segundo o efeito físico de interação originário de cada elétron. A esquerda da figura são indicados os diâmetros de nanopartículas estudados entre 2-100nm.

2.1.2 Deposição Local de Energia e Densidade de Ionização

A Tabela 1 apresenta valores de energia média cedida ao tecido-mole disposto ao redor da AuNP (τ) dividida pelo alcance médio dos elétrons secundários criados na AuNP que escapam para o meio ao redor (λ). Os parâmetros τ e λ foram calculados no *Estudo da Nanopartícula Isolada* como descritos na secção 2.1. Este resultado inclui o espectro total de elétrons criados no meio, sendo diretamente proporcional à densidade de ionização ao redor da nanopartícula.

Tabela 1 - Energia média cedida por alcance médio dos elétrons secundários $\left(\frac{\tau}{\lambda}\right) \frac{keV}{\mu m}$

Diâmetro da Nanopartícula	200 kV	Ir-192	Cs-137	Co-60	6 MV
2 nm	3,70	3,63	3,81	4,21	4,18
10 nm	3,66	3,52	3,78	4,04	4,00
30 nm	3,00	2,82	3,64	3,83	3,19
50 nm	2,88	2,67	3,51	3,03	2,92
70 nm	2,61	2,58	3,22	2,78	2,69
100 nm	2,44	2,71	2,85	2,38	2,34

A energia média efetivamente cedida ao tecido-mole por alcance médio dos elétrons secundários ejetados das AuNP apresenta dependência com ambos os parâmetros analisados: diâmetro da nanopartícula e energia do feixe primário incidente. A dependência da razão $\left(\tau/\lambda\right)$ apresenta comportamento global decrescente com o aumento do diâmetro da nanopartícula para todas as energias estudadas.

Quando a AuNP é irradiada com o feixe de 250kV, a razão $\left(\tau/\lambda\right)$ decresce 66% conforme o diâmetro cresce de 2nm para 100nm. O mesmo comportamento é observado para todas as energias, apresentando decrescimentos de 58%, 75%, 57% e 56% respectivamente para os feixes de Ir-192, Cs-137, Co-60 e 6MV conforme o diâmetro da nanopartícula cresce.

A fração de energia média cedida ao meio externo à AuNP por alcance dos elétrons secundários tem seu valor reduzido conforme o diâmetro da AuNP aumenta porque o número de elétrons absorvidos no ouro é maior, não sendo computado na energia cedida ao tecido-mole. Isso porque o aumento da espessura de ouro na direção de incidência do feixe primário modifica o espectro efetivo de elétrons de baixa energia – predominantemente elétrons *Auger* e fotoelétrons (ver figura 5) – que escapam da nanopartícula formando trajetórias de ionização mais longas ao seu redor, resultando ainda na redução da densidade de ionização total ao longo do volume macrométrico ao redor da nanopartícula, neste caso 1cm^3 .

A dependência da razão $\left(\tau/\lambda\right)$ com a energia do feixe primário incidente apresenta comportamento diferente para cada diâmetro de AuNP estudado. Para nanopartículas de 2nm, 10nm e 30nm, a razão $\left(\tau/\lambda\right)$ cresce em 34%, 29% e 25% quando a energia do feixe primário muda de 250kV para Ir-192 e Cs-137. Entretanto, quando o diâmetro da AuNP se encontra de 50nm a 100nm, a razão $\left(\tau/\lambda\right)$ apresenta valor máximo para o feixe de Cs-137, cujo qual tem energia efetiva intermediária entre 250kV e 6MV, e para o qual as secções de choque de

eventos de absorção fotoelétrica e espalhamento Compton apresentam valores competitivos, como pode ser observado na figura 5. Com probabilidades similares de ocorrência, eventos fotoelétricos e inelásticos modificam fracamente o espectro de elétrons secundários que escapam da nanopartícula conforme o diâmetro cresce entre 50nm e 100nm. Isso porque ao mesmo tempo que a fluência de fotoelétrons criados no ouro é radicalmente reduzida quando os feixes de megavoltagem são considerados, a fluência total de raios-delta aumenta no meio porque o número de eventos Compton cresce (ver figura 5). Para os diâmetros 50nm, 70nm e 100nm a razão $\left(\tau/\lambda\right)$ atinge seu máximo para o feixe de Cs-137 crescendo comparativamente, 25%, 43% e 44% quando a energia efetiva aumenta de 109keV para 662keV respectivamente.

Quando ambos os parâmetros – diâmetro da nanopartícula e energia do feixe primário – variam dentro dos intervalos de 2nm a 100nm e entre 250kV e 6MV, o valor da energia média cedida efetivamente ao tecido-mole permanece entre 2,11keV/ μm e 4,21keV/ μm . O menor valor se refere à situação de uma AuNP de 100nm irradiada com o feixe de Ir-192, para a qual o rendimento relativo de partículas secundárias $Y_{(100nm, Ir-192)}$ é de aproximadamente 5 elétrons para cada fóton, dos quais 35% advêm de fenômenos de fluorescência de raios-x em átomos de ouro e 65% são originados por espalhamento Compton também na nanopartícula de ouro; Esses fótons têm caminho-livre-médio maior do que o volume considerado para análise nas simulações (ver descrição da geometria na seção 2.1) e portanto estão sendo parcialmente computados dentro do volume simulado. Neste caso ainda, os elétrons criados na AuNP que escapam para o meio se distribuem em 58% de fotoelétrons, 11% elétrons Compton e 31% de raios-delta e elétrons *Auger*. Dessa forma, a nanopartícula com a maior área superficial favorece o escape de elétrons criados nas proximidades da superfície - interface ouro/tecido-mole - os quais deixam a AuNP com curto alcance no tecido-mole resultando num padrão denso de ionizações ao seu redor.

Por outro lado, o maior valor obtido para a razão $\left(\tau/\lambda\right)$ nas simulações do *Estudo da Nanopartícula Isolada*, 4,21keV/ μm , se refere à situação de uma AuNP de 2nm irradiada com o feixe de Co-60. Neste caso, o rendimento relativo de partículas secundárias $Y_{(2nm,Co-60)}$ atinge seu menor valor e é de aproximadamente 1 elétron para cada fóton gerado (ver figura 4). Desses fótons, apenas 11% advêm de fenômenos de fluorescência e 89% são originados por espalhamento Compton nos átomos de ouro. A distribuição dos elétrons nesse caso inclui, portanto, predominância de elétrons Compton e raios-delta, ambos somando 80% do total de elétrons formados no meio (ver figura 5). Esses elétrons escapam da nanopartícula de 2nm com facilidade e formam trajetórias longas, entregando uma fração menor de energia por colisão, o que resulta em um padrão esparsos de ionização no meio ao redor da AuNP.

A principal diferença entre as duas situações é o padrão de ionizações formado ao redor da nanopartícula após interação com o feixe primário. O rendimento absoluto de elétrons que escapam da AuNP é maior para o feixe de kilovoltagem do que para o de megavoltagem e modifica a densidade de ionizações na vizinhança da AuNP. A fração de elétrons de curto alcance (fotoelétrons e elétrons *Auger*) também modifica o padrão de ionizações porque determina o perfil de dose ao redor da AuNP.

No cenário intracelular real, o padrão de ionizações é entretanto resultante da fluência total de elétrons ejetados de uma distribuição tridimensional de nanopartículas simultaneamente atingidas pelo feixe primário de radiação. A fim de estudar o padrão de densidade de ionizações no interior de uma célula, o *Estudo da Célula com Nanopartículas* foi proposto e é apresentado na seguinte seção.

2.2 Estudo da Célula com Nanopartículas incorporadas

O *Estudo da Célula com Nanopartículas* considera uma distribuição tridimensional randômica de AuNP distribuídas dentro de uma célula esférica homogênea de 12.5µm de diâmetro. As simulações computacionais nesta etapa variaram três parâmetros: diâmetro das nanopartículas, energia do feixe primário e concentração total de ouro dentro do volume celular. Os diâmetros considerados foram, respectivamente, 2nm, 10nm, 30nm, 50nm, 70nm e 100nm. As energias de feixe primário consideradas nesta etapa são as mesmas descritas na figura 2 e a geometria de irradiação simulada considera um feixe sem divergência geométrica e com diâmetro igual ao da célula considerada no estudo. Similarmente à geometria descrita na seção 2.1, a célula foi colocada no centro de um cubo de 1cm³ preenchido com material tecido-mole.

As concentrações de ouro (C_{Au}) estudadas foram 0,01%, 0,1%, 0,2%, 0,5% e 1%, respectivamente expressas em termos da fração em massa relativa ouro/tecido-mole (w/w). Para cada concentração de ouro estudada, a densidade eletrônica é mantida constante no citoplasma e o número total de nanopartículas dentro de cada célula (n_{NP}) varia. n_{NP} foi calculado como descrito na equação 3, onde $\frac{d_{cell}}{d_{NP}}$ representa a razão dos diâmetros da célula (d_{cell}) e da nanopartícula (d_{NP}), respectivamente, e $\frac{\rho_{tecido-mole}}{\rho_{Au}}$ é a razão das densidades eletrônicas tecido-mole/ouro. A figura 7 ilustra a geometria do plano central da célula tridimensional simulada quando a concentração de 0,1% w/w e dois diâmetros de nanopartículas diferentes são considerados. Todas as nanopartículas foram posicionadas fora no núcleo celular respectivamente definido como uma esfera concêntrica de 5µm de diâmetro inscrita na célula simulada. A tabela 2 apresenta o número total de AuNP simuladas dentro da célula para cada combinação de diâmetro e concentração de ouro estudada.

$$n_{NP} = C_{Au} \cdot \left(\frac{d_{cell}}{d_{NP}}\right)^3 \cdot \left(\frac{\rho_{tecido-mole}}{\rho_{Au}}\right) \quad (\text{Eq. 3})$$

Figura 7 – Ilustração da distribuição de nanopartículas de diferentes diâmetros no citoplasma da célula simulada no PENELOPE.

Tabela 2 – Número de AuNP distribuídas dentro da célula nas simulações Monte Carlo

$d_{NP} \cdot C_{Au}$	0,01 %	0,1 %	0,2 %	0,5 %	1,0 %
2 nm	1.233.033	12.330.334	24.660.669	61.651.672	123.303.346
10 nm	9.864	98.642	197.285	493.213	986.427
30 nm	365	3.653	7.307	18.267	36.534
50 nm	79	789	1.578	3.945	7.891
70 nm	29	288	576	1.438	2.876
100 nm	10	99	198	493	986

Os arquivos de geometria utilizados nas simulações desta etapa do estudo foram escritos por um algoritmo auxiliar implementado em MatLab que tem como parâmetros de entrada o numero de partículas e o diâmetro de cada uma. Secções de choque para dois materiais foram consideradas: ouro e tecido-mole. A distribuição de AuNP foi simulada considerando-se a interação da radiação ionizante com interfaces metálicas ao longo do volume celular e os parâmetros C_1 e C_2 foram igualados a zero para garantir alcances reais para elétrons secundários. O numero total de *showers* primários simulados foi 2×10^9 em cada simulação.

A densidade de ionização na região do citoplasma celular é o principal resultado obtido com o *Estudo da Célula com Nanopartículas*. Nas simulações computacionais desse estudo, foram computadas as ionizações resultantes da interação de cada feixe primário estudado com uma célula sem nanopartículas, e o número total de ionizações na região do citoplasma celular foi tido como referência para o calculo da fração de reforço na densidade de ionização correspondente a cada combinação de diâmetro e concentração de ouro estudada ($\varphi_{d,E,C_{Au}}$). A função $\varphi_{d,E,C_{Au}}$ foi, portanto, calculada como a razão entre o número absoluto de ionizações resultantes da interação do feixe primário no volume celular com e sem nanopartículas. A figura 8 apresenta $\varphi_{d,E,C_{Au}}$ calculada conforme descrito na equação 4 para diâmetros de AuNP (d) entre 2-100nm, energias do feixe primário (E) entre 250kV e 6MV, e C_{Au} constante igual a 0,1% w/w.

$$\varphi_{d,E,C_{Au}} = \frac{\varphi_{d_i, E_j \cdot C_{Au}}}{\varphi_{0, E_j \cdot C_{Au}}} \quad (\text{Eq. 4})$$

Figura 8 – Fração de reforço na densidade de ionização ($\varphi_{d,E,C_{Au}}$) resultante da presença de 0,1% w/w AuNP dentro do citoplasma celular.

A figura 8 explicita a dependência do reforço na densidade de ionização com ambos os parâmetros energia e diâmetro das nanopartículas, quando uma concentração fixa de ouro é considerada no citoplasma celular. Para o feixe de 250kV, $\varphi_{(d, 200kV, 0,1\%)}$ apresenta variação (Δ) dentro do intervalo $2,25 > \Delta > 1,03$, decrescendo conforme o diâmetro da nanopartícula cresce de 2nm a 100nm respectivamente. Similarmente para os outros feixes primários, $\varphi_{d,E,C_{Au}}$ apresenta dependência com o diâmetro das AuNP, sendo respectivamente decrescente dentro do intervalo $2,00 > \Delta > 1,04$ para o Ir-192; apresentando concavidade

negativa com máximo em $d = 50\text{nm}$ para ambos os feixes de Cs-137 e 6MV, respectivamente dentro dos intervalos $1,78 > \Delta > 1,65$ e $1,18 > \Delta > 1,06$; e apresentando distribuição sem variação estatisticamente relevante dentro do intervalo $1,10 > \Delta > 1,03$ para o feixe de Co-60.

O comportamento da função $\varphi_{d,E,C_{Au}}$ para uma concentração fixa de ouro é fortemente dependente da energia do feixe primário, como pode ser observado na figura 8. Isso se dá porque o padrão de ionizações – criação de elétrons secundários - ao redor de cada AuNP muda com a energia dos fótons primários incidentes, como discutido nos estudos do *Estudo da Nanopartícula Isolada*. A distribuição espectral nesse caso é predominantemente composta por fotoelétrons quando os feixes de 250kV e Ir-192 são considerados, e por elétrons Compton e raios-delta quando feixes primários de megavoltagem são considerados.

Especificamente no caso do feixe primário de Cs-137, há equilíbrio entre as fluências de fotoelétrons e elétrons *Auger*/raios-delta (ver figura 5 na seção 2.1.1.B). A fluência de elétrons que efetivamente escapam de cada nanopartícula compõe, portanto, a fluência total de elétrons que contribuem para ionizações no citoplasma, e o fenômeno de interação que cria elétrons no ouro determina a distribuição espectral em fluência e energia, modificando, por sua vez, a densidade de ionizações resultante da distribuição tridimensional de AuNP no citoplasma.

A fim de comparar a distribuição de dose dentro de uma célula com nanopartículas incorporadas para dois feixes de radiação através do *Estudo da Célula com Nanopartículas*, uma distribuição real de AuNP no citoplasma de uma célula de adenocarcinoma de próstata foi então simulada. Uma imagem da secção longitudinal da célula com AuNP incorporadas foi obtida por microscopia eletrônica de transmissão (TEM) e é apresentada na figura 9. A imagem apresenta o cenário real de distribuição de AuNP dentro da célula após 24h de

incubação com uma solução de 0,1% w/w de ouro em meio de cultura celular. Os procedimentos técnicos utilizados para a obtenção da imagem de TEM da célula com AuNP utilizada nas simulações computacionais são descritos futuramente na seção 3.4.

Nesta etapa, foi observado que a distribuição real de nanopartículas na célula inclui a presença de *clusters* de AuNP com centenas de nanômetros. A figura 9 apresenta a célula e os *clusters* de AuNP observados. Em a) duas imagens com magnificações da ordem de 5.000 e 100.000 vezes são apresentadas e o círculo em vermelho delimita o diâmetro equivalente do *cluster* de AuNP considerado nas simulações computacionais; em b) todos os *clusters* de AuNP encontrados na imagem com magnificação 5.000 vezes são apresentados e a flecha em preto indica a inclusão dos clusters no plano central da célula esférica de 12,5 μ m para a simulação no PENELOPE. A espessura do plano central incluído na esfera homogênea simulada é igual a 50nm. Dois feixes primários foram escolhidos para simulações nesta etapa do estudo: Ir-192 e 6MV. As simulações foram realizadas no PENELOPE mantendo-se os mesmos parâmetros de simulação e geometria de irradiação descritos no *Estudo da Célula com Nanopartículas* no início da seção 2.2. A distribuição tridimensional de dose foi registrada no PENELOPE em um cubo com aresta igual a 12,5 μ m concêntrico à célula que, portanto, a circunscreve. Resolução espacial de 500nm foi utilizada nas simulações para o recorde da informação de energia depositada por *voxel* de volume final igual a 0,125 μ m³.

Geometria adotada para simulação Monte Carlo

Figura 9 - Célula real simulada no PENELOPE contendo *clusters* de nanopartículas.

A análise dos resultados nesse caso se deu em termos qualitativos. O principal objetivo desta análise é comparar as distribuições de dose depositada por elétrons e fótons secundários que escapam das nanopartículas incorporadas quando os feixes primários de Ir-192 e 6MV interagem com a célula contendo uma distribuição real de AuNP. A fim de observar o padrão de distribuição de dose na célula resultante apenas da interação de elétrons e fótons secundários, duas simulações foram realizadas para cada energia considerando a célula simulada com e sem as nanopartículas no citoplasma e duas matrizes tridimensionais contendo a informação da dose depositada em cada *voxel* foram respectivamente obtidas. Uma matriz final foi calculada para cada feixe primário como a subtração *voxel-a-voxel* das matrizes correspondentes à situações com e sem AuNP, e as isodoses foram traçadas no plano central da célula real utilizada, na qual os clusters de nanopartículas foram inicialmente observados. Estas isodoses correspondem, portanto, ao padrão de dose depositado apenas por fótons e elétrons secundários quando nanopartículas se encontram no citoplasma celular.

A principal implicação deste resultado é que o aumento da densidade de ionizações nas proximidades do núcleo celular é fortemente dependente da posição das nanopartículas no interior da célula e varia com a energia do feixe primário de radiação. Para que o reforço de dose seja equivalente em células contendo AuNP no citoplasma irradiadas com feixes de Ir-192 e 6MV, é necessário que diferentes concentrações de nanopartículas sejam incorporadas resultando, desta forma, em que isodoses de um mesmo valor – por exemplo 50% - englobem o mesmo volume final dentro da célula. A correlação deste resultado com a resposta biológica das células contendo AuNP é discutida extensamente em termos de ensaios *in vitro* na seção 4 e *in vivo* na seção 5 para ambos os feixes de Ir-192 e 6MV.

A partir da análise qualitativa apresentada na figura 10 - em termos das isodoses resultantes da interação de elétrons e fótons secundários que escapam das AuNP e atravessam a célula criando trajetórias de ionização com padrões diferentes e dependentes da energia do feixe primário - um estudo quantitativo foi realizado por simulação Monte Carlo para avaliar como a variação da concentração total de ouro incorporado no citoplasma celular modifica o reforço na densidade de ionização na célula como um todo.

Quando a concentração total de ouro na célula muda, a densidade eletrônica no citoplasma também é modificada, alterando o número total de eventos de ionização na célula. A fim de estudar como o reforço de ionização varia em função da concentração de ouro para cada diâmetro de nanopartícula, $\varphi_{d,E,C_{Au}}$ foi calculada para o intervalo de concentração $0,01\% < C_{Au} < 1\%$ w/w. A figura 11 apresenta a variação de $\varphi_{d,E,C_{Au}}$ com a concentração de ouro e a energia do feixe primário para cada diâmetro de AuNP estudado. O número total de AuNP presentes no citoplasma celular variou para cada concentração de ouro considerada conforme descrito na Tabela 2.

Concentração final de ouro (%w/w):

0,01% 0,1% 0,2% 0,5% 1%

Figura 11 – Fração de reforço da densidade de ionização estudada pelo *Estudo da Célula com Nanopartículas*.

A variação de C_{Au} no intervalo estudado modifica a densidade de ionização para todas as combinações de diâmetro e energia de feixe primário estudadas, sendo mais expressiva para feixes de kilovoltagem porque a secção de choque fotoelétrica (σ_{ph}) é predominante (ver figura 3 na seção 2.1.1) e tem forte dependência com o número atômico efetivo do meio (z) : $\sigma_{ph} \propto z^{3-4}/h\nu$ (Attix 1986). Entretanto, para os feixes de megavoltagem, há predominância de interação por espalhamento Compton no ouro, para o qual a secção de choque (σ_C) é linearmente dependente da densidade eletrônica total no meio: $\sigma_C \propto z^1/h\nu$ (Attix 1986).

O principal resultado da figura 11 é que a concentração final de ouro presente no citoplasma celular tem influência predominante na fração de reforço na densidade de ionização no interior da célula quando comparada com a mudança de diâmetro das AuNP para altas energias. C_{Au} modifica $\varphi_{d,E,C_{Au}}$ em intervalos Δ maiores que 2, sendo a densidade de ionização aumentada em 200% quando a concentração cresce de 0,01% para 1% w/w de ouro para baixas energias.

As figuras 4, 8 e 11 comparativamente demonstram que, quando analisados em separado, os parâmetros d , E e C_{Au} modificam a densidade de ionização na célula de maneiras diferentes. O diâmetro das nanopartículas incorporadas ao citoplasma celular modifica fracamente a densidade de ionização no meio ao redor da AuNP independentemente da energia do feixe primário incidente, modificando a densidade de ionização em menos de 1%, como discutido no *Estudo da Nanopartícula Isolada*. Elevando a complexidade da análise do reforço na densidade de ionização através dos estudos do *Estudo da Célula com Nanopartículas*, é possível concluir que a energia do feixe primário, por outro lado, modifica radicalmente ambas a fluência de elétrons de curto alcance gerados – fotoelétrons e elétrons Auger – e consequentemente a fração de reforço na densidade de ionizações na célula. Isso porque o aumento da energia do feixe primário modifica a fluência absoluta de elétrons

criados nas nanopartículas que escapam para o meio ao redor. Além das mudanças no espectro, a escolha da energia do feixe primário incidente modifica o padrão de ionizações no interior da célula irradiada (ver figura 10). Os diferentes padrões de isodoses representam graficamente a diferença no reforço local de dose no interior da célula, fortemente dependente da posição das nanopartículas no citoplasma celular, o que, por sua vez, modifica a probabilidade de dano biológico potencialmente interessante para terapia de câncer. Similarmente, a concentração total de ouro presente no citoplasma celular é proporcional ao reforço da densidade de ionização na célula, sendo mais relevante para energias de kilovoltagem do que megavoltagem.

Com base nos resultados obtidos no estudo por Monte Carlo - através de ambos o *Estudos da Nanopartícula Isolada* e da *Célula com Nanopartículas* - os objetivos específicos das etapas de ensaios biológicos foram definidos a fim de testar a hipótese fundamental desta tese descrita na seção 1. As etapas seguintes são detalhadas e discutidas nos capítulos subsequentes e consistem em: i) arquitetura e síntese de AuNP conjugadas com biomarcador tumoral específico; ii) ensaios *in vitro* de toxicidade celular e radiosensibilização; iii) ensaios *in vivo* de biodistribuição de nanopartículas e avaliação da resposta tumoral à radioterapia na presença de nanopartículas bioconjugadas.

3 Nanopartículas de Ouro Bioconjugadas para Terapia de Câncer de Próstata

3.1. Nanopartículas Bioconjugadas

Nanopartículas de ouro vêm sendo extensivamente investigadas para terapia de câncer com base em observações biológicas da interação dessas nanopartículas com células tumorais em sistemas *in vitro* e *in vivo* (Loo, Lowery et al. 2005, Eck, Craig et al. 2008, Liu, Lloyd et al. 2008, Zhang, Xing et al. 2008, Zheng, Hunting et al. 2008). Essencialmente dois mecanismos sinalizam o potencial sucesso do uso de AuNP em sistemas biológicos para terapia de câncer: a dimensão nanométrica que facilita a permeabilidade em tecidos biológicos e o alto peso molecular da AuNP devido ao número atômico elevado do ouro (Ionita, Conte et al. 2007). Ambas essas características físicas conferem às AuNP grande potencial de aplicação na terapia de câncer, justificando extensa pesquisa em busca de aplicações efetivas em oncologia. Principalmente no escopo da terapia de alvo guiado, as AuNP vêm sendo investigadas com sucesso em ambos os níveis da ciência básica e ensaios pré-clínicos (Ma, Feldman et al. 2009, Butterworth, Coulter et al. 2010, Krishnan, Diagaradjane et al. 2010, Hirn, Semmler-Behnke et al. 2011, Khlebtsov and Dykman 2011).

A terapia de câncer com alvo guiado (*target cancer therapy*) tem como idéia fundamental o encapsulamento de drogas onco-terapêuticas com biomoléculas cujos

receptores correspondentes são expressos nas células-alvo para. Essencialmente, essas biomoléculas são quimicamente conjugadas ao fármaco efetivamente ativo sendo, muitas vezes, responsáveis pelo acúmulo e retenção da droga no órgão alvo após injeção sistêmica do composto biomarcador-droga. Portanto, quando administrado na corrente sanguínea o composto final circula pelo organismo apresentando afinidade molecular por receptores específicos presentes nas células do(s) órgão(s) alvo, o que resulta na eventual retenção do composto biomarcador-droga no tecido alvo. No caso de um onco-fármaco bioconjugado para terapia efetiva, como consequência da retenção específica e localizada do composto, a droga é liberada no interior da célula alvo ou no microambiente celular – próximo à membrana – e a molécula efetiva tem sua ação terapêutica iniciada.

Por outro lado, quando não bioconjugadas, moléculas de alto peso molecular e interesse terapêutico, se acumulam em tumores por um mecanismo biofísico passivo conhecido como efeito de permeabilidade e retenção aumentada – efeito EPR, descrito em língua Inglesa como “*Enhanced Permeability and Retention effect*”. O efeito EPR é resultado da dinâmica biofísica de interação da molécula de alto peso molecular com a vascularização desordenada do tumor pela qual a droga circula. Como resultado da desordem vascular, a droga é retida no microambiente tumoral por intervalos de tempo maiores porque o *clearance* no tecido – fenômeno pelo qual as moléculas presentes no tecido vascularizado são eliminadas do microambiente celular – se encontra prejudicado pela desordem vascular local. Uma vez retida localmente no tumor, a droga tem probabilidade aumentada de permear a membrana das células tumorais, resultando no acúmulo da droga no tumor através de um mecanismo passivo, ou seja, sem que nenhuma interação química específica seja necessária entre a droga e a membrana das células alvo.

Especialmente no caso de AuNP bioconjugadas, a presença do biomarcador combinada com o alto peso molecular da nanopartícula resultam na terapia de alvo guiada

com permeabilidade e retenção aumentada, explorando ambos os fatores: presença da biomolécula conjugada à superfície da nanopartícula e as características de alto peso molecular e dimensão nanométrica. A identificação de biomarcadores tumorais é uma ampla área do conhecimento que atualmente compõe o *estado da arte* da medicina oncológica celular e molecular (Loo, Lowery et al. 2005, Kim, Jeong et al. 2010, Van de Broek, Devoogdt et al. 2011).

Especificamente o câncer de próstata apresenta dinâmica de crescimento tumoral associada à características hormonais de andrógeno-dependência, expressando receptores moleculares específicos na membrana celular direta e indiretamente relacionados à fatores de crescimento tumoral (Garnick 2009, Goodman 2009, Ewald, Desotelle et al. 2013, Kachroo and Gnanapragasam 2013). O mapeamento das cascatas moleculares correlacionadas com a dependência hormonal do câncer prostático evidenciam biomarcadores de membrana de potencial interesse para conjugação com nanopartículas. O eixo hormonal no qual o carcinoma prostático se inclui segue essencialmente a seguinte cascata: o baixo nível de dihidrotestosterona (DHT) estimula a o hipotálamo a produzir a gonadotrofina (GnRH) que, por sua vez, estimula a hipófise a produzir hormônio luteinizante (LH); Em seguida, os testículos respondem a presença de LH e dehidroepiandrosterona – produzida nas supra-renais - no sangue e produzem a testosterona, a qual leva à próstata a produzir DHT até que os níveis circulantes entrem em equilíbrio. A goserelina é conhecida como molécula agonista da Gonadotrofina, a qual é um tipo de hormônio luteinizante liberador de hormônio – comumente referido em língua Inglesa como “*Luthenizing-Hormone Releasing-Hormone*” – ou ainda LHRH.

O receptor molecular de membrana identificador da gonadotrofina é, portanto, conhecido como GnRH-R e é também sensibilizado pela molécula agonista, a goserlina. Classicamente, a molécula de goserelina (goserelin) é descrita como agente indiretamente

relacionado à próstata porque atua na glândula hipófise e tem como principal função a indução da liberação de hormônios que estimulam as funções da próstata (Ewald, Desotelle et al. 2013, Shi, Han et al. 2013). O goserelin é encontrado no medicamento comercialmente disponível conhecido como *Zoladex*[®] desde 1973, quando a molécula foi aprovada para uso clínico pelo órgão americano de regulação de alimentos e drogas, *Food and Drug Administration* (FDA). Tradicionalmente, a terapia hormonal de câncer de próstata é baseada na indução da perda das funções da próstata através do estímulo contínuo - não pulsado – da produção de testosterona. Sob estresse metabólico, o órgão prostático deixa de responder aos sinalizadores hormonais naturalmente emitidos pela hipófise e perde funcionalidade.

Menos tradicionalmente, estudos recentes evidenciaram que algumas células de câncer prostático apresentam receptores moleculares de membrana GnRH-R – afim portanto da molécula de goserelin (Montagnani Marelli, Moretti et al. 2009) - e a expressão desses receptores é possivelmente relacionada ao estímulo e inibição de receptores para fator de crescimento epidermal, comumente referidos em língua Inglesa como “*Epidermal Grown Factor Receptors*” (EGFR) (Morgan, Stavrou et al. 2011). Em especial, células PC3 de adenocarcinoma de próstata humano apresentam expressão elevada do receptor GnRH, portanto, apresentam afinidade biomolecular com o goserelin.

Com base na evidencia em nível biomolecular da afinidade de células PC3 com a molécula de goserelin, nanopartículas de ouro foram então arquitetadas com o objetivo fundamental de promover o acúmulo máximo de AuNP em tumores xenográficos de próstata após administração sistêmica.

3.2. Arquitetura e Síntese de AuNP bioconjugadas com Goserelin

Nanopartículas de ouro cilíndricas – referidas como nanorods de ouro (AuNR) – produzidas e disponibilizadas pela empresa Nanospectra Inc. foram utilizadas em todos os estudos experimentais. Dois tipos de AuNR foram utilizados: PEG-AuNR (pAuNR) e *bare*-AuNR. O primeiro se refere à nanopartículas que têm a superfície completamente coberta por moléculas de polietileno-glicol (PEG) de peso molecular 5K Molar, as quais apresentam um metil (CH_3) na sua terminação exposta. As nanopartículas denominadas *bare*-AuNR são nanorods de ouro que têm a superfície metálica completamente exposta e, para fins de estabilidade química em solução aquosa, são disponibilizados em solução de CTAB. Os *bare*-AuNR foram utilizados para bioconjugação com goserelin.

A estratégia escolhida para a conjugação do goserlin na superfície das nanopartículas é baseada na ação do *crosslinker* EDC (1-Etil-3-[3-dimetilaminopropyl]hidroclorato de carbodiimida) (*ThermoScientific* 22980). EDC é uma carbodiimida que ativa grupos carboxilas em solução aquosa para reação espontânea com aminas primárias. A figura 12 demonstra o processo de *crosslinking* do PEG com a amina primária do goserlin via criação do grupo éster reativo que efetivamente leva à conjugação de ambas as moléculas. Nesta figura, o grupo 1 pode ser substituído pelo SH-PEG-COOH⁻ e o grupo 2 pela molécula de goserelin, o qual apresenta uma amina primária disponível para conjugação. O complexo final SH-PEG-Goserelin é facilmente ligado à superfície da nanopartícula de ouro devido à forte afinidade química entre o grupo SH e a superfície positivamente carregada do AuNR.

Figura 12 – Ilustração da reação de formação da ponte amina entre os terminais carboxila e amina induzida por Sulfo-NHS.

A figura 13 ilustra o protocolo desenvolvido neste trabalho especificamente para a conjugação do complexo SH-PEG-Goserelin com os AuNR. Essencialmente, 355µL de uma solução aquosa 2mM de EDC é adicionada a 100µL de uma solução 1mM de SH-PEG-COOH em água enquanto o sistema é mantido a 4°C; Em seguida, 326µL de uma solução 5mM de sulfo-NHS são adicionados à mistura. Nesta etapa, a terminação carboxila do PEG se encontra ativada e imediatamente após a adição do goserelin o complexo SH-PEG-Goserelin começa a ser formado na solução. Após incubação por 1h à temperatura constante de 4°C, 100µL da solução de *bare*-AuNR com densidade ótica igual a 3 é adicionada e o sistema é mantido sob agitação moderada e constante por 12h. Em seguida, a mistura final contendo excesso de reagentes e AuNR conjugados é centrifugada a 4°C com velocidade 12.000 cgf por 15 minutos. O pellet resultante é ressuspensionado em solução salina tampão (*phosphate buffered saline solution*– PBS) (*Thermo Scientific*) e o sobrenadante é novamente submetido a centrifugação nas mesmas condições. Ao final, os pellets coletados contêm as nanopartículas conjugadas. As nanopartículas bioconjugadas com goserelin foram então denominadas gAuNR.

Figura 14 – Ilustração do protocolo de conjugação de AuNR com goserelin acetato.

O processo de conjugação foi monitorado para três proporções molares de PEG:Goserelin, correspondentes às frações molares 1:1, 1:0,5 e 1:0,25, que respectivamente equivalem às frações em massa PEG:Goserelin de 100%, 50% e 10%. O processo de conjugação modifica a carga efetiva na superfície da nanopartícula, modificando o potencial zeta em cada etapa. A tabela 3 apresenta as medidas do potencial zeta realizadas com as nanopartículas em solução aquosa. O principal resultado apresentado na tabela é a mudança do potencial zeta positivo medido para *bare*-AuNR não conjugados - igual a 22,30mV - para negativo igual à -2,20mV, indicando que após a conjugação a superfície da nanopartícula se encontra coberta por ambas as moléculas de PEG - encontrado em excesso na solução aquosa no momento da conjugação - e por PEG-Goserelin, como ilustrado na figura 13. É possível ainda observar que a carga é menor para as partículas conjugadas quando a maior fração em massa (PEG:Goserelin) é utilizada.

Tabela 3 - Potencial zeta medido para AuNR em diferentes estágios da conjugação

Nanopartícula	Potencial Zeta (mV)
<i>bare</i> -AuNR (estabilizados em CTAB)	+ 22,30
COOH ⁻ -PEG-AuNR	- 17,00
SH-PEG-AuNR	+ 0,25
Goserelin - PEG - AuNR (Sol. 10%)	- 6,30
Goserelin - PEG - AuNR (Sol. 50%)	- 5,50
Goserelin - PEG - AuNR (Sol. 100%)	- 2,20

Imagens de microscopia eletrônica de transmissão (TEM) foram obtidas com as nanopartículas antes e após a conjugação no microscópio eletrônico do JEM1010 (JEOL, USA, Inc, Peaboy, MA) a 80kV. Imagens foram obtidas usando *AMT Imaging System* (*Advanced Microscopy Technology Corp.*, Danvere, MA). A figura 14 apresenta estas imagens com magnificações entre 100,000 e 300,000 vezes. É possível notar a presença de uma borda de densidade eletrônica distinta imediatamente ao redor do ouro nas imagens de gAuNR. Esta borda aparece apenas ao redor das nanopartículas bioconjugadas com goserelin, indicando que PEG-Goserelin forma uma camada homogênea ao redor das nanopartículas após a conjugação. É possível ainda notar que as nanopartículas não se agregam quando bioconjugadas.

Figura 14 - Os procedimentos de preparo das nanopartículas para a tomada de imagens foram realizados pela equipe técnica responsável pelo microscópio.

Para estimar o número de moléculas de goserelin conjugadas por AuNR, dois métodos quantitativos baseados nos espectros de absorbância na região de UV-Vis foram escolhidos. O primeiro se baseia na detecção do pico de absorbância característico de proteínas que possuem anéis cíclicos na molécula, o qual, para a molécula de goserelin, aparece distintamente no comprimento de onda $\lambda=268\text{nm}$. O segundo método de quantificação consiste no uso de um kit comercial para detecção de proteínas em soluções: o *kit* Micro-BCA (Thermo Scientific).

O kit Micro-BCA foi utilizado seguindo-se precisamente as instruções de formulação e uso que acompanham os reagentes químicos no *kit*. Para ambos os métodos, curvas de calibração absorbância *versus* concentração foram previamente obtidas em separado com soluções aquosas respectivamente de goserelin e goserelin adicionado das soluções reagentes A, B e C do kit Micro-BCA, ambas sem nanopartículas.

As imagens apresentadas na figura 15 (a) e (b) ilustram, respectivamente, as diferentes intensidades de coloração das soluções de goserelin incubadas com os reagentes do kit Micro-BCA; e a sensibilidade específica do kit Micro-BCA para a detecção do goserelin demonstrando que a presença do polietileno-glicol na superfície das nanopartículas referidas como PEG-AuNR não contribui para a mudança de coloração da solução experimental, portanto não influenciando a quantificação de goserelin nas nanopartículas bioconjugadas referidas na imagem (b) como PEP-PEG-AuNR. A figura 15 (c) apresenta ambas as curvas de calibração obtidas para cada método de quantificação.

Figura 15 - Sensibilidade do *kit* Micro-BCA de análise de proteínas para a detecção do peptídeo Goserelin conjugado em nanopartículas de ouro. Nesta figura, PEP-PEG-AuNR indica a solução de gAuNR após uma hora de incubação com o *kit* Micro-BCA (*Pierce Protein* – Thermo Scientific); Após incubação com o mesmo kit, a solução PEG-AuNR não apresenta coloração alguma.

O número de moléculas de goserelin conjugadas aos AuNR foi então calculado com base nos espectros de absorvância característicos de soluções de nanopartículas em água. A figura 16 apresenta os espectros utilizados no procedimento de quantificação sem o kit Micro-BCA obtidos para pAuNR e gAuNR conjugados com as três diferentes frações molares PEG:Goserelin. O pico em $\lambda=758\text{nm}$ foi utilizado para a leitura da densidade ótica da solução de nanopartículas, a qual é diretamente proporcional ao número de AuNR - e portanto também à massa final de ouro presente na solução - conforme indicado pelo fabricante dos AuNR. Para cada solução individualmente, a razão dos picos de absorvância em $\lambda=268\text{nm}$ e $\lambda=758\text{nm}$ expressa então o número de moléculas de goserelin por AuNR estimado pelo primeiro procedimento (ver figura 15). Analogamente, espectros de absorvância foram obtidos para as soluções de AuNR incubadas com os reagentes do kit Micro-BCA e a razão entre as absorvâncias em $\lambda=562\text{nm}$ - conforme indicado no manual de uso do kit - e no pico de densidade ótica característico das nanopartículas foram utilizadas para os cálculos realizados no procedimento com o kit Micro-BCA. A tabela 4 apresenta de maneira comparativa os valores calculados.

Figura 16 - Espectro de absorbância medidos no intervalo UV-Vis para nanopartículas de ouro (*rod-shaped*) conjugadas com *Goserelin* por três formulações distintas que consideram diferentes razões molares [PEG:*Goserelin*] em solução aquosa. As flechas indicam, respectivamente, o pico de densidade óptica (OD) das nanopartículas em 758nm e o pico característico do peptídeo *Goserelin* em solução aquosa em 264nm. A curva para pAuNR também é apresentada em sobreposição, evidenciando a contribuição do Polietileno-Glicol para absorção antes de 300nm.

Tabela 4 – Análise quantitativa do número de moléculas de goserelin conjugadas por AuNR

	OD (u.a.) * ($\lambda = 765$ nm)	$AuNR/mL$	Análise do pico de absorção característico do <i>Goserelin</i>		Análise por Micro-BCA kit de quantificação de proteínas	
			Absorbância em $\lambda = 268$ nm	Mol. Goserelin por AuNR	Absorbância em $\lambda = 562$ nm	Mol. Goserelin por AuNR
g-PEG-AuNR (10%)	5.2820	$1,056 \cdot 10^{14}$	0.4110	34.92	0.3162	64.87
g-PEG-AuNR (50%)	6.4730	$1,295 \cdot 10^{14}$	0.4985	45.39	0.3241	68.69
g-PEG-AuNR (100%)	6.3240	$1,265 \cdot 10^{14}$	0.5302	55.81	0.3929	71.11

* O número de nanopartículas por unidade de densidade ótica (OD) foi calculada pela relação descrita na equação 5, a partir de uma solução 1:100 de nanopartículas e a correspondência entre a absorbância no pico de densidade ótica e o número de AuNR por mL fornecida pelo fabricante das nanopartículas.

$$Densidade\ de\ AuNR = 2 \cdot 10^{11} \frac{AuNR}{OD} \quad (Eq. 5)$$

A conjugação realizada com a fração molar PEG-Goserelin 1:1 resulta no número máximo de moléculas de goserelin por nanopartícula como pode ser observado na tabela 4 e foi escolhida para os experimentos *in vitro* e *in vivo* consequentes. Nanopartículas bioconjugadas com goserelin foram reproduzidas múltiplas vezes seguindo o protocolo de conjugação desenvolvido neste trabalho conforme ilustrado na figura 13, e o espectro de absorbância foi sempre coletado na região do UV-Vis a fim de monitorar a efetividade da bioconjugação.

3.3. Estudo *in vitro* de Toxicidade de gAuNR

Células PC3 de adenocarcinoma de próstata humano foram primariamente obtidas da *American Type Culture Collection* ((ATCC) 2013), cultivadas e proliferadas em ambiente estéril com meio de cultura comercialmente disponível RPMI-1640 (Thermo Scientific) enriquecido com 10% de serum bovino fetal (FBS), 1% de penicilina (PenStrep) e 1% de glutamina (Glutamina, *Life Technologies, Gibco*), e incubadas à 35°C em atmosfera de 5% de CO₂, conforme indicado pela ATCC. As células foram somente utilizadas para experimentos quando entre as passagens de proliferação número 7 e 15 e o tempo característico de proliferação necessário para dobrar o número dessas células em cultura foi estimado de 16h.

Após a conjugação com goserelin, AuNR foram submetidos ao teste de toxicidade celular comercialmente disponível comumente referido como *kit* XTT (*Sigma*) para identificar potencial toxicidade química associadas ao uso das gAuNR nas células alvo PC3. Este teste de toxicidade objetiva essencialmente a medida relativa de viabilidade metabólica baseada na capacidade proliferativa de células expostas à droga estudada em diferentes concentrações. O *kit* XTT foi utilizado seguindo as instruções do fabricante. A figura 17 ilustra a placa de 96 poços contendo 100,000 células PC3 por poço incubadas por 4:30h e 24h com gAuNR e consecutivamente submetidas ao teste de toxicidade com o *kit* XTT. A figura 18 apresenta os resultados obtidos para o teste de toxicidade.

Figura 17 - Teste de toxicidade e viabilidade celular (XTT *kit* assay - *Sigma*).

Figura 18 - Estudo comparativo de proliferação celular avaliada para concentrações de nanopartículas gAuNR com $0,01 < OD < 1$, representativas do intervalo de fração em massa (w_{Au}/w_{meio}) entre 0,0001% e 0,3% w/w. Para o cálculo das frações em massa, a densidade do meio de cultura foi considerada como $1,09 \text{ g/cm}^3$.

O experimento de toxicidade foi realizado em quadruplicata e evidenciou que não há interferência significativa das gAuNR na proliferação celular de células PC3. As nanopartículas bioconjugadas foram portanto consideradas não tóxicas e utilizadas consecutivamente nos experimentos de captação celular de nanopartículas, descritos ainda neste capítulo, clonogenicidade após exposição à radiação ionizante e experimentos realizados com os modelos xenográficos de câncer de próstata *in mice* descritos nos capítulos seguintes.

3.4. Dinâmica Celular de Captação de gAuNR e pAuNR

A dinâmica de captação celular das nanopartículas gAuNR e pAuNR foram estudadas por dois métodos: qualitativamente através da observação de imagens de TEM das células PC3 expostas às nanopartículas por diferentes períodos de incubação; e quantitativamente através da medida do espectro de absorção de suspensões aquosas de células lizadas também após incubadas com nanopartículas por diferentes períodos de tempo. Foram considerados períodos de incubação entre 15min e 72h em ambos os experimentos. A figura 19 ilustra as condições de manutenção das células em "*petri dishes*" durante a incubação com nanopartículas.

Figura 20 - Células mantidas na incubadora a atmosfera de 35°C e 5% de CO₂.

As imagens de TEM das células incubadas com nanopartículas gAuNR e pAuNR são apresentadas nas figuras 20 e 21 com magnificações entre 5,000 e 100,000 vezes. Todos os procedimentos de preparação das células para imageamento foram realizados pela equipe técnica que opera o microscópio eletrônico utilizando o protocolo de manipulação em anexo no Anexo 1.

gAuNR

$\Delta T = 15 \text{ min}$

$\Delta T = 1 \text{ h}$

$\Delta T = 4 \text{ h}$

$\Delta T = 16 \text{ h}$

Célula A

$\Delta T = 24 \text{ h}$

Figura 20 - Imagens de Microscopia Eletrônica (TEM) de células PC3 incubadas com nanopartículas bioconjugadas gAuNR por diferentes intervalos de tempo.

Observando as imagens de TEM da figura 20 é possível perceber que as nanopartículas gAuNR interagem e permeiam rapidamente a membrana celular em posições distintas da célula, sendo facilmente endofagocitadas em *clusters* de aproximadamente 100nm, os quais, consecutivamente, são reorganizados em endofagossomos maiores, de até alguns micrômetros; Em 24h de incubação, o maior número de *clusters* é encontrado, indicando que a máxima concentração de ouro acontece neste período de incubação, e as nanopartículas estão distribuídas homogeneamente no citoplasma celular. Ao longo de todos os períodos de incubação, as nanopartículas disponíveis em excesso no meio de cultura continuam a interagir com a membrana celular, contribuindo para a internalização continuada. Após a exposição às gAuNR por 72h, foi observado que as células continuam a captar nanopartículas, não aparentando, no entanto, aumento da quantidade total de nanopartículas efetivamente retidas no citoplasma celular.

O mesmo procedimento de incubação e imageamento por TEM foi realizado com células PC3 incubadas com pAuNR e a figura 21 apresenta essa sequência de imagens.

<p>$\Delta T = 1 \text{ h}$</p>
<p>$\Delta T = 4 \text{ h}$</p>
<p>$\Delta T = 16 \text{ h}$</p>

Figura 21 - Imagens de Microscopia Eletrônica (TEM) de células PC3 incubadas com nanopartículas cobertas com PEG, pAuNR, por diferentes intervalos de tempo.

As imagens de TEM obtidas para as células incubadas com pAuNR evidenciam que a não especificidade do PEG que encobre a superfície das nanopartículas altera a dinâmica de interação com a membrana celular, tendo como principal resultado a retenção retardada de nanopartículas em número menor e *clusters* maiores que correspondem a uma distribuição final menos homogênea das nanopartículas no citoplasma celular.

A fim de quantificar as diferenças no número de nanopartículas retidas dentro das células de maneira estável, a avaliação quantitativa da captação celular de ambas as nanopartículas gAuNR e pAuNR foi então realizada através do seguinte procedimento experimental: 50,000 células foram semeadas em 84 *petri dishes* de 35mm de diâmetro e incubadas por 24h com meio de culturas sem nanopartículas; Duas suspensões foram preparadas em meio de cultura celular com gAuNR e pAuNR respectivamente, ambas contendo concentração com densidade ótica igual à 0,3, representando o mesmo número de nanopartículas disponíveis para captação em suspensão; Em seguida, o meio de cultura foi aspirado e substituído em cada *petri dishes* por meio de cultura contendo nanopartículas. O experimento foi realizado em triplicata com 14 diferentes intervalos de incubação compreendidos entre 15min e 70h, sendo 42 *petri dishes* incubados com gAuNR e 42 com pAuNR.

Ao final de cada intervalo de incubação, o meio de cultura contendo nanopartículas em suspensão foi aspirado e as células foram lavadas com solução tampão duas vezes antes de adicionada a tripsina (*Thermo Scientific*) para descolar as células do *petri dish*; Após 5min expostas à ação de 0,5mL de tripsina a 35°C na incubadora, 2,5mL de meio de cultura celular foram adicionados a cada *petri dish* para bloquear a ação enzimática da tripsina e manter as células em suspensão estável; o número de células foi então contado utilizando-se um hematocítômetro e um microscópio invertido. As células de cada *petri dish* foram mantidas em separado em tubos plásticos contendo solução salina especial para lize das membranas, aqui referido como *buffer* de lize. A tabela 5 apresenta os reagentes de preparo desta solução. Os tubos plásticos contendo as células em suspensão no *buffer* de lize foram respectivamente submetidos a ultrassom por 2min a 500MHz e 4°C em um sonicador. Em seguida, os tubos foram centrifugados 12,000 cgf por 10min e os pellets contendo as nanopartículas foram coletados. Cada pellet teve uma contagem celular associada a si e corresponde ao total de

nanopartículas efetivamente retidas no interior das células após um determinado período de incubação. Os pellets foram então ressuspensos em 10µL de água deionizada e homogeneizados com ultrassom por 2min a 500MHz e 4°C; De cada tubo plástico, 5µL foram utilizados para obtenção do espectro de absorbância no espectrofotômetro de alta precisão *NanoDrop Lite Spectrophotometer (Thermo Scientific)*, e a densidade ótica medida em $OD_{\lambda=758nm}$ foi coletada e relativizada pelo número de células contadas em mesmo tubo plástico. Um valor médio foi calculado para ODs correspondentes a um mesmo tempo de incubação e os valores medidos são apresentados na figura 22 como absorbância relativa, em unidades arbitrárias, normalizados para o ponto de 24h de incubação com as nanopartículas controle pAuNR.

Tabela 5 – Descrição dos reagentes para preparo do *buffer* de lize celular completa

Água deionizada	1180 µL
NP-40 (10%)	150 µL
NaCl (5 M)	75 µL
HEPES (1M)	30 µL
EGTA (0,1M)	75 µL
EDTA (0,5M)	6 µL
NaF (1M)	10 µL
NaVO ₄ (0,2M)	10 µL
Leupeptina (1µg/mL)	5 µL
Aproptina (5µg/mL)	5 µL
PMSF (0,1M)	5 µL

Figura 22 - Dinâmica de *uptake* nanopartículas gAuNR e pAuNR por células PC3.

O experimento quantitativo de captação celular evidenciou que para ambas as nanopartículas, bioconjugadas ou cobertas apenas com PEG, a máxima captação acontece após 24h de incubação, sendo, no entanto, até 5 vezes maior para gAuNR do que para pAuNR. Após 24h de incubação, uma queda pode ser observada no gráfico, indicando que o número total de nanopartículas internalizadas diminui com o tempo. Entretanto, foi observado nas imagens de TEM coletadas em tempos maiores que 24h que as células não apresentam citoplasma saudável devido ao tempo longo de incubação com um montante fixo de nutrientes disponíveis no meio de cultura, o que leva a formação de bolsas de líquido no citoplasma (ver figuras 20 e 21) .

A partir dos resultados coletados neste etapa, os ensaios radiobiológicos de clonogenicidade *in vitro* e crescimento tumoral *in vivo* foram planejados comparativamente para ambas as nanopartículas gAuNR e pAuNR no tempo de incubação ótimo de 24h e são descritos nas seções 4 e 5.

4 Ensaios Clonogênicos com gAuNR e pAuNR

A medida da habilidade clonogênica de células em cultura é proporcional ao efeito biológico responsivo à ação sinérgica de drogas combinadas com radiação ionizante, que modificam a capacidade proliferativa celular porque influenciam ou inviabilizam a replicação do DNA direta ou indiretamente (Hall and Giaccia 2006). A curva que descreve a fração de sobrevivência celular (SF) em função da dose de radiação ionizante – combinada ou não com uma droga de ação biomolecular – é então conhecida como curva de sobrevivência celular e extensivamente utilizada na medicina molecular moderna como *gold standard* método para avaliar a toxicidade de drogas de interesse clínico (Fowler and Denekamp 1979, Dische 1991, Oronsky, Knox et al. 2012). Em estudos radiobiológicos, a SF é proporcional a criação de danos diretos e indiretos do DNA celular, bem como ao estresse oxidativo no citoplasma celular. Quando nanopartículas de ouro são adicionadas às células, ambas essas informações se relacionam diretamente com a densidade de ionização no interior das células e a resposta clonogênica é modificada em função do padrão local de deposição de dose (Brun, Sanche et al. 2009, Butterworth, McMahon et al. 2012).

O principal objetivo desta etapa do estudo é comparar a sensibilidade das células alvo aos diferentes padrões de densidade de ionização no citoplasma celular resultantes de cada combinação de energia de feixe de radiação ionizante e nanopartícula estudada. Ensaios clonogênicos foram realizados com células PC3 incubadas com nanopartículas de ouro bioconjugadas gAuNR e não específicas pAuNR irradiadas com feixes de radiação ionizante de diferentes energias: Ir-192, Cs-137 e 6M.

Os experimentos clonogênicos foram realizados com as células alvo de próstata submetidas à incubação por 24h antes das irradiações com concentração fixa de nanopartículas de OD igual a 0,3 em meio de cultura celular adequado (ver descrição detalhada na seção 3.3.). Doses de 0-6Gy foram entregues a aproximadamente 150,000 células de crescimento exponencial semeadas em frascos de 25cm² de área útil, comumente referidos como T25 *flasks*. Células incubadas com meio de cultura sem nanopartículas também foram irradiadas com as mesmas doses em cada feixe, e as curvas de sobrevivência celular obtidas para as células PC3 sem nanopartículas são utilizadas como referência para os parâmetros de radiosensibilização estudados.

Os procedimentos técnicos experimentais da etapa biológica de cada ensaio clonogênico são comuns às diferentes irradiações realizadas nesse estudo e seguem, para cada uma, a seguinte ordem: um número constante de células são semeadas em 12 T25 *flasks* e incubadas por 12h com meio de cultura celular; Em seguida, duas soluções de nanopartículas em meio de cultura com 10mL cada são preparadas respectivamente contendo a mesma concentração final de ouro de gAuNR e pAuNR (OD=0,3), e 2,5mL de cada solução são adicionados a cada T25 *flask*. Nos 4 *flasks* do grupo controle, são adicionados 2,5mL de meio de cultura sem nanopartículas; Todos as células são então incubadas por 24h em atmosfera adequada. Após a incubação, o meio de cultura contendo nanopartículas é aspirado e as células são lavadas com 2,5mL de PBS duas vezes consecutivas antes da adição de 15mL de meio de cultura sem nanopartículas. Este volume foi escolhido porque garante uma camada de 1,5cm de líquido sobre a monocamada de células, proporcionando equilíbrio eletrônico local durante as irradiações, o que contribui para acurácia dosimétrica das doses entregues às células. Imediatamente em seguida, todos os T25 *flasks* são irradiados com as respectivas doses e retornam ao ambiente estéril para a semente das células em triplicata em placas de 6 poços cada; Um numero diferente de células foi semeado para formarem colônias em cada

poço dependendo da dose de radiação ionizante recebida, sendo, respectivamente, 100, 200, 500, 3000 células por poço para 0Gy, 2Gy, 4Gy, e 6Gy. A figura 23 ilustra a disposição dos poços em uma placa típica de incubação celular para ensaios clonogênicos. As células foram incubadas por 14 dias em atmosfera adequada para formarem colônias. Os métodos de manipulação das células após a irradiação seguiram procedimentos padrões descritos em detalhe na literatura de referência (Hall and Giaccia 2006).

Figura 23 - Ilustração da placa de cultura clonogênica.

Após a incubação, o número de colônias formadas em cada poço contendo mais de 50 células cada (diâmetro da colônia entre 250µm e 400µm) foi contado utilizando-se o equipamento e software dedicado GelCounter (*Oxford Optonix*), e a média de cada triplicata foi coletada. O cálculo da eficiência de plaqueamento (PE) – normalmente referida em língua Inglesa como “*plating efficiency*” – é expresso na equação 6 . Foram calculadas PE de 93%, 93% e 92% para os grupos sem AuNP, gAuNR e pAuNR respectivamente. A partir das contagens de colônias, a SF foi então calculada como expresso na equação 7.

$$PE = \frac{\text{No. de Colônias Contadas}}{\text{No. de Células semeadas}} \quad (\text{Eq. 6})$$

$$SF = \frac{PE_{\text{amostra tratada}}}{PE_{\text{controle}}} \quad (\text{Eq. 7})$$

As irradiações foram realizadas em *setups* dosimétricos diferentes para cada um dos feixes estudados e são descritos individualmente nas seções 4.1, 4.2 e 4.3, respectivamente referindo-se ao feixe de Ir-192, Cs-137 e 6MV. Todos os experimentos de irradiação foram realizados no *Radiation Oncology Department* do MD Anderson Cancer Center em Houston, Texas, nos Estados Unidos.

4.1. Fonte de Braquiterapia de Alta Taxa de Dose (HDR) de Ir-192

O setup de irradiação de células em cultura utilizando a fonte de alta taxa de dose (HDR) de Ir-192 foi arquitetado no irradiador clínico *GammaMedplus®* (HDR *source afterloader*) especialmente para esses ensaios clonogênicos. A figura 24 ilustra a geometria de irradiação utilizada, composta consecutivamente por um bloco de 5cm de água sólida, um aplicador braquiterápico tipo H.A.M. com 7 canais – normalmente utilizado em procedimentos de Braquiterapia intraoperatória (HDR IORT) – com a face de 5mm posicionada para cima, e um bloco de água sólida de $6 \times 15 \times 1 \text{ cm}^3$ com um friso esculpido na face superior para o posicionamento preciso do T25 *flask* contendo as células a serem irradiadas. Os sete canais do aplicador foram conectados ao HDR *source afterloader* por cateteres tipo 6F.

Figura 24 - Setup de irradiação de células com a fonte de Braquiterapia HDR de Ir-192.

O sistema foi escaneado em um CT de raios-x e o conjunto de imagens no formato ‘DICOM’ foi importado no sistema de planejamento (TPS) Oncentra[®], normalmente utilizado para os planejamentos clínicos que utilizam esta unidade de tratamento braquiterápica no MD Anderson Cancer Center. Os planos foram então gerados no Oncentra[®] para a entrega de 2Gy, 4Gy ou 6Gy de dose num alvo definido como uma camada de 1mm de espessura centrada no plano onde a monocamada celular se encontra. Os planos de entrega de dose foram então exportados do Oncentra[®] para o console de controle do HDR *source afterloader* e submetidos à dosimetria com filme radiocrômico para o controle de qualidade da entrega do plano. Devido à especificidade do experimento, o filme radiocrômico utilizado (EBT2) foi

previamente calibrado para a energia e taxa de dose da fonte de Braquiterapia HDR de Ir-192, e os procedimentos e resultados obtidos para a calibração do filme são detalhados no anexo 2. A figura 25 ilustra o plano para a entrega de dose e os filmes irradiados neste *setup*. No momento das irradiações, a atividade da fonte era 6.4Ci e a taxa de dose no plano das irradiações foi estimada como aproximadamente 1030cGy/min.

Figura 25 - Plano para entrega de dose (a); Em (b) são apresentados os filmes EBT2 irradiados com as doses de 0Gy e 4Gy ilustrando a homogeneidade da dose entregue às células no *setup* de irradiação planejado.

A dose entregue foi calculada a partir da calibração descrita no anexo 2 e a homogeneidade foi avaliada a partir do desvio-padrão da densidade ótica calculada pixel-a-pixel no filme irradiado (consultar Anexo 2 para detalhes da dosimetria com filme). Os valores medidos de dose foram $(2,0 \pm 0,1) \text{ Gy}$, $(4,2 \pm 0,6) \text{ Gy}$ e $(5,9 \pm 0,8) \text{ Gy}$. O sistema projetado para irradiação de células em cultura no HDR *source afterloader* foi considerado aceitável e consecutivamente utilizado para os ensaios clonogênicos com o feixe de Ir-192.

4.2. Irradiador Experimental de Cs-137

As irradiações com a fonte de Cs-137 foram realizadas no irradiador experimental da *Experimental Radiation Oncology Division* do *Radiation Oncology Department* no MD Anderson Cancer Center, seguindo os procedimentos técnicos e a dosimetria de referência comumente adotados para o uso do irradiador. A figura 26 ilustra o irradiador de Césio e o posicionamento dos T25 *flasks* contendo as células alvo das irradiações.

Figura 27 - Irradiador experimental de Cs-137 do *Experimental Radiation Oncology Department* - MD Anderson Cancer Center, Houston.

As doses entregues aos T25 *flasks* nos ensaios clonogênicos foram calculadas pela equipe técnica de irradiação como $(2,0 \pm 0,1)$ Gy, $(4,0 \pm 0,3)$ Gy e $(6,0 \pm 0,2)$ Gy.

4.3. Acelerador Linear Clínico de 6MV

As irradiações com o feixe clínico de 6MV foram realizadas no acelerador linear *Varian 6EX* do *Radiation Oncology Department* do MD Anderson Cancer Center em Houston, e a dosimetria de referência do feixe foi utilizada para o cálculo das doses entregues aos T25 *flasks* contendo células. A geometria de irradiação neste caso é composta por: 15cm de água sólida posicionada sobre a mesa de tratamento; Três T25 *flasks* contendo uma coluna de 1,5cm de meio de cultura sobre a monocamada celular posicionados sobre a água sólida no centro do feixe de radiação; A abertura do campo e a distância fonte-superfície adotadas foram, respectivamente, 20x20cm² e 100cm. Foi utilizada a taxa de dose de 400cGy/min e fator de conversão unidade-monitor/Gy igual à 0,985. A figura 27 ilustra o acelerador linear clínico utilizado. Os experimentos com o feixe de 6MV foram realizados em triplicata. A incerteza na dose entregue às células foi adotada como igual a máxima incerteza calculada para este feixe: constante igual a 3%.

Figura 27 - Acelerador Linear de 6MV utilizado nos experimentos *in vitro*.

4.4. Curvas de Sobrevivência Celular

Os ensaios clonogênicos foram então realizados com os três feixes estudados Ir-192, Cs-137 e o feixe de 6MV e a figura 28 apresenta todas as curvas de SF obtidas.

As curvas de sobrevivência celular foram comparadas em duas diferentes instâncias: a primeira análise (i) é referida como análise horizontal e se refere à comparação das curvas de SF obtidas com os diferentes grupos de estudo - gAuNR (nanopartículas bioconjugadas), pAuNR (nanopartículas não-bioespecíficas) e sem nanopartículas (controle) - para uma mesma energia de feixe de radiação; A segunda análise (ii) é referida como análise comparativa vertical e compara o reforço na radiosensibilização das células de um mesmo grupo de estudo (controle, nanopartículas bioconjugadas e nanopartículas não-bioespecíficas) ao longo das diferentes energias de feixe primário estudadas.

Ambas as análises comparativas (i) e (ii) foram fundamentalmente embasada no parâmetro relativo de radiosensibilização REF (*“Radiosensitization Enhancement Factor”*) (Hall and Giaccia 2006, Chithrani, Jelveh et al. 2010, Leung, Chow et al. 2011). Este parâmetro é definido como a razão das doses necessárias para, em cada par de curvas comparadas, reduzir a população de células clonogenicamente viáveis a 10%. A equação 8 explicita o parâmetro REF em termos das doses $D_{(SF = 10\%)}$, onde $D_{(SF = 10\%)}$ representa a dose correspondente à fração de 10% em cada curva de SF comparada.

$$REF = \frac{D_{(SF = 10\%)}^{controle}}{D_{(SF = 10\%)}^{c/nanopartículas}} \quad (Eq. 8)$$

Figura 28 - Curvas de sobrevivência celular obtidas por ensaios clonogênicos para células PC3 irradiadas com doses entre 0-6Gy na fonte de braquiterapia HDR de Ir-192 (a), no irradiador experimental de Cs-137 (b) e no acelerador linear de 6 MV (c). A linha tracejada indica a fração de 10% de sobrevivência e as flechas indicam as doses D_{gAuNR} , D_{pAuNR} e D consideradas para o cálculo da fração de reforço da radiosensibilização (REF).

De maneira geral, as curvas de resposta celular do grupo controle apresentam comportamentos diferentes para cada feixe primário estudado. Conforme a energia do feixe aumenta e taxa de dose de irradiação diminui, ou seja, do feixe braquiterapia HDR para o acelerador linear, a curva de SF tem sua curvatura acentuada no gráfico semi-log, evidenciando que as células PC3 alvo deste estudo apresentam sensibilidade intrínseca detectável à mudanças de padrões de ionização. É possível ainda notar que há reforço na resposta radiosensível das células PC3 em todos os casos contendo nanopartículas de ouro, sendo esse reforço ainda mais relevante para o grupo das nanopartículas bioconjugadas do que para o grupo das nanopartículas não-bioespecíficas. Este comportamento corrobora a principal conclusão do estudo realizado por simulação Monte Carlo - descrito em detalhes na seção 2 - de que a maior concentração de nanopartículas internalizadas no citoplasma celular - maior para gAuNR do que para pAuNR, como verificado no estudo experimental de captação celular descrito na seção 3.4. - modifica o padrão de densidade de ionizações no interior das células potencializando o efeito biológico resultante.

A Tabela 6 apresenta os valores de REF calculados para cada combinação de feixe e grupo de tratamento estudado e os reforços relativos na radiosensibilização encontrados na análise horizontal de cada feixe primário de radiação estudados.

Tabela 6 - Reforços de radiosensibilização detectados nos ensaios clonogênicos

	REF_{gAuNR}	REF_{pAuNR}	$REF_{gAuNR} - REF_{pAuNR}$
Ir-192	1.45	1.16	29 %
Cs-137	1.23	1.07	16 %
6MV	1.21	1.09	12 %

A comparação vertical dos REF calculados demonstra que, para ambos os casos de nanopartículas bioconjugadas ou não-bioespecíficas, o uso do feixe de menor energia potencializa o dano celular, reduzindo a SF clonogênica à 10% com uma dose menor entregue pelo feixe primário, evidenciando que o melhor resultado de radiosensibilização acontece para o feixe que produz o maior número de fotoelétrons na interação com as nanopartículas de ouro (ver figura 28). Ainda para o feixe de braquiterapia, é possível observar que o uso de nanopartículas bioconjugadas, a despeito das nanopartículas não-bioespecíficas, resulta em uma diferença maior no REF do que a mesma diferença para os feixes de Cs-137 e 6MV. Este efeito expressa a consonância entre o resultado predito por simulação Monte Carlo e a resposta biológica observada de que a concentração final de nanopartículas na região do citoplasma celular é um parâmetro físico com maior relevância para menores energias.

O expressivo reforço detectado na radiosensibilização de células PC3 em cultura tratadas com nanopartículas de ouro bioconjugadas e submetidas à radiação ionizante conduziu o estudo à etapa de ensaios pré-clínicos iniciais. Esta etapa consiste na criação de um modelo xenográfico *in mice* para as células de adenocarcinoma de próstata estudadas e consecutivo tratamento dos tumores com radioterapia após a administração de nanopartículas de ouro. Esta etapa foi planejada com base nos resultados obtidos na etapa dos estudos *in vitro* e foi realizada com ambos os feixes clínicos de irradiação: a fonte de braquiterapia HDR de Ir-192 e o feixe de 6MV.

5 Ensaio Pré-Clínico com gAuNR para Radioterapia de Câncer de Próstata

Modelos animais utilizados em estudos pré-clínicos são de fundamental importância principalmente por dois fatores:

- i) Possibilita a avaliação da toxicidade sistêmica da droga estudada;
- ii) A biodistribuição de drogas administradas sistemicamente é mimética em mamíferos com arquitetura orgânica similar, possibilitando a recriação da biodistribuição relativa da droga estudada em mamíferos de pequeno porte (como *nude mice*, por exemplo) de maneira consideravelmente representativa da dinâmica de retenção e eliminação – *uptake and clearance* – observada em sistemas humanos.

A recriação de um modelo xenográfico com células PC3 requer, portanto, a compreensão das características fundamentais do câncer de próstata como por exemplo a arquitetura patológica e a dinâmica de vascularização deste tipo de tumor, ambos fatores relevantes para a penetrabilidade das nanopartículas no alvo (Hirn, Semmler-Behnke et al. 2011, Khlebtsov and Dykman 2011, Jain, Hirst et al. 2012). Além disso, as células imortalizadas utilizadas apresentam limitações biomoleculares intrínsecas em termos da capacidade mimética de reproduzir a doença, o que, no caso do câncer de próstata, reflete-se

no estágio de andrógeno-dependência, por sua vez proporcional ao estágio de diferenciação celular (Zhang, Xing et al. 2008).

Em termos microbiológicos, o estágio de andrógeno-dependência representa a expressão de receptores na membrana das células, dentre eles LHRH e EGFR, e portanto, é proporcional à afinidade molecular do tumor xenográfico à molécula de goserelin agonista da Gonadotrofina. Idealmente, modelos animais para câncer de próstata devem apresentar características de andrógeno-dependência similares aos estágios possíveis da doença encontrados nos cenários clínico, normalmente classificados pelo índice de Gleason (Harnden, Shelley et al. 2007). Esses estágios de agressividade tumoral são proporcionais ao estágio de andrógeno-dependência das células que compõem o tumor, respectivamente proporcional à diferenciação celular e, portanto, à resposta efetiva a terapias hormonais, imunoterapias e células tronco (Jachetti, Mazzoleni et al. 2012, Oldridge, Pellacani et al. 2012).

Especialmente células PC3 não apresentam produção de antígeno específico de próstata – *prostate-specific antigen* (PSA) – e apresentam sensibilidade à andrógenos, mas não andrógeno-dependência. Ou seja, células PC3 são hábeis a formar tumores xenográficos cuja a progressão tumoral é sensível à administração de andrógenos em níveis terapêuticos (níveis elevados), entretanto não é regulada por ela. Por esta razão, é esperado que o crescimento tumoral em xenógrafos de PC3 seja exponencial, independentemente da administração do agonista de gonadotrofina LHRH, a molécula de *goserelin acetate* utilizada neste estudo.

O principal objetivo desta etapa *in vivo* é a investigação da potencial efetividade terapêutica do uso de nanopartículas de ouro bioconjugadas como nova estratégia de tratamento aditiva à radioterapia de câncer baseada no princípio físico da modulação da

energia do feixe de radiação através da produção de elétrons secundários com alcance intracelular.

Os estudos *in vivo* se deram essencialmente em duas etapas:

- i) Estudo da biodistribuição temporal das nanopartículas gAuNR e pAuNR;
- ii) Radioterapia com os feixes clínicos de Braquiterapia HDR de Ir-192 e de 6MV, ambos extensivamente utilizados em tratamentos clínicos de câncer de próstata humano.

Ambas as etapas tiveram como componentes metodológicos comuns o desenvolvimento dos modelos xenográficos, a manutenção dos animais e a administração intravenosa das nanopartículas, realizados múltiplas vezes conforme descritos a seguir.

Modelos xenográficos com células PC3 foram então implantados na parte superior do membro inferior direito de hospedeiros imunocomprometidos *nude mice*. A figura 29 ilustra a evolução do tumor ao longo de 30 dias após a implantação subcutânea de 7 milhões de células PC3 imortalizadas e mantidas em meio de cultura adequado por 12 passagens (ver seção 3.3). Todos os procedimentos técnicos experimentais para os implantes tumorais seguiram rigorosamente procedimentos indicados pelo *Department of Veterinary Medicine and Surgery* do MD Anderson Cancer Center em Houston. Um total de 90 animais com tumores efetivos foram utilizados nos experimentos desta etapa. Os animais foram mantidos sob cuidados adequados na colônia experimental *Department of Veterinary Medicine and Surgery* do MD Anderson Cancer Center em Houston.

Figura 29 - Evolução tumoral em *nude mice* após o implante xenográfico de células PC3 na porção superior do membro inferior direito.

As nanopartículas foram injetadas pela veia da cauda em todos os experimentos – procedimento comumente referido em língua Inglesa como “*tail vein injection*” – enquanto os animais se encontravam sob anestesia inalatória de fluxo constante com Ibuprofeno. Esta veia é a rota sanguínea normalmente escolhida em camundongos porque pode ser facilmente acessada após a dilatação estimulada por aumento da temperatura (40-50°C), evitando risco de erro no volume total da droga injetada. A figura 30 ilustra o procedimento seguido para *tail vein injection*.

Figura 30 - *Setup* utilizado para anestesia com o gás inalante Ibuprofeno (a); Ilustração do procedimento seguido para administração sistêmica de nanopartículas via *tail vein injection*.

Seis animais com tumores entre 8-2-mm em seu maior diâmetro foram selecionados para compor cada um dos grupos do estudo de biodistribuição de nanopartículas gAuNR e pAuNR. Sete órgãos, uma amostra muscular e o tumor foram removidos de cada animal após 24h da administração intravenosa de nanopartículas. A figura 31 ilustra os órgão coletados.

Figura 31 - Órgãos coletados no estudo comparado da biodistribuição de nanopartículas bioconjugadas e não bioespecíficas, respectivamente, gAuNR e pAuNR.

Os órgãos foram coletados individualmente e reservados em pequenos frascos de vidro para a liofilização. Após 96h de liofilização, os órgãos foram pesados e em seguida 1mL de solução 96% de *aqua regia* (ácidos nítrico e clorídrico) foi adicionado a cada um dos frascos contendo os órgãos secos para a digestão. Passadas 48h, 5mL de uma solução 1% de ácido nítrico foi acrescentada à mistura, a qual, após agitação mecânica, foi individualmente filtrada com microfiltros 0.2µm. As soluções filtradas foram então submetidas à análise espectroscópica por *Inductively Coupled Plasma Mass Spectroscopy* (ICP-MS) - um equipamento NexION@300 PerkinElmer foi utilizado para estas análises. Um padrão de referência de soluções de sal áurico com concentrações entre 1ppb e 100ppb foi utilizado para a calibração do equipamento antes de cada medida. O fator de conversão 1ppb = 1µg/L foi utilizado nos cálculos de determinação da massa de ouro detectada em cada órgão.

A biodistribuição evidenciou que os tumores acumulam em média 3% da massa de ouro administrada via intravenosa quando nanopartículas bioconjugadas gAuNR são utilizadas. Já no caso das nanopartículas não bioespecíficas pAuNR, apenas 1% da massa de ouro administrada é, em média, retida nos tumores após 24h da injeção. Observou-se ainda que, respectivamente para os casos gAuNR e pAuNR, o acúmulo de ouro encontrado em média nos fígados é de 6 a 8 vezes maior do que nos tumores. Portanto, no momento das irradiações - 24h após a administração intravenosa - a fração em massa de ouro presente nos tumores que recebem gAuNR se encontra entre 0,005% e 0,01% w/w; E entre 0,001% e 0,04% nos tumores tratados com pAuNR.

Após a etapa de biodistribuição, 55 novos animais foram selecionados e implantados com xenógrafos de células PC3. Os tumores apresentam crescimento assíncrono resultando em uma distribuição de tamanhos heterogênea no tempo. A fim de minimizar diferenças na resposta tumoral advindas de potenciais heterogeneidades na diferenciação celular dentro do volume tumoral, todos os tumores foram submetidos à tratamento apenas após atingirem 6mm de comprimento no eixo longitudinal. A figura 32 ilustra o procedimento de dimensionamento dos eixos geométricos do tumor. Os eixos *a* e *b* foram medidos sistematicamente ao longo do tempo antes e após a entrega de cada tratamento, e o volume final (v) dos tumores foi calculado pela equação 9 descrita a seguir.

$$v = \frac{4}{3} \cdot \pi \cdot a^2 \cdot \frac{b}{2} \quad (\text{Eq. 9})$$

Ilustração do tumor e seus eixos mensuráveis

Figura 32 – Ilustração do procedimento de medida dos eixos a e b dos tumores em estudo. A direita, a parábola representa o formato geométrico pressuposto para o cálculo dos volumes tumorais segundo a equação 9.

Após atingirem 8mm de comprimento em seu maior eixo dimensional, os tumores foram separados em grupos de tratamento conforme descrito na tabela 7.

Tabela 7 - Grupos de tratamento do estudo *in vivo*

Grupo de Tratamento	Descrição	No. de animais
Controle	Nenhum tratamento.	6
Goserelin	Administração sistêmica de 100µL de solução 50µM de goserelin* em PBS no <i>dia 0</i> de tratamento.**	6
6MV	5Gy foram entregues aos tumores com o feixe de clinico de 6MV no <i>dia 1</i> de tratamento.	6
Ir-192	5Gy foram entregues aos tumores com a fonte de Braquiterapia HDR de Ir-192 no <i>dia 1</i> de tratamento.	6
Goserelin → 6MV	Administração sistêmica de 100µL de solução 50µM de goserelin em PBS no <i>dia 0</i> de tratamento; 5Gy foram entregues aos tumores com o feixe clinico de 6MV no <i>dia 1</i> de tratamento.	6
gAuNR → 6MV	Administração sistêmica de 100µL de solução de gAuNR estabilizada em PBS com OD=11 no <i>dia 0</i> de tratamento; 5Gy foram entregues aos tumores com o feixe clinico de 6MV no <i>dia 1</i> de tratamento.	7
pAuNR → 6MV	Administração sistêmica de 100µL de solução de pAuNR estabilizada em PBS com OD=11 no <i>dia 0</i> de tratamento; 5Gy foram entregues aos tumores com o feixe clinico de 6MV no <i>dia 1</i> de tratamento.	6
gAuNR → Ir-192	Administração sistêmica de 100µL de solução de gAuNR estabilizada em PBS com OD=11 no <i>dia 0</i> de tratamento; 5Gy foram entregues aos tumores com a fonte de Braquiterapia HDR de Ir-192 no <i>dia 1</i> de tratamento.	6
pAUNR → Ir-192	Administração sistêmica de 100µL de solução de pAuNR estabilizada em PBS com OD=11 no <i>dia 0</i> de tratamento; 5Gy foram entregues aos tumores com a fonte de Braquiterapia HDR de Ir-192 no <i>dia 1</i> de tratamento.	6

* A concentração de goserelin escolhida para o grupo controle da droga não apresenta efeito terapêutico quando administrada isoladamente ou aditivo à radioterapia.

** O dia 0 de tratamento se refere ao período de 24h anterior à irradiação dos tumores; O dia 1 de tratamento se refere, portanto, ao momento das irradiações.

A dose de 5Gy foi prescrita para os tumores xenográficos de próstata com base em dados da literatura que evidenciam fraca resposta tumoral à essa dose de radiação – pouca ou nula redução de volume seguida de re-crescimento, comumente referido em língua Inglesa como “*tumor re-growth*” ou ainda “*tumor growth delay*”. Após a irradiação realizada no *dia 1* de tratamento, os tumores foram medidos em seus eixos *a* e *b* sistematicamente por 30 dias e os volumes tumorais foram respectivamente estimados para cada animal *i* como função do tempo *t* em dias ($V_{i(t)}$). Os volumes estimados V_i foram então normalizados para o volume inicial $V_{i(dia\ 1)}$. Em seguida, o volume médio relativo ($\bar{V}_{grupo}(t)$) e o respectivo desvio-padrão amostral (*sd*) foram estimados dentre os animais de cada grupo de tratamento como descrito nas equações 10 e 11 onde n_{max} é o número de animais em cada grupo de tratamento (ver tabela 7).

$$\bar{V}_{grupo}(t) = \frac{\sum_{n=i}^{n_{max}} V_{i(t)}}{n_{max}} \quad (\text{Eq. 10})$$

$$sd_{(\bar{V}_{grupo}(t))} = \sqrt{\frac{1}{n_{max}-1} \sum_{i=1}^{n_{max}} (V_{i(t)} - \bar{V}_{grupo}(t))^2} \quad (\text{Eq. 11})$$

Os tumores foram acompanhados até que todos os grupos de tratamento atingissem volume médio igual a pelo menos 3 vezes o volume inicial ou até que a média do grupo ultrapassasse 4 vezes o volume médio inicial do grupo. O comportamento esperado para o crescimento dos tumores após a irradiação é composto por dois estágios: redução tumoral seguida de re-crescimento, o que para tumores de próstata requer um tempo de aproximadamente 4 semanas.

As seções 5.1 e 5.2 descrevem respectivamente os procedimentos de irradiação dos animais com o feixe de 6MV e com a fonte de Braquiterapia HDR de Ir-192 e os resultados e discussões dos ensaios *in vivo* são apresentados comparativamente em conjunto na seção 5.3.

5.1. Feixe Clínico de 6 MV: Planejamento, Dosimetria e Tratamento

Os animais foram irradiados sobre um bloco com 15cm espessura de água-sólida no feixe clínico de 6MV do acelerador linear *Varian Clinac* do *Radiation Oncology Department* do MD Anderson Cancer Center em Houston. Foi utilizado um campo de radiação 15x15cm² colimado com bloco de blindagem especialmente desenhado para a irradiação de modelos xenográficos de tumores implantados na porção superior do membro inferior de *nude mice*. A figura 33 ilustram o bloco de blindagem construído e o posicionamento dos animais sob o feixe de radiação.

O bloco de blindagem foi planejado para recriar 4 campos circulares de radiação com 2,5cm de diâmetro no plano de tratamento e a taxa de dose para esta geometria foi estimada como descrito no anexo 3. O isocentro de tratamento se encontrou a 100cm de distancia da fonte e a calibração do feixe 15x15cm² utilizado foi adotada como 1,03cGy/m.u., conforme os registros dosimétricos coletados durante os procedimentos periódicos de controle de qualidade da máquina. Uma manta de material *bolus* tecido-equivalente com 1,3cm de espessura foi colocada sobre os animais antes das irradiações garantindo que os tumores fossem irradiados após a região de *build-up* do feixe, onde a dose prescrita foi calculada e medida. As figuras 33 (c) e (d) ilustram os animais posicionados sob o feixe respectivamente com e sem a manta de *build-up*. Uma medida dosimétrica com a câmera de ionização PTW[®] Farmer 30012 de 0,6cm³ colocada na posição do tumor foi realizada para a verificação da taxa

de dose efetiva ($\dot{D}$) na geometria arquitetada. Foram encontradas diferenças menores que 2% entre $\dot{D}$ planejada e medida. O planejamento e a dosimetria foram realizadas sob a supervisão dos físicos médicos responsáveis pelas irradiações experimentais no departamento.

Figura 33 - Setup de irradiação dos animais no acelerador linear de 6MV Varian Clinac.

5.2. Braquiterapia HDR com Ir-192: Planejamento, Dosimetria e Tratamento

As irradiações dos animais com a fonte de Braquiterapia HDR requereram o desenvolvimento de um aplicador dedicado para a exposição dos implantes xenográficos ao feixe externo de Ir-192. O aplicador foi projetado e construído conforme ilustrado na figura 34. O principal desafio de irradiar os tumores com um feixe externo de Ir-192 HDR é a dado pela irregularidade geométrica dos tumores dentro da população estudada que potencialmente compromete a reprodutibilidade do *setup* de irradiação e, portanto, a constância na entrega das doses aos tumores de diferentes grupos de estudo. Esse problema foi solucionado propondo-se o uso de um hidrogel composto de 98% de água – normalmente utilizado em exames de ultrassonografia para acoplamento acústico do transdutor com a pele do paciente. O gel foi então facilmente inserido na superfície do tumor com o auxílio de uma seringa para preencher o espaço compreendido entre o tumor e a parede interna do aplicador,

Figura 34 - Aplicador projetado e construído para Braquiterapia HDR com Ir-192 em modelos xenográficos em *nude mice*.

O aplicador é essencialmente constituído de um aplicador braquiterápico tipo H.A.M. – normalmente utilizado em procedimentos radioterápicos intraoperatórios (IORT) – com 6 cateteres ativos circundando um alvo cilíndrico de diâmetro fixo igual a 1,8cm. O alvo de irradiação, volume referido como PTV (*Planning Target Volume*), foi definido como um cilindro inscrito no aplicador com diâmetro coincidente igual 1,8cm e comprimento igual a 5,0cm. No momento das irradiações, cada tumor foi posicionado no interior da região definida do PTV e teve seu volume completado com o gel, resultando em um alvo efetivo de volume coincidente com o volume do PTV.

O tratamento dos tumores foi então planejado para entregar a dose de 5Gy à pelo menos 95% do volume do PTV. Manter o volume do PTV constante para todos os animais independentemente do volume individual de cada tumor conferiu alta reprodutibilidade ao *setup* de irradiação, permitindo que um único plano de tratamento fosse desenhado para tratar todos os 18 animais aplicando diferentes frações do mesmo tratamento a cada animal irradiado.

Para o planejamento do tratamento, um animal com tumor de volume representativo dentre a população estudada – diâmetro entre 6-8mm – foi posicionado dentro do aplicador braquiterápico para a aquisição de imagens de tomografia computadorizada (CT) no formato ‘dicom’ necessárias para o planejamento das irradiações. Três marcadores radiopacos foram posicionados no aplicador indicando o início, o centro e o fim da região do PTV e um marcador foi colocado no centro do tumor para guiar o posicionamento coincidente do volume alvo com a região central do PTV no aplicador. Em seguida, o hidrogel foi inserido preenchendo completamente o espaço entre o tumor e o aplicador. O sistema (animal mais aplicador) foi então alinhado com o laser de referência do *scanner* de CT utilizado e 182 imagens foram adquiridas com cortes de 1mm de espessura e resolução espacial de 0,5x0,5mm². Foi utilizado um *scanner Philips 256-slice iCT* para a aquisição das imagens. O

CT foi então transferido para o sistema de planejamento clínico Oncentra® para o planejamento das irradiações. A figura 35 ilustra o procedimento de aquisição das imagens de CT utilizadas no planejamento e as imagens ‘dicom’ dos cortes axiais e coronais do sistema (animal mais aplicador). As isodosos visualizadas no sistema Oncentra® durante o planejamento e o histograma dose-volume resultante do plano de irradiação são apresentadas na figura 36.

Figura 35 - Setup de aquisição das imagens de CT utilizadas no planejamento (a) e (b). Em (c) são apresentadas as imagens ‘dicom’ nos planos de referência anatômica.

Figura 36 – Plano para entrega de dose realizado no sistema de planejamento Oncentra®. Em (a) são apresentados os cateteres definidos manualmente; Em (b) são apresentados parcialmente histogramas de tempo de parada relativo da fonte em cada posição; Em (c) é apresentado o plano final do tratamento.

O DVH apresentado na figura 36 (c) evidencia o critério de cobertura de 95% do volume do PTV com a dose de 5Gy e, em conjunto com o mapa de isodoses, é possível observar que as áreas que recebem doses 5% acima ou abaixo da dose prescrita encontram-se na vizinhança da superfície do aplicador. Por esta razão, os tumores foram posicionados sempre no centro geométrico da área definida como PTV dentro do aplicador.

A fim de verificar a entrega da dose planejada, um filme radiocrômico foi posicionado no plano central do PTV dentro do aplicador circundado por um volume do mesmo hidrogel utilizado para uniformizar os volumes de tratamento e um teste dosimétrico foi realizado. Uma fração do tratamento planejado foi entregue ao filme, o qual foi analisado 24h após o teste dosimétrico. O filme irradiado foi analisado em termos da dose medida calculada pelo procedimento de calibração pixel-a-pixel do mapa de densidade ótica. A curva de calibração OD *versus* Dose utilizada foi obtida pelo procedimento descrito no anexo 2. A medida com o filme resultou no valor satisfatório de dose $D = (5,4 \pm 0,6) \text{ Gy}$.

Anestesia peritoneal de 100μL foi administrada em todos os animais antes da execução dos tratamentos, mantendo-os dormente durante todo o procedimento. A figura 37 ilustra o posicionamento e a execução do tratamento em um dos animais dentro da sala de Braquiterapia HDR. O *afterloader* HDR foi conectado ao aplicador por cateteres tipo 6F, normalmente utilizados para conduzir a fonte de Ir-192 ao aplicador H.A.M. quando plano. Os animais foram mantidos cobertos durante todo o procedimento braquiterápico para evitar hipotermia pós-anestesia.

Figura 37 – Setup de tratamento dos tumores xenográficos de próstata em *nude mice* com Braquiterapia HDR com Ir-192.

5.3. Medidas de Crescimento Tumoral

Os tumores irradiados foram acompanhados efetivamente por até 32 dias após a entrega da dose de tratamento. O grupo controle apresentou crescimento exponencial atingindo volume 4 vezes maior que volume inicial em 16 dias após o *dia 1* de tratamento. As figuras 38 (a) e (b) apresentam os resultados coletados em separado para os experimentos com o feixe de 6MV e Ir-192 comparando ambos os grupos de tratamento com nanopartículas gAuNR e pAuNR com os grupos controle para cada energia estudada.

Figuras 38 – Progressão de volume tumoral relativo dos grupos tratados com 6MV (a) e Braquiterapia HDR com Ir-192 (b).

O resultado observado mais evidente nesses experimentos é a diferença do padrão de resposta tumoral entre os grupos que receberam nanopartículas e os que não receberam. De maneira geral, para ambas as energias, os tumores que receberam gAuNR e pAuNR apresentam o comportamento de recrescimento tumoral após (pelo menos) duas semanas de tratamento. Os grupos controle, goserelin, goserelin → 5Gy e radiação apenas (ambos 6MV e Ir-192) não apresentaram o mesmo padrão de redução de volume seguida de recrescimento tumoral; As curvas de crescimento para os tumores destes grupos têm comportamento monótono crescente, apresentando, entretanto, diferenciais de primeira ordem bastante diferente entre si. Os grupos controle e goserelin têm crescimento acentuado, e pode-se observar que a dose de goserelin administrada (5nMols) parece induzir o aumento do volume médio tumoral ao longo de todos períodos de medida e causar inflamações aparentes na área ao redor dos tumores. Foi ainda observado o aparecimento de linfonodos aumentados na região do baixo abdômen dos animais desse grupo. Não foram encontrados contudo reportes prévios na literatura desses efeitos para administração de concentrações similares de goserelin em *nude mice*.

Quando comparados os grupos ainda sem nanopartículas irradiados com a mesma dose mas em diferentes condições de energia e taxa de dose, 6MV e Ir-192 HDR, a resposta dos tumores xenográficos de próstata apresentaram comportamentos diferenciados sendo, contudo, a dose de 5Gy aparentemente não efetiva em nenhuma das energias. Este contribui para embasar o sucesso do experimento porque evidencia que a dose de 5Gy entregue à todos os tumores não altera o comportamento de crescimento monótono, apenas causa atraso na progressão do tumor porque reduz o número de células viáveis na população irradiada. Dessa forma, os potenciais efeitos adicionais causados pelas nanopartículas presentes em ambos os grupos gAuNR e pAuNR, irradiados com ambas as energias, puderam ser facilmente observados.

Em ambas as energias, os grupos irradiados na presença de nanopartículas apresentaram redução de volume tumoral seguida de recrescimento. Os tumores dos grupos tratados com as nanopartículas bioconjugadas gAuNR apresentaram extrema redução tumoral, chegando a ter seu volume médio reduzido à frações menores que 1 vez o volume inicial. As curvas para os grupos tratados com gAuNR apresentaram mínimo 14 e 10 dias após as irradiações respectivamente com os feixes de 6MV e Ir-192, chegando a atingir as frações mínimas de $(0,75 \pm 0,04)$ e $(0,68 \pm 0,08)$ respectivamente para as mesmas energias.

Os grupos tratados com nanopartículas não bioespecíficas pAuNR atingiram volumes mínimos também em 14 e 10 dias após as irradiações para as energias de 6MV e Ir-192, mantendo contudo os volumes tumorais médios sempre múltiplos do volume inicial do grupo. Após um longo período de tempo ($t > 20 \text{ dias}$), as curvas de crescimento dos grupos tratados com pAuNR se tornam muito próximas e/ou coincidentes com as curvas dos grupos tratados somente com a dose de 5Gy de radiação com ambas as energias. Em ambos os casos a separação entre as curvas gAuNR e pAuNR se torna mais acentuado também após $t = 20 \text{ dias}$. Esse efeito pode ser explicado pela diferença de localização das nanopartículas no tecido tumoral.

Ambas as nanopartículas gAuNR e pAuNR foram administradas aos animais sistemicamente em mesma concentração e atingem o tumor via circulação sanguínea que o alimenta, ficando disponíveis na vascularização e também permeando o interstício do tecido tumoral. Entretanto, as nanopartículas bioconjugadas são retidas no espaço intercelular e rapidamente internalizadas porque interagem com os receptores nas membranas celulares (ver figura 20 na seção 3.4). Já as nanopartículas não bioespecíficas permeiam o tecido tumoral - provavelmente na mesma concentração - mas não são facilmente internalizadas, como apresentado nos resultados da seção 3.4. e 3.5.

Dessa forma, as nanopartículas sem bioconjugação específica são parcialmente retiradas do espaço intercelular e retornam a vascularização – processo biológico comumente referido em língua Inglesa como “*tumor leakage*” e utilizado para descrever a redução de acúmulo biológico de drogas não bioespecíficas em tecidos alvo com o passar do tempo. A diferença de retenção de nanopartículas bioconjugadas e não bioespecíficas em tumores alvo foi apresentada na literatura previamente e pode ser considerada fator contribuinte para as diferenças de efeito terapêutico observados em diversos estudos de radiosensibilização (Diagaradjane, Shetty et al. 2008).

Neste estudo, a análise quantitativa adotada para comparar os grupos irradiados com nanopartículas foi baseada na medida do parâmetro definido como retardo no crescimento tumoral (T_{delay}), comumente referido em língua Inglesa como “*tumor delay*” (Hall and Giaccia 2006). O parâmetro T_{delay} é definido neste caso como o período de tempo necessário para que os tumores de um mesmo grupo atinjam volume igual à 3 vezes o volume médio inicial, ou seja, $\bar{V}_{grupo}(T_{delay}) = 3 \cdot \bar{V}_{grupo}(dia\ 1)$ – referir à equação 10.

Nas irradiações com o feixe de 6MV, o grupo controle teve seu volume médio triplicado em $T_{delay} = 12\ dias$ e o grupo irradiado com 5Gy apresentou $T_{delay} = 18\ dias$. Já os grupos irradiados com 5Gy na presença de nanopartículas gAuNR e pAuNR apresentaram respectivamente T_{delay} iguais à 24 e 20 dias respectivamente, indicando que a presença de nanopartículas de ouro nesse caso retarda o crescimento tumoral em 50% e 16% quando, respectivamente, bioconjugadas ou não bioespecíficas, ambas comparadas com o tratamento dos tumores com 5Gy apenas.

A diferença na resposta tumoral aos tratamentos com gAuNR e pAuNR neste caso é atribuída principalmente à diferença na concentração de ouro acumulada nos tumores. Nanopartículas bioconjugadas apresentaram acúmulo 3 vezes maior em tumores do que as

nanopartículas não bioespecíficas - conforme discutido nos resultados de ICP-MS apresentados no estudo de biodistribuição. A concentração total de ouro disponível no microambiente tumoral combinada com a presença dos biomarcadores tumorais na superfície das nanopartículas, os quais são responsáveis por interações específicas na membrana celular, resultam portanto em concentrações efetivamente maiores internalizadas nas células alvo dos tumores tratados com gAuNR. Com uma maior concentração efetiva de nanopartículas internalizada nas células do alvo, a densidade de ionização no interior das células é consideravelmente reforçada durante as irradiações - conforme discutido nos estudos por Monte Carlo – o que, por sua vez, resulta em na radiosensibilização celular aumentada e consequente retardo no crescimento tumoral.

Nas irradiações com a fonte de Braquiterapia HDR de Ir-192, o grupo irradiado com 5Gy apresentou $T_{delay} = 15 \text{ dias}$ - maior que o grupo controle para o qual $T_{delay} = 12 \text{ dias}$. Os grupos tratados com nanopartículas gAuNR e pAuNR e irradiados com a dose de 5Gy apresentaram, respectivamente, $T_{delay} = 28 \text{ dias}$ e $T_{delay} = 18 \text{ dia}$, representando portanto retardo no crescimento tumoral 108% e 25% maior respectivamente quando comparados com o grupo irradiado com 5Gy sem nanopartículas.

A retenção aumentada das nanopartículas de ouro bioconjugadas nos tumores tratados com gAuNR também explica a diferença em T_{delay} observada entre os grupos gAuNR e pAuNR irradiados com a fonte de Ir-192 HDR. Isso porque a concentração final de ouro internalizada nas células do alvo modifica a densidade de ionização em ambas as energias, 6MV e Ir-192, conforme evidenciado nos estudos por simulação Monte Carlo apresentados na seção 2.

Adicionalmente, é possível notar que T_{delay} é maior para o grupo gAuNR tratado com 5Gy com a fonte de Ir-192 (T_{delay} 108% de aumento) do que para o grupo gAuNR tratado

com a mesma dose de radiação no feixe de 6MV (T_{delay} 50% maior). Este resultado expressa a sensibilidade do sistema biológico aos diferentes padrões de ionização formados no interior das células que contêm as nanopartículas no momento da irradiação. Como discutido na seção 2.4. (ver figuras 10 e 11), a presença das nanopartículas no citoplasma perturba o espectro de elétrons secundários de alcance intracelular e o padrão de densidade de ionização no interior da célula é diferente da energia do feixe primário. A resposta biológica, por sua vez, é desigual para diferentes padrões de densidade de ionização porque os mecanismos de dano no DNA são dependentes de ambos os parâmetros físicos a fluência total de partículas secundárias e o LET dos elétrons criados no meio (Jones, Krishnan et al. 2010, Leung, Chow et al. 2011).

Essencialmente, a probabilidade de ocorrência de quebras duplas e/ou simples nas fitas do DNA é dependente da habilidade dos elétrons de criar ionizações estáveis nas moléculas disponíveis ao longo de sua trajetória, o que acontece em maior número quando esses elétrons têm curto alcance e entregam uma fração maior de energia por interação. Conforme discutido nos estudos por simulação Monte Carlo descritos na seção 2, o espectro de elétrons secundários ejetados das nanopartículas de ouro varia com a energia do feixe primário incidente, sendo composto por aproximadamente 58% de fotoelétrons, 31% de elétrons *Auger* e raios-delta e 11% de elétrons Compton quando o feixe primário é a fonte de Ir-192; E sendo alterado para 21% de fotoelétrons, 46% de elétrons *Auger* e raios-delta e 33% de elétrons Compton quando o feixe de 6MV é então o feixe primário de irradiação. A principal diferença entre os espectros de elétrons secundários é dada pela fluência de fotoelétrons e o sistema biológico apresenta sensibilidade à esta variação como observado em ambos os experimentos *in vitro* e *in vivo*.

Na seção 4.4, é possível observar que as curvas clonogênicas das células tratadas com nanopartículas apresentam derivada de segunda ordem negativa crescente com o aumento da

energia do feixe primário, ou seja, conforme a energia do feixe cresce do Ir-192 para Cs-137 e 6MV, a probabilidade de dano letal aumenta nas células que contêm nanopartículas de ouro e, por consequência, a fração de sobrevivência, SF, é reduzida, pendendo a curva clonogênica. Este efeito é ainda mais fortemente expresso para nanopartículas bioconjugadas, gAuNR, do que para nanopartículas não bioespecíficas, pAuNR, uma vez que o *uptake* celular é maior para nanopartículas conjugadas com biomarcadores específicos.

O sistema *in vivo* também responde consonante à mudança do padrão de ionizações resultante da diferença na fluência de fotoelétrons ejetados das nanopartículas. O recrescimento tumoral é mais tardio em tumores tratados com nanopartículas (ambas gAuNR e pAuNR) porque a população de células viáveis no volume tumoral após irradiação com a fonte de Braquiterapia HDR de Ir-192 é menor do que após a irradiação com o feixe de 6MV. A diferença entre o uso de nanopartículas bioconjugadas e não bioespecíficas também aparece nas curvas de crescimento tumoral, quantitativamente expressa pelos T_{delay} aumentados nas curvas dos tumores tratados com gAuNR.

Além dos mecanismos de quebra no DNA, o stress oxidativo no citoplasma celular resultante da densidade de ionizações aumentada pela presença das nanopartículas causa danos letais em estruturas celulares, como por exemplo as mitocôndrias. Nas imagens de TEM apresentadas na figura 20 da seção 3.4. é possível observar que as nanopartículas bioconjugadas, gAuNR, são internalizadas por endofagocitose rapidamente - encontram-se infiltradas na membrana em 15min de incubação e dispostas em pequenos endofagossomos a partir de 2h, permanecendo espalhadas e estáveis por até 72h. Essa dinâmica de internalização das nanopartículas bioconjugadas propicia uma geometria favorável à criação esparsa de elétrons de alcance intracelular, contribuindo assim para o aumento do stress oxidativo global nas células alvo e, portanto, aumentando a probabilidade de dano letal em estruturas intracelulares.

Conclusão e Perspectivas

Os resultados da etapa *in vivo* confirmam as observações dos ensaios *in vitro* e ambas as etapas são conexas com os estudos teóricos realizados por simulação Monte Carlo. A coerência entre todas as etapas realizadas conduzem à proposição desse estudo a luz de sua principal conclusão: Nanopartículas de ouro bioconjugadas, gAuNR, apresentam ação terapêutica efetiva na radioterapia de câncer de próstata porque modulam o espectro efetivo de elétrons secundários no citoplasma celular causando aumento local da densidade de ionização e reforço da probabilidade de dano letal em células alvo.

O escopo do estudo da aplicação de nanopartículas de ouro em radioterapia de câncer é amplo e inclui uma diversidade de possibilidades variantes em cada um dos seus pilares fundamentais: a física de interação da radiação ionizante com nanopartículas de ouro, a bioengenharia de nanopartículas conjugadas com biomarcadores tumorais, a radiobiologia de células e tecidos marcados com nanopartículas bioconjugadas, e a investigação pré-clínica da resposta tumoral à esta nova estratégia terapêutica. Além das vertentes citadas abrangidas nesse trabalho, outros aspectos se destacam nas etapas de pesquisa básica e translacional da área, como o desenvolvimento de uma metodologia e instrumentação apropriada para a dosimetria em sistemas biológicos com nanopartículas e a obtenção de imagens radiológicas em sistemas vivos contendo nanopartículas de ouro. Todas essas possibilidades compõem o leque de perspectivas subsequente a este trabalho.

Referências

(ATCC), A. T. C. C. (2013). "www.atcc.org."

Aljarrah, k., A. Niemierko and S. Jiang (2007). "Clinical study to evaluate the dose calculation accuracy for IMRT lung patients." Medical Physics 34(6): 2425-2425.

Brun, E., L. Sanche and C. Sicard-Roselli (2009). "Parameters governing gold nanoparticle X-ray radiosensitization of DNA in solution." Colloids and Surfaces B-Biointerfaces 72(1): 128-134.

Butterworth, K. T., S. J. McMahon, F. J. Currell and K. M. Prise (2012). "Physical basis and biological mechanisms of gold nanoparticle radiosensitization." Nanoscale 4(16): 4830-4838.

Castillo, M. H., T. M. Button, R. Doerr, M. I. Homs, C. W. Pruett and J. I. Pearce (1988). "EFFECTS OF RADIOTHERAPY ON MANDIBULAR RECONSTRUCTION PLATES." American Journal of Surgery 156(4): 261-263.

Chien, C. C., C. H. Wang, T. E. Hua, P. Y. Tseng, T. Y. Yang, Y. Hwu, Y. J. Chen, K. H. Chung, J. H. Je and G. Margaritondo (2007). "Synchrotron x-ray synthesized gold nanoparticles for tumor therapy." Synchrotron Radiation Instrumentation, Pts 1 and 2 879: 1908-1911.

Chithrani, D. B., S. Jelveh, F. Jalali, M. van Prooijen, C. Allen, R. G. Bristow, R. P. Hill and D. A. Jaffray (2010). "Gold Nanoparticles as Radiation Sensitizers in Cancer Therapy." Radiation Research 173(6): 719-728.

Cho, S., O. Vassiliev, S. Jang and S. Krishnan (2006). "Modifications of megavoltage photon beams for gold nanoparticle-aided radiation therapy (GNRT): A Monte Carlo study." Medical Physics 33(6): 2121-2121.

Cho, S. H. (2005). "Estimation of tumor dose enhancement due to gold nanoparticles during typical radiation treatments: A preliminary Monte Carlo study." Medical Physics 32(6): 2162-2162.

Cho, S. H., B. L. Jones and S. Krishnan (2009). "The dosimetric feasibility of gold nanoparticle-aided radiation therapy (GNRT) via brachytherapy using low-energy gamma-/x-ray sources." Physics in Medicine and Biology 54(16): 4889-4905.

Cho, S. H. and S. Krishnan (2007). "Dosimetric feasibility of gold nanoparticle-aided radiation therapy (GNRT) using a Yb-169 source." International Journal of Radiation Oncology Biology Physics 69(3): S639-S639.

Datta, N. R., K. J. Das and S. Ayyagari (2000). "Biological integral dose: an alternate method for numerical scoring of rival plans." Medical dosimetry : official journal of the American Association of Medical Dosimetrists 25(3): 155-162.

De Gersem, W. R. T., S. Derycke, C. O. Colle, C. De Wagter and W. J. De Neve (1999). "Inhomogeneous target-dose distributions: A dimension more for optimization?" International Journal of Radiation Oncology Biology Physics 44(2): 461-468.

Delicati, L. (1934). "Treatment of rheumatoid arthritis with gold salts." Lancet 2: 896-897.

Diagaradjane, P., A. Shetty, J. C. Wang, A. M. Elliott, J. Schwartz, S. Shentu, H. C. Park, A. Deorukhkar, R. J. Stafford, S. H. Cho, J. W. Tunnell, J. D. Hazle and S. Krishnan (2008). "Modulation of in vivo tumor radiation response via gold nanoshell-mediated vascular-focused hyperthermia: Characterizing an integrated antihypoxic and localized vascular disrupting targeting strategy." Nano Letters 8(5): 1492-1500.

Dische, S. (1991). "A REVIEW OF HYPOXIC CELL RADIOSENSITIZATION." International Journal of Radiation Oncology Biology Physics 20(1): 147-152.

Drzymala, R. E., R. Mohan, L. Brewster, J. Chu, M. Goitein, W. Harms and M. Urie (1991). "DOSE-VOLUME HISTOGRAMS." International Journal of Radiation Oncology Biology Physics 21(1): 71-78.

Ellman, P., J. S. Lawrence and G. P. Thorold (1940). "Gold Therapy in Rheumatoid Arthritis." British medical journal 2(4157): 314-316.

Fowler, J. F. and J. Denekamp (1979). "HYPOXIC CELL RADIOSENSITIZATION IN EXPERIMENTAL-TUMORS." Pharmacology & Therapeutics 7(3): 413-444.

- Hainfeld, J. F., D. N. Slatkin and H. M. Smilowitz (2004). "The use of gold nanoparticles to enhance radiotherapy in mice." Physics in Medicine and Biology 49(18): N309-N315.
- Hall, E. J. and A. J. Giaccia (2006). Radiobiology for the Radiologist, Lippincott Williams & Wilkins.
- Harnden, P., M. D. Shelley, B. Coles, J. Staffurth and M. D. Mason (2007). "Should the Gleason grading system for prostate cancer be modified to account for high-grade tertiary components? A systematic review and meta-analysis." Lancet Oncology 8(5): 411-419.
- Hersperger, W. G. (1952). "GOLD THERAPY FOR RHEUMATOID ARTHRITIS - A CURRENT EVALUATION." Annals of Internal Medicine 36(2): 571-582.
- Hirn, S., M. Semmler-Behnke, C. Schleh, A. Wenk, J. Lipka, M. Schaffler, S. Takenaka, W. Moller, G. Schmid, U. Simon and W. G. Kreyling (2011). "Particle size-dependent and surface charge-dependent biodistribution of gold nanoparticles after intravenous administration." European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics 77(3): 407-416.
- Hobbie, R. K. (1997). Intermediate Physics for Medicine and Biology.
- Iyer, A. K., G. Khaled, J. Fang and H. Maeda (2006). "Exploiting the enhanced permeability and retention effect for tumor targeting." Drug Discovery Today 11(17-18): 812-818.
- Jabbari, K. (2011). "Review of fast monte carlo codes for dose calculation in radiation therapy treatment planning." Journal of medical signals and sensors 1(1): 73-86.
- Jachetti, E., S. Mazzoleni, M. Grioni, A. Ricupito, C. Brambillasca, A. Calcinotto, M. Freschi, A. Mondino, R. Galli and M. Bellone (2012). "Targeting cancer stem/initiating cells results in successful immunotherapy of autochthonous prostate tumors." Immunology 137: 54-54.
- Jain, S., D. G. Hirst and J. M. O'Sullivan (2012). "Gold nanoparticles as novel agents for cancer therapy." The British journal of radiology 85(1010): 101-113.
- Jin, C., L. Bai, H. Wu, Z. H. Teng, G. Z. Guo and J. Y. Chen (2008). "Cellular uptake and radiosensitization of SR-2508 loaded PLGA nanoparticles." Journal of Nanoparticle Research 10(6): 1045-1052.

Jones, B. L., S. Krishnan and S. H. Cho (2010). "Estimation of microscopic dose enhancement factor around gold nanoparticles by Monte Carlo calculations." Medical Physics 37(7): 3809-3816.

Khlebtsov, N. and L. Dykman (2011). "Biodistribution and toxicity of engineered gold nanoparticles: a review of in vitro and in vivo studies." Chemical Society Reviews 40(3): 1647-1671.

Kim, D., Y. Y. Jeong and S. Jon (2010). "A Drug-Loaded Aptamer-Gold Nanoparticle Bioconjugate for Combined CT Imaging and Therapy of Prostate Cancer." Acs Nano 4(7): 3689-3696.

Krishnan, S., P. Diagaradjane and S. H. Cho (2010). "Nanoparticle-mediated thermal therapy: Evolving strategies for prostate cancer therapy." International Journal of Hyperthermia 26(8): 775-789.

Lechtman, E., N. Chattopadhyay, Z. Cai, S. Mashouf, R. Reilly and J. P. Pignol (2011). "Implications on clinical scenario of gold nanoparticle radiosensitization in regards to photon energy, nanoparticle size, concentration and location." Physics in Medicine and Biology 56(15): 4631-4647.

Leung, M. K. K., J. C. L. Chow, B. D. Chithrani, M. J. G. Lee, B. Oms and D. A. Jaffray (2011). "Irradiation of gold nanoparticles by x-rays: Monte Carlo simulation of dose enhancements and the spatial properties of the secondary electrons production." Medical Physics 38(2): 624-631.

Lim, Z. Z. J., J. E. J. Li, C. T. Ng, L. Y. L. Yung and B. H. Bay (2011). "Gold nanoparticles in cancer therapy." Acta Pharmacologica Sinica 32(8): 983-990.

Lipka, J., M. Semmler-Behnke, R. A. Sperling, A. Wenk, S. Takenaka, C. Schleh, T. Kissel, W. J. Parak and W. G. Kreyline (2010). "Biodistribution of PEG-modified gold nanoparticles following intratracheal instillation and intravenous injection." Biomaterials 31(25): 6574-6581.

Liu, X., M. C. Lloyd, I. V. Fedorenko, P. Bapat, T. Zhukov and Q. Huo (2008). "Enhanced imaging and accelerated photothermalysis of A549 human lung cancer cells by gold nanospheres." Nanomedicine 3(5): 617-626.

Maeda, H., J. Wu, T. Sawa, Y. Matsumura and K. Hori (2000). "Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: a review." Journal of Controlled Release 65(1-2): 271-284.

Marques, T., M. Schwarcke, C. E. Garrido, V. Marangoni, V. Zucolotto, O. Baffa and P. Nicolucci (2011). Assesment of radiation dose enhancement due to gold nanoparticle by MRI gel dosimetry and Monte Carlo simulation. International Journal of Radiation Oncology Biology and Physics, ASTRO - American Society for Therapeutic Radiology and Oncology.

Marques, T., M. Schwarcke, C. E. Garrido, V. Zucolotto, O. Baffa and P. Nicolucci (2010). Gel Dosimetry Analysis of Gold Nanoparticle Application in Kilovoltage Radiation Therapy. 6th International Conference on 3D Dosimetry. Hilton Head Island - SC - USA, Journal of Physics: Conference Series. 250: 012084.

Matsudaira, H., A. M. Ueno and I. Furuno (1980). "IODINE CONTRAST-MEDIUM SENSITIZES CULTURED MAMMALIAN-CELLS TO X-RAYS BUT NOT TO GAMMA-RAYS." Radiation Research 84(1): 144-148.

Oldridge, E. E., D. Pellacani, A. T. Collins and N. J. Maitland (2012). "Prostate cancer stem cells: Are they androgen-responsive?" Molecular and Cellular Endocrinology 360(1-2): 14-24.

Oronsky, B. T., S. J. Knox and J. J. Scicinski (2012). "Is Nitric Oxide (NO) the Last Word in Radiosensitization? A Review." Translational Oncology 5(2): 66-71.

Pasciuti, K., G. Iaccarino, L. Strigari, T. Malatesta, M. Benassi, A. M. Di Nallo, A. Mirri, V. Pinzi and V. Landoni (2011). "TISSUE HETEROGENEITY IN IMRT DOSE CALCULATION FOR LUNG CANCER." Medical Dosimetry 36(2): 219-227.

Polf, J. C., L. F. Bronk, W. H. P. Driessen, W. Arap, R. Pasqualini and M. Gillin (2011). Enhanced relative biological effectiveness of proton radiotherapy in tumor cells with internalized gold nanoparticles, Applied Physics Letters. 98: 193702-193703.

Rossi, H. H. and M. Zaider (1996). Microdosimetry and its Applications, Springer.

Salvat, F. and J. M. Fernandez-Varea (2009). "Overview of physical interaction models for photon and electron transport used in Monte Carlo codes." Metrologia 46(2): S112-S138.

Salvat, F., J. M. Fernández-Varea and J. Sempau (2008). PENELOPE: a code system for Monte Carlo simulation of electron and photon transport, Universitat de Barcelona.

Smith, D. J. (2007). "Tissue Substitutes in Radiation Dosimetry and Measurement." International Commission on Radiation Units and Measurements Report 44.

Smith, V., L. Verhey and C. F. Serago (1998). "Comparison of radiosurgery treatment modalities based on complication and control probabilities." International Journal of Radiation Oncology Biology Physics 40(2): 507-513.

Stein, J., R. Mohan, X. H. Wang, T. Bortfeld, Q. W. Wu, K. Preiser, C. C. Ling and W. Schlegel (1997). "Number and orientations of beams in intensity-modulated radiation treatments." Medical Physics 24(2): 149-160.

Technology, N.-N. I. o. S. a. (2009). Physical Reference Data.

Thompson, H. E. (1974). "Gold toxicity in rheumatoid arthritis." Arizona medicine 31(12): 912-915.

Vanderstraeten, B., N. Reynaert, L. Paelinck, I. Madani, C. De Wagter, W. De Gersem, W. De Neve and H. Thierens (2006). "Accuracy of patient dose calculation for lung IMRT: A comparison of Monte Carlo, convolution/superposition, and pencil beam computations." Medical Physics 33(9): 3149-3158.

Zhang, S. X., J. F. Gao, T. A. Buchholz, Z. L. Wang, M. R. Salehpour, R. A. Drezek and T. K. Yu (2009). "Quantifying tumor-selective radiation dose enhancements using gold nanoparticles: a monte carlo simulation study." Biomedical Microdevices 11(4): 925-933.

Zhang, X. J., J. Z. Xing, J. Chen, L. Ko, J. Amanie, S. Gulavita, N. Pervez, D. Yee, R. Moore and W. Roa (2008). "Enhanced radiation sensitivity in prostate cancer by gold-nanoparticles." Clinical and Investigative Medicine 31(3): E160-E167.

Zheng, Y., D. J. Hunting, P. Ayotte and L. Sanche (2008). "Radiosensitization of DNA by gold nanoparticles irradiated with high-energy electrons." Radiation Research 169(1): 19-27.

Zheng, Y. and L. Sanche (2009). "Gold Nanoparticles Enhance DNA Damage Induced by Anti-cancer Drugs and Radiation." Radiation Research 172(1): 114-119.

ANEXOS

ANEXO 1

Descrição dos procedimentos para aquisição das imagens de TEM das células

“Samples were fixed with a solution containing 3% glutaraldehyde plus 2% paraformaldehyde in 0.1 M cacodylate buffer, pH 7.3, for 1 hour. After fixation, the samples were washed and treated with 0.1% Millipore-filtered cacodylate buffered tannic acid, postfixed with 1% buffered osmium tetroxide for 30 min, and stained en bloc with 1% Millipore-filtered uranyl acetate. The samples were dehydrated in increasing concentrations of ethanol, infiltrated, and embedded in LX-112 medium. The samples were polymerized in a 60 C oven for 2 days. Ultrathin sections were cut in a Leica Ultracut microtome (Leica, Deerfield, IL), stained with uranyl acetate and lead citrate in a Leica EM Stainer, and examined in a JEM 1010 transmission electron microscope (JEOL, USA, Inc., Peabody, MA) at an accelerating voltage of 80 kV. Digital images were obtained using AMT Imaging System (Advanced Microscopy Techniques Corp, Danvers, MA).”

ANEXO 2

Ilustração da dosimetria de calibração do filme radiocrômico EBT2 para a fonte de Braquiterapia HDR de Ir-192.

(c)

Figura 39 – Ilustração dos procedimentos e cálculos seguidos para a calibração do filme EBT2 para dosimetria da fonte de Braquiterapia HDR de Ir-192.

ANEXO 3

INFORMAÇÕES PARA O CÁLCULO DA TAXA DE DOSE EFETIVA DO CAMPO DE RADIAÇÃO:

- Campo quadrado equivalente ao campo circular de diâmetro 2,5cm: $2,2 \times 2,2 \text{ cm}^2$
- Calibração do feixe (d_{max} , $10 \times 10 \text{ cm}^2$, $\text{SSD}_{100\text{cm}} = 1,000 \text{ cGy/ms}$)
- $S_c(10 \times 10 \text{ cm}^2) = 1,023$
- $\text{TMR}_{\text{feixe, circular}(2,5 \text{ cm})} = \text{TMR}_{\text{feixe, quadrado}(2,2 \text{ cm})} = 0,950$
- $\text{OCR}_{\text{feixe, quadrado}(2,2 \text{ cm})} = 1,030$

CONCLUSIONS

- Taxa de dose estimada: 1.000 cGy/mu
- Taxa de dose medida em 08-Nov-2012: 0.982 cGy/mu ✓