UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Estudo dos efeitos da terapia fotodinâmica na progressão tumoral e
em modelos celulares tridimensionais**

Paula Aboud Barbugli

Ribeirão Preto
2010

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Estudo dos efeitos da terapia fotodinâmica na progressão tumoral e
em modelos celulares tridimensionais**

Tese de Doutorado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas para obtenção do Título de
Doutor em Ciências Farmacêuticas

Área de Concentração: Medicamentos e
Cosméticos

Orientada: Paula Aboud Barbugli

Orientador: Antonio Claudio Tedesco

Ribeirão Preto
2010

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

BARBUGLI, PAULA A.

Estudo dos efeitos da terapia fotodinâmica na progressão tumoral e em modelos celulares tridimensionais 107 p.; 30cm.

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Medicamentos e Cosméticos

Orientador: Tedesco, Antonio Claudio

1. Melanoma. 2. Terapia Fotodinâmica.
3. Modelos celulares tridimensionais.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Paula Aboud Barbugli

Estudo dos efeitos da terapia fotodinâmica na progressão tumoral e em modelos celulares tridimensionais

Tese de Doutorado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas para obtenção do Título de
Doutor em Ciências Farmacêuticas

Área de Concentração: Medicamentos e
Cosméticos

Orientador: Antonio Claudio Tedesco

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Agradecimentos

Ao meu orientador, Prof. Dr. Antonio Claudio Tedesco, pela oportunidade de fazer parte de seu grupo de pesquisa, pela confiança depositada e pela orientação firme e segura durante o desenvolvimento deste trabalho

A todos os meus colegas de laboratório e aos funcionários do Departamento de Química da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras, pela ajuda, apoio e incentivo, em especial à Daniela e Patrícia pelas horas de trabalho e também de descontração

À Profa. Dra. Enilza Maria Espreafico, pelo grande incentivo científico, ensinamentos adquiridos e por ter gentilmente cedido material e espaço em seu laboratório de pesquisa para a realização deste trabalho

Aos meus colegas de trabalho do Departamento de Biologia Celular e Molecular, sobretudo ao Cleidson de Pádua Alves pelo grande esforço por nós aplicado durante o desenvolvimento dos modelos de cultura celular tridimensional e também pelas horas gastas comigo no microscópio confocal

Às funcionárias da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto FMRP-USP, Silmara Reis Banzi, pela pronta ajuda e grande colaboração no desenvolvimento de diversas técnicas fundamentais para o meu trabalho, também à Izilda Robrigues Violante e Vani Maria Alves Correia pela ajuda nos experimentos de histologia

À Dra. Maria Aparecida Fontes e funcionários do Laboratório de Transfecção Gênica do Hemocentro de Ribeirão Preto

Aos professores e funcionários da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto FCFRP-USP

Aos meus amados pais, minha mãe Maria Hayde; e ao meu pai Aldo (*in memoriam*), à minha querida amiga Laura, aos meus queridos irmãos Renata e Aldo e à minha sobrinha Beatriz e minha cunhada Bernadete, pela grande ajuda nos momentos mais difíceis e também pela grande felicidade que é fazer parte desta família

Ao meu namorado, Sergio, por ser tão especial e fazer parte da minha vida com muito amor, e à toda sua família pelo carinho e amizade

Às minhas grandes amigas de todas as horas Aline, Fernanda, Lucila e Mariana por todos os momentos que passamos juntas

OBRIGADA!!!

RESUMO

BARBUGLI, P. A. **Estudo dos efeitos da terapia fotodinâmica na progressão tumoral e em modelos celulares tridimensionais**. 2010. 107f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.

O melanoma maligno é o tipo de câncer de pele com pior prognóstico, devido à sua elevada probabilidade de causar metástases. Atualmente existem poucos tratamentos efetivos para o tratamento do melanoma, sendo que a sobrevivência de pacientes que apresentam metástases é muito baixa, em torno de 8 meses, sendo que as taxas de cura nestas condições não ultrapassam 1%. A terapia fotodinâmica (TFD) é uma modalidade terapêutica seletiva e não invasiva, que vem demonstrando excelentes resultados clínicos no tratamento de tumores de pele do tipo não melanoma, como carcinoma espinoso e basocelular. O trabalho em questão aborda a efetividade da TFD, em linhagens humanas de melanoma em diferentes fases de progressão da neoplasia, desde os estágios iniciais da doença (células de crescimento radial - RGP), até a fase metastática, não só em cultura de células em monocamada (2D), como também através do desenvolvimento de modelos celulares tridimensionais (3D), mistos ou não com fibroblastos humanos, cuja proposta é mimetizar *in vitro* as reais condições de tumorigênese existentes *in vivo*, tais como o contato célula-célula entre as linhagens neoplásicas e os fibroblastos da derme, o contato célula-matriz extracelular (matriz de colágeno), além de propiciar o crescimento tumoral de forma livre de adesão ao substrato, o que é característico dos processos malignos. Em uma primeira etapa, o fármaco fotossensível Ftalocianina de Cloroalumínio (AIClPc) foi escolhido como agente fotossensibilizante utilizado nos estudos, sendo este encapsulado em vesículas lipossomais, propiciando a solubilidade do composto em meio aquoso, otimizando sua entrada nas células. As propriedades fotoquímicas e fotofísicas da formulação lipossomal foram avaliadas, garantindo que a encapsulação não interfere na capacidade fotodinâmica do agente. Como segunda etapa, a formulação foi testada nos modelos celulares 2D e 3D acima descritos, realizando-se não só estudos de toxicidade, mas também ensaios de morte celular (apoptose *versus* necrose), incorporação intracelular do fármaco (uptake), de forma quantitativa e também qualitativa, demonstrando a localização intracelular preferencial do fármaco. Tanto em culturas 2D como em culturas 3D, a formulação AIClPc lipossomal apresentou atividade farmacológica superior aos sistemas aplicáveis em TFD, já descritos na literatura, o que abre caminhos para a realização de estudos *in vivo* em animais com boas perspectivas de resposta ao tratamento do melanoma humano, com possibilidades de futuras aplicações clínicas.

Palavras-chave: melanoma humano, terapia fotodinâmica, cloroalumínio ftalocianina lipossomal, modelos celulares tridimensionais

ABSTRACT

BARBUGLI, P. A. **Study of the effects of photodynamic therapy on tumor progression and in three-dimensional cellular models.** 2010. 107f. Thesis (Doctoral). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.

Melanoma is the type of skin cancer with poor prognosis due to its high probability of suffering metastases. Currently there are few effective treatments for the this, and the survival of patients with metastases is very low, around 8 months, with cure rates of these conditions do not exceed 1%. Photodynamic therapy (PDT) is a therapeutic modality selective and non-invasive, it has shown excellent clinical results in the treatment of non-melanoma skin cancers such as squamous and basal cell carcinoma. This work discusses the effectiveness of PDT in human melanoma cell lines in different stages of tumor progression, from the early stages of the disease (radial growth phase cells - RGP), to the metastatic stage, not only in cell culture in monolayer (2D), but also through the development of three-dimensional cellular models (3D), mixed or not with human fibroblasts, which aims to mimic *in vitro*, the real conditions existing in *in vivo* tumorigenesis, such as cell-cell contact between cancer cell lines and fibroblasts of the dermis, the contact cell-extracellular matrix (collagen matrix), as well as futher the growth of the tumor cells free from the substrate adhesion, which is characteristic of malignant processes. In a first step, the photosensitizer Chloroaluminum Phthalocyanine (AlClPc) was chosen to be used in the studies, which is encapsulated in liposomal vesicles, allowing the solubility of the drug in water, optimizing its intracellular incorporation. Furthermore, the photochemical and photophysical properties of the liposomal formulation were evaluated, ensuring that the encapsulation does not interfere with its photodynamic activity. As a second step, the formulation was tested in cellular models 2D and 3D above described, performing not only toxicity, but assays of cell death (apoptosis *versus* necrosis), intracellular drug incorporation (uptake), both quantitative and also qualitative, showing the main intracellular localization of the photosensitizer. Both in 2D cultures and 3D cultures, the liposomal AlClPc showed better pharmacological activity than the current applied PDT protocols, already described in the literature, and this is an open field for *in vivo* studies with animals with good prospects for responses to the treatment of human melanoma with possibilities for future clinical applications.

Keywords: human melanoma, photodynamic therapy, liposomal chloroaluminum phthalocyanine, three-dimensional cellular models

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema representativo das camadas que constituem a pele: epiderme, derme e hipoderme.	01
Figura 2. Corte histológico de pele humana.	02
Figura 3. Corte histológico de neoplasia de pele do tipo melanoma.	04
Figura 4. Esquema representativo da Terapia Fotodinâmica.	06
Figura 5. Diagrama de Jablonski para o processo de fotoativação.	07
Figura 6. Mecanismos da TFD: produção de EROs, efeito antivasculare e ativação da resposta imune.	08
Figura 7. Estrutura de uma ftalocianina, onde M é o metal central (Al, Zn, Si) e R representa possíveis substituintes (SO ₃ H, S ₂ , F, COOH).	10
Figura 8. Esquema representativo de um lipossoma.	11
Figura 9. Reconstrução de um carcinoma de esôfago humano.	14
Figura 10. Cultura de fibroblastos de derme humana, CCD27SK.	20
Figura 11. Cultura de células derivadas de melanoma humano em diferentes fases de progressão tumoral.	23
Figura 12. Preparo das matrizes 3D.	25
Figura 13. Cultura de células metastáticas de melanoma humano WM1617 em soft agar após 12 dias de cultivo.	26
Figura 14. Células de melanoma humano sendo irradiadas com o sistema laser de diodo em 674 nm após o tratamento com AICIPc lipossomal.	27
Figura 15. (A) Curva de decaimento e ajuste exponencial para a AICIPc lipossomal 2,50 µg.mL ⁻¹ . (B) Resíduo médio da medida (desvio padrão: CHISQ = 1,206).	34
Figura 16. Células WM1552C marcadas com anexina V conjugada com Alexa 568.	47
Figura 17. Células WM278 marcadas com anexina V conjugada com Alexa 568.	48
Figura 18. Células WM1617 mantidas no escuro. Objetiva 40X	49
Figura 19. Células WM1617 tratadas com AICIPc lipossomal 0,29 µg.mL ⁻¹ e irradiadas com 70 mJ.cm ⁻²	50

Figura 20. Células WM1617 tratadas com AICIPc lipossomal $0,29 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e irradiadas com 700 mJ.cm^{-2}	51
Figura 21. Marcação com iodeto de propídeo (PI). Células WM1617 tratadas com AICIPc lipossomal $0,29 \mu\text{g.mL}^{-1}$	52
Figura 22. Células WM1552C ; núcleo corado com DAPI (em azul) e na segunda coluna: AICIPc intracelular (vermelho), em verde marcação citoplasmática com Cell Tracker CFSE; em (S) sobreposição das imagens.	55
Figura 23. Células WM1552C ; núcleo corado com DAPI (em azul) e na segunda coluna: AICIPc intracelular (vermelho), em verde marcação citoplasmática com Cell Tracker CFSE; em (S) sobreposição das imagens.	56
Figura 24. Células WM1552C ; detalhe sobreposição das imagens.	57
Figura 25. Células WM1552C ; núcleo corado com DAPI (em azul) e na segunda coluna: AICIPc intracelular (vermelho), em verde marcação citoplasmática com Cell Tracker CFSE; em (S) sobreposição das imagens.	57
Figura 26. Células WM278 ; núcleo corado com DAPI (em azul) e na segunda coluna: AICIPc intracelular (vermelho).	59
Figura 27. Células WM278 após 2 h de incubação com AICIPc lipossomal.	60
Figura 28. Células WM1617 após 1 h de incubação com AICIPc lipossomal.	62
Figura 29. Células WM1617 após 2 h de incubação com AICIPc lipossomal.	63
Figura 30. Células WM1617 após 3 h de incubação com AICIPc lipossomal. ...	64
Figura 31. Ensaio de transfecção.	65
Figura 32. Transdução de células CCD27SK com lentivírus.	66
Figura 33. Formação de colônias de células WM1617 em matriz de soft agar após 2 dias de tratamento (5° dia de cultivo).	68
Figura 34. Formação de colônias de células WM1617 em matriz de soft agar após 12 dias de tratamento (15° dia de cultivo).	69
Figura 35. Formação de colônias de células WM1617 em matriz de soft agar após 28 dias de tratamento (30° dia de cultivo).	70
Figura 36. Culturas mistas de fibroblastos (setas pretas) e células WM1617 em matriz de colágeno 3D. 1 dia após o tratamento.	73
Figura 37. Culturas mistas de fibroblastos e células WM1617 (setas vermelhas) em matriz de colágeno 3D. 7 dias após o tratamento	74
Figura 38. Culturas mistas de fibroblastos e células WM1617 (setas vermelhas) em matriz de colágeno 3D. 14 dias após o tratamento.	75

Figura 39. Corte histológico de culturas 3D mistas de fibroblastos (setas pretas) e células de melanoma humano **WM1617** (setas vermelhas).
Objetiva 10X. Coloração hematoxilina-eosina. 77

Figura 40. Corte histológico de culturas 3D mistas de fibroblastos (setas pretas) e células de melanoma humano **WM1617** (setas vermelhas).
Objetiva 40X. Coloração hematoxilina-eosina. 78

Figura 41. Corte histológico de culturas 3D mistas de fibroblastos (setas pretas) e células de melanoma humano **WM1617** (setas vermelhas).
Objetiva 40X. Coloração hematoxilina-eosina. 79

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Espectro de absorção da AICIPc incorporada em lipossomas (—) e da AICIPc em etanol usado como referência (.....).	31
Gráfico 2. Espectro de emissão de fluorescência da AICIPc incorporada em lipossomas (—) e da AICIPc em etanol usado como referência (.....).	32
Gráfico 3. Espectro de absorção do transiente obtido através do método de fotólise por pulso de laser da formulação AICIPc lipossomal ($2,50 \mu\text{g.mL}^{-1}$), $0,21 \mu\text{s}$ após excitação por pulso de laser em 355 nm, mostrando a absorção máxima do triplete centrada no comprimento de onda de 480 nm e o fotobranqueamento do estado fundamental centrado a aproximadamente 670 nm.	36
Gráfico 4. Porcentagem de células vivas após incubação com formulação lipossomal “vazia”.	39
Gráfico 5. Células de Melanoma humano. Porcentagem de células vivas tratadas com AICIPc lipossomal $1,16 \mu\text{g.mL}^{-1}$ no escuro.	40
Gráfico 6. Porcentagem de células vivas tratadas com AICIPc lipossomal $0,58 \mu\text{g.mL}^{-1}$ no escuro.	41
Gráfico 7. Porcentagem de células vivas, WM1552C , após 1 h de incubação com AICIPc lipossomal $0,29 \mu\text{g.mL}^{-1}$ no escuro.	42
Gráfico 8. Porcentagem de células vivas, WM278 , após 2 h de incubação com AICIPc lipossomal $0,29 \mu\text{g.mL}^{-1}$ no escuro.	43
Gráfico 9. Porcentagem de células vivas, WM1617 , após 3 h de incubação com AICIPc lipossomal $0,29 \mu\text{g.mL}^{-1}$ no escuro.	43
Gráfico 10. Porcentagem de células vivas, WM1552C , após 1 h de incubação com AICIPc lipossomal $0,29 \mu\text{g.mL}^{-1}$, seguido de irradiação com laser em diferentes doses de energia.	45
Gráfico 11. Porcentagem de células vivas, WM278 , após 2 h de incubação com AICIPc lipossomal $0,29 \mu\text{g.mL}^{-1}$, seguido de irradiação com laser em diferentes doses de energia.	45
Gráfico 12. Porcentagem de células vivas, WM1617 , após 3 h de incubação com AICIPc lipossomal $0,29 \mu\text{g.mL}^{-1}$, seguido de irradiação com laser em diferentes doses de energia.	46
Gráfico 13. Quantidade de AICIPc intracelular em ng, WM1552C .	54
Gráfico 14. Quantidade de AICIPc intracelular em ng, WM278 .	58
Gráfico 15. Quantidade de AICIPc intracelular em ng, WM1617 .	61

LISTA DE TABELAS

Tabela I – Características de origem das linhagens humanas.	22
Tabela II – Tamanho (nm), polidispersividade (Pdl) e potencial zeta (ζ) das formulações.	30
Tabela III – Valores do Φ_F para a ZnPc em etanol e para a AlClPc lipossomal. ...	33
Tabela IV – Tempos de vida do singleto (τ) em ns e amplitude relativa (A) para a AlClPc lipossomal.	35
Tabela V – Valores de rendimento quântico de produção de oxigênio singleto 1O_2 (Φ_Δ).	37

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ε	Coeficiente de absorvidade molar
λ	Comprimento de onda
ϕ_{Δ}	Rendimento quântico de oxigênio singlete
χ^2	Chi-quadrado
ϕ_F	Rendimento quântico de fluorescência
$\cdot\text{O}_2$	Ânion superóxido
$^1\text{O}_2$	Oxigênio singlete
2D	Bidimensional
3D	Tridimensional
$^3\text{O}_2$	Oxigênio molecular
AlClPc	Cloroalumínio Ftalocianina
AlClPcS ₂	Ftalocianina de cloroalumínio dissulfonada
AlSPc	Ftalocianina de cloroalumínio sulfonada
BPD-MA	Derivado monoácido de benzoporfirina
CaCl ₂	Cloreto de sódio
C _{AlClPc}	Concentração de cloroalumínio ftalocianina
C _{E6}	Clorina E6
C _{ex}	Concentração em condições experimentais
CFSE	Carboxyfluorescein succinimidyl Ester
C _{inicial}	Concentração inicial
DAPI	4,6-diamidino-2-phenylindole
DMBA	Dimetilamino-4-benzaldeído
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Médium
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucléico
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ERRO	Espécies Reativas do Oxigênio
FDA	Food and Drug Administration

GFP	Green Fluorescent Protein (proteína verde fluorescente)
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
He-Ne	Hélio-Neodímio
HEPES	Ácido N-2-Hidroxietilpiperazina-N'-2'-Etanossulfônico
HpD	Derivado de hematoporfirina
I	Intensidade de emissão de fluorescência
INCA	Instituto Nacional do Câncer
KCl	Cloreto de potássio
KH ₂ PO ₄	Fosfato de potássio monobásico
MHz	MegaHertz
mJ	MiliJoule
τ_{Δ}	Tempo de vida singlete
τ_T	Tempo de vida triplete
D.O	Densidade óptica
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)2,5-difeniltetrazolio brometo
mV	MiliVolts
Na ₂ PO ₄	Fosfato de sódio dibásico
NaCl	Cloreto de sódio
OH•	Radical hidroxila
OMS	Organização Mundial da Saúde
PARP	Poliadenosilribose polimerase
PBS	Saline phosphate buffer (tampão salino fosfato)
Pc4	Ftalocianina tetrasubstituída
PdI	Índice de polidispersividade
PI	Iodeto de propídeo
RGP	Radial growth phase (fase de crescimento radial)
S ₀	Estado fundamental
S ₁	Primeiro estado excitado singlete
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SFB	Soro fetal bovino

Sn	Estado singlete excitado
T máx	Tempo máximo de incubação
T ₁	Primeiro estado excitado triplete
TDPH	Trimetilamino-difenilhexatrieno
TFD	Terapia Fotodinâmica
VGP	Vertical growth phase (fase de crescimento vertical)
M	Metastatic (metastática)
Z	Potencial zeta

SUMÁRIO

Resumo	i
Abstract.....	ii
Lista de figuras.....	iii
Lista de gráficos.....	vi
Lista de tabelas	vii
Lista de abreviaturas e siglas	viii
I. INTRODUÇÃO	1
1. Anatomia e fisiologia da pele.....	1
2. O melanoma humano	3
2.1. Patogenia	3
2.2. Etiologia e epidemiologia do melanoma cutâneo	4
3. A Terapia Fotodinâmica	5
3.1. Mecanismos de ação da TFD.....	6
4. Fármacos Fotossensíveis: Ftalocianinas.....	9
5. Sistemas de liberação de fármacos: Lipossomas	11
6. Engenharia tecidual e o modelo celular tridimensional	12
II. OBJETIVOS.....	15
III. MATERIAIS E MÉTODOS	16
1. Preparo de lipossomas contendo AICIPc	16
2. Determinação do tamanho, índice de polidispersão e potencial de superfície (Zeta) da formulação lipossomal.....	16
3. Caracterização das propriedades fotoquímicas de fotofísicas da AICIPc lipossomal	17
3.1. Estudos da AICIPc lipossomal no estado estacionário	17
3.2. Rendimento quântico de fluorescência (ϕ_F) da AICIPc lipossomal	17
3.3. Tempo de vida do singlete	18
3.4. Tempo de vida do tripleto	18
3.5. Rendimento quântico de oxigênio singlete (ϕ_Δ) da AICIPc lipossomal.....	19
4. Cultura de fibroblastos CCD27SK	20
5. Transdução da linhagem CCD27SK com lentivírus	21
6. Cultura de células de melanoma humano	21
7. Extração e quantificação de colágeno tipo I	24
7.1. Extração de colágeno tipo I	24
7.2. Dosagem de colágeno tipo I	24
8. Construção das culturas celulares tridimensionais (3D).....	25
8.1. Preparo das culturas tridimensionais (3D) mistas em matriz de colágeno ...	25
8.2. Estabelecimento de colônias de células ancoragem-independente	25
9. Tratamento com AICIPc lipossomal.....	26
10. Ensaio de viabilidade celular – MTT.....	27
11. Marcação com anexina V e iodeto de propídeo	28
12. Quantificação de AICIPc intracelular (uptake)	28
12.1. Quantificação de AICIPc intracelular por emissão de fluorescência	28
12.2. Detecção por microscopia confocal.....	29
13. Análise histológica.....	29

14. Análise estatística	29
IV. RESULTADOS	30
1. Desenvolvimento da formulação lipossomal contendo AICIPc	30
2. Determinação do tamanho, estabilidade e homogeneidade da formulação lipossomal	30
3. Caracterização, no estado estacionário, das propriedades fotoquímicas e fotofísicas da AICIPc lipossomal.	30
4. Determinação do rendimento quântico de fluorescência (ϕ_F) da AICIPc lipossomal	32
5. Medidas de fluorescência resolvida no tempo da AICIPc lipossomal: determinação do tempo de vida do singlete.	33
6. Caracterização espectroscópica e determinação dos estados excitados e tempo de vida do tripleto.	35
7. Determinação do rendimento quântico de produção de oxigênio singlete (ϕ_Δ) pela AICIPc lipossomal	37
8. Ensaios de citotoxicidade	37
8.1. Citotoxicidade da formulação lipossomal	39
8.2. Citotoxicidade da AICIPc lipossomal no escuro	40
8.3. Citotoxicidade da AICIPc lipossomal após irradiação com laser	44
9. Avaliação da morte celular induzida pelo tratamento	46
10. Quantificação da AICIPc intracelular (uptake)	53
10.1. Resultados obtidos com as células WM1552	53
10.2. Resultados obtidos com as células WM278	58
10.3. Resultados obtidos com as células WM1617	61
11. Transdução de fibroblastos CCD27SK com vetor lentiviral	65
12. Potencial anti-metastático do sistema AICIPc lipossomal em TFD	67
13. Avaliação da resposta terapêutica do sistema AICIPc lipossomal em TFD em culturas 3D mistas em matriz de colágeno	71
V. DISCUSSÃO	80
VI. CONCLUSÕES	91
VII. REFERÊNCIAS	92
APÊNDICES	105

I – INTRODUÇÃO

1. Anatomia e fisiologia da pele

A pele é um órgão integrante do sistema tegumentar que tem por principais funções a proteção dos tecidos subjacentes, a regulação da temperatura e a reserva de nutrientes. A pele representa, aproximadamente, 16% do total do peso corporal e é constituída por três camadas histológicas superpostas: a epiderme (camada mais externa), a derme e a hipoderme, além dos anexos como os pêlos, glândulas sudoríparas e sebáceas. (Figura 1) (BOUWSTRA; PONEC, 2006; WICKETT; VISSCHER, 2006).

WordPress.com

Figura 1. Esquema representativo das camadas que constituem a pele: epiderme, derme e hipoderme.

A epiderme é constituída por um epitélio estratificado pavimentoso, formado basicamente por queratinócitos, responsáveis pela produção da proteína queratina, que confere proteção, limita a perda de água pelo organismo, reduz a absorção de compostos químicos e previne infecções. Na epiderme também existem os melanócitos, que são as células produtoras de melanina e algumas células do

sistema imune como as células de Langerhans. A origem de multiplicação celular na epiderme ocorre na camada basal, que é a mais profunda e está em contato direto com a derme. As células vão se diferenciando ao longo das camadas espinhosa, granulosa e lúcida, até atingirem por fim o estrato córneo, que é constituído de corneócitos e grande quantidade de filamentos, principalmente queratina. A junção entre a epiderme e a derme tem forma de papilas, que permitem uma maior superfície de contato entre as camadas e maior resistência ao epitélio (Figura 2).

A derme é um tecido conjuntivo que sustenta a epiderme sendo constituída por elementos fibrilares, como o colágeno, a elastina e outros elementos da matriz extracelular, como proteínas estruturais, glicosaminoglicanos, íons e água de solvatação. Os fibroblastos estão alojados na derme e são responsáveis pela produção de componentes da matriz extracelular. A derme é subdividida em duas camadas: a camada papilar, já citada acima, formada por tecido conjuntivo frouxo; e a camada reticular, constituída por tecido conjuntivo denso não modelado, onde predominam as fibras de colágeno (Figura 2) (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2009).

Figura 2. Corte histológico de pele humana. Em destaque as células e camadas que constituem a epiderme e a derme. Coloração hematoxilina-eosina.

2. O melanoma humano

2.1. Patogenia

Células em tecidos normais mantêm um balanço homeostático ao longo de sua existência, no qual crescimento e diferenciação são dinamicamente controlados por morte celular. Para o estabelecimento e manutenção da função e estrutura de um órgão normal, as células devem permanecer em suas localizações pré-determinadas. O balanço entre as células é alterado durante uma lesão celular ou desenvolvimento tumoral. (MERIC; RIXE, 2003).

O câncer de pele pode ser dividido em dois tipos, dependendo do fenótipo celular do qual se originou: o tipo **não melanoma**, que compreende os carcinomas basocelular e espinocelular, é originado de células epiteliais, geralmente os queratinócitos; e o tipo **melanoma**, originado dos melanócitos que são células responsáveis pela produção do pigmento melanina. Os melanócitos residem sobre a membrana basal, a qual separa a epiderme da derme no tecido cutâneo normal e através de várias proteínas presentes na membrana plasmática, aderem-se aos queratinócitos, os quais controlam o seu crescimento e fenótipo. Quando os melanócitos deixam de produzir moléculas de superfície responsáveis pela adesão tecido-específica, livram-se do controle exercido pelos queratinócitos, ocorrendo então a formação de um **nevo** (mancha pigmentada na pele), que consiste em um aglomerado de células estruturalmente normais. Durante a progressão tumoral, ocorre a produção de outras proteínas de superfície celular que possibilitam a interação do melanócito com outros tipos celulares como os fibroblastos e células endoteliais (MEIER et al., 1998).

O estabelecimento do melanoma maligno é um processo que envolve várias fases. O modelo descrito por Herlyn, descreve a progressão do melanoma segundo suas características clínicas e histopatológicas. Na pele normal, os melanócitos localizam-se na camada basal da epiderme, mantendo contato apenas com queratinócitos. O primeiro estágio da neoplasia é o estabelecimento de um **nevo displásico**, que apresenta uma estrutura atípica. A fase de crescimento radial da neoplasia (RGP) é considerada a primeira fase maligna, com as células apresentando mais alterações estruturais; estas permanecem, geralmente, confinadas à epiderme, crescendo lateralmente, apresentando raras células que podem atingir a derme, sem, entretanto terem nenhuma competência para a

metástase. Na fase de crescimento vertical (VGP), as células são capazes de romper a camada basal da epiderme e invadir a derme ativamente (Figuras 3, setas vermelhas). Estas células já apresentam capacidade metastática, podendo chegar até os vasos sanguíneos e disseminar a doença para outros órgãos, formando as metástases em órgãos como pulmão, fígado e cérebro. (HERLYN et. al., 1985).

Figura 3. Corte histológico de neoplasia de pele do tipo melanoma. Fase de crescimento vertical em que as células neoplásicas invadem a derme (em destaque seta vermelha). Coloração hematoxilina-eosina.

2.2. Etiologia e epidemiologia do melanoma cutâneo

A etiologia das neoplasias cutâneas está relacionada, principalmente, com a exposição crônica à radiação solar desde a infância, à predisposição genética, à pré-existência de doenças congênitas como nevo congênito, nevo displásico e o xeroderma pigmentoso, apresentando a mesma prevalência entre homens e mulheres. Além disso, a destruição da camada de ozônio aumenta a exposição à radiação ultravioleta o que eleva a incidência mundial dos cânceres de pele (SLAPER et al., 1998; WICKETT; VISSCHER, 2006).

A exposição à luz UV está fortemente relacionada ao desenvolvimento do melanoma cutâneo. Entretanto, a formação do melanoma está mais relacionada com históricos de exposições intensas e esporádicas à irradiação, enquanto que, no caso de outras neoplasias de pele, um acúmulo de exposições freqüentes contribui mais

para a formação desses tumores (PERLYS et. al., 2004). Isso pode ser explicado pela própria biologia dos melanócitos, pois, exposições freqüentes aumentam a produção e distribuição de melanina nos melanócitos, o que forma uma capa protetora na camada basal da epiderme, protegendo-os dos danos causados pelos raios UV. Já no caso de uma exposição muito intensa, os melanócitos não conseguem produzir quantidades suficiente de melanina, ficando expostos aos efeitos da irradiação UV. Além disso, como possuem naturalmente uma grande quantidade de proteínas anti-apoptóticas ou pró-sobrevivência, estas células, ao contrário dos queratinócitos, são capazes de resistir a grandes doses de irradiação UV, podendo propagar as alterações genéticas adquiridas. (HALL et al., 1999).

As neoplasias cutâneas são as mais incidentes em todo o mundo e estão se tornando um grande problema de saúde pública, à medida que sua incidência global tem aumentado mais de 600% desde a década de 1940 (ODASHIRO et al., 2005). O câncer de pele do tipo não melanoma é mais frequente no Brasil e corresponde a 25% de todos os tumores malignos registrados no país em 2009. Por outro lado, o melanoma de pele é menos freqüente do que os carcinomas basocelulares e espinocelulares, contudo sua letalidade é mais elevada; no Brasil são esperados 5.930 novos casos de melanoma cutâneo em 2010. A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima ocorrer anualmente 132 mil novos casos de melanoma maligno em todo mundo. (REMONTET et al., 2003; GOLDBERG et al., 2007; INCA, 2010; JEMAL et al., 2008; MUHRER, 2009).

O diagnóstico precoce do melanoma é fundamental para se atingir a cura. No entanto, apesar dos significantes progressos científicos no entendimento da biologia e genética do melanoma, nenhum tratamento efetivo contra esse tipo de câncer está atualmente disponível (VILLANUEVA; HERLYN, 2008; MUHRER, 2009).

3. A Terapia Fotodinâmica

A Terapia Fotodinâmica (TFD) é uma modalidade terapêutica que emprega a combinação de luz visível, um fármaco fotossensível e oxigênio, que de forma independente, não apresentam toxicidade para o organismo. (STERNBERG; DOLPHIN, 1993; VAN HENEGOUWEN; STEENVOORDEN, 1997; PERVAIZ; OLIVO, 2006). De modo geral, o tratamento das neoplasias cutâneas por TFD consiste na administração do fármaco seguida de irradiação com laser

monocromático no comprimento de onda de absorção máxima do fármaco fotossensível (Figura 4).

O objetivo principal da TFD é induzir a morte do tecido neoplásico por um processo de fotossensibilização com redução da massa tumoral, minimizando ao máximo os danos aos tecidos vizinhos e efeitos colaterais, sendo estas as principais vantagens da TFD frente aos demais tratamentos clássicos contra o câncer, como a quimioterapia e a radioterapia, além de evitar as remoções cirúrgicas. (BROWN et al., 2004; BUGGIANI et al., 2008). Na última década, houve um grande aumento das pesquisas em TFD devido ao seu reconhecimento por parte do FDA (US. Food and Drug Administration) como uma terapia eficaz para o tratamento de diversas doenças, incluindo o câncer (OLEINICK et al., 1998).

Tedesco, 2007. Modificado

Figura 4. Esquema representativo da Terapia Fotodinâmica. **1)** Administração endovenosa do fármaco; **2)** Acúmulo do fármaco em células tumorais; **3)** Irradiação e morte da lesão neoplásica.

3.1. Mecanismos de ação da TFD

O processo de fotossensibilização de uma célula consiste na associação do fármaco às membranas plasmáticas e sua permeação para o citosol de forma passiva, por difusão ou osmose e de forma ativa por transporte ativo ou endocitose.

Os processos passivos resultam das diferenças de concentração das substâncias dentro e fora das células. Já os processos ativos, envolvem o movimento de substâncias através de uma membrana celular contra um gradiente de potencial, o que resulta em gasto de energia pela célula. (CASTANO et. al., 2004).

A TFD está fundamentada em reações fotooxidativas, nas quais o fármaco fotossensível após ser excitado por luz visível em comprimento de onda adequado, passa do seu estado fundamental (S_0) para o primeiro estado excitado singleto (S_1), seguido pela conversão ao estado tripleto (T_1) via cruzamento intersistemas, de acordo com o diagrama de Jablonski (ATKINS, 2002) como mostra a Figura 5.

SciELO.br. Modificado

Figura 5. Diagrama de Jablonski para o processo de fotoativação. Na figura: S_0 (estado fundamental), S_1 (primeiro estado excitado singleto), S_n (estado excitado singleto), T_1 (primeiro estado excitado tripleto), O_2 (oxigênio), $HO^\bullet$ (radical hidroxila), $^\bullet O_2$ (ânion superóxido), H_2O_2 (peróxido de hidrogênio), 1O_2 (oxigênio singleto). Seta azul (absorção), seta laranja (fluorescência), seta vermelha a. (conversão interna), seta vermelha b. (fosforescência).

Nas células, a fotoativação é capaz de promover a destruição irreversível dos tecidos tumorais através de três formas principais: **produção de espécies reativas de oxigênio (ERO)** causando diretamente a morte das células tumorais por apoptose e/ou necrose; **efeito antivascular** que pode causar trombose e hemorragia dos vasos tumorais levando a morte das células neoplásicas por privação de oxigênio e nutrientes; e **ativação da resposta imune** contra as células tumorais através do processo de inflamação aguda e liberação de citocinas no

tumor, resultando assim, num influxo de macrófagos e leucócitos que podem contribuir para a destruição tumoral, bem como, estimular o sistema imune a reconhecer e eliminar as células neoplásicas (Figura 6). (PLAETZER et al., 2003; CASTANO et al., 2005; FICHEUX, 2009).

Figura 6. Mecanismos da TFD: produção de ERO, efeito antivascular e ativação da resposta imune. PS* (fotossensibilizador).

Os mecanismos de ação da TFD são classificados em **Tipo I** e **Tipo II** e são resultantes de uma combinação de fenômenos físicos (interação da luz com a molécula), fenômenos químicos (produção de espécies reativas, EROs) e fenômenos biológicos (destruição do tumor). (PLAETZER et al., 2008; VAN HILLEGERSBERG et al., 1994).

O **Tipo I** envolve a abstração de átomo de hidrogênio ou reações de transferência de elétrons entre os estados excitados do fármaco fotossensível e um substrato biológico, resultando, na produção de radicais livres e íons-radicais. Estes radicais são altamente reativos e reagem com o oxigênio molecular gerando os ânions superóxidos ou radicais hidroxila que causam irreparáveis danos ao tecido tumoral. (PLAETZER et al., 2008; VAN HILLEGERSBERG et al., 1994).

Já o mecanismo **Tipo II** resulta da transferência de energia entre o estado tripleto excitado do fármaco fotossensível e o oxigênio molecular gerando o primeiro estado excitado do oxigênio, o oxigênio singleto ($^1\text{O}_2$). Esta molécula reativa causa danos em várias estruturas celulares como quebra no DNA genômico, destruição da membrana plasmática, lisossomos e mitocôndrias (KÜBLER et.al., 2005; FICHEUX, 2009).

4. Fármacos fotossensíveis: Ftalocianinas

Nos últimos anos, as grandes linhas de pesquisa na área de TFD se concentram nos estudos de desenvolvimento, administração e biodistribuição de possíveis candidatos a fármacos fotossensíveis empregáveis no tratamento fotoquímico-terápico de tecidos tumorais (OKU et al, 1992; HENDERSON; DOUGHERTY, 1992; DOUGHERTY, 1995; LARROQUE et al, 1996;; DOUGHERTY, 1996; GARBO et al, 1998; HENDERSON et al., 1999; HENDERSON, 2000). As principais propriedades de um bom fotossensibilizador tumoral são: alta pureza química, alto coeficiente de extinção molar no vermelho, baixa tendência de agregação em meio aquoso, alto rendimento quântico de produção de oxigênio singleto e outras EROs, boa seletividade, rápida absorção pelo organismo com baixa ou total ausência de toxicidade no escuro, acúmulo mínimo na pele e ausência de potencial mutagênico (VAN LIER; SPIKES, 1989; SPIKES et al., 1993; ROSENTHAL; BEN-HUR, 1995; GILLIES et al., 1996; BALL et al., 1999; ROKISKAYA et al., 2000).

A primeira geração de fármacos fotossensíveis era constituída por compostos derivados de Hematoporfirina, contudo, devido principalmente à baixa seletividade ao tecido neoplásico e à uma fraca absorção na região do vermelho, novas moléculas foram desenvolvidas: os fotossensibilizantes de segunda e terceira geração, como as **ftalocianinas**, clorinas e bacterioclorinas. Dentre os compostos de segunda geração, as ftalocianinas recebem destaque especial, pois apresentam uma forte banda de absorção no intervalo entre 600 a 800 nm, ou seja, na faixa de absorção conhecida como “Janela Terapêutica”, uma vez que, nesta faixa espectral a penetração da luz no tecido é elevada pela ausência de interferência de cromóforos endógenos do sistema biológico (SHARMAN et al., 1999).

Com relação à estrutura química, as ftalocianinas mimetizam as porfirinas em seu macrociclo central, que consiste de uma unidade cíclica tetrapirrólica (Figura 7),

entretanto, nas ftalocianinas as subunidades pirrólicas são unidas por átomos de hidrogênio, enquanto que, nas porfirinas as subunidades são unidas via ponte de metileno. A conjugação do macrociclo da ftalocianina é estendida por anéis benzênicos sobre quatro unidades pirrólicas, resultando em uma forte banda de absorção na região do vermelho do espectro visível (650-680 nm). A complexação das ftalocianinas com íons metálicos diamagnéticos tais como Zn^{2+} e Al^{3+} , origina complexos com longo tempo de vida dos estados excitados singleto e tripleto com bons rendimentos quânticos e excelente atividade fotoquímica e fotodinâmica (NUNES et al., 2004; IDOWU e NYOKONG, 2007).

Nunes, 2004

Figura 7. Estrutura de uma ftalocianina, onde M é o metal central (Al, Zn, Si) e R representa possíveis substituintes (SO_3H , S_2 , F, $COOH$). (NUNES et al., 2004).

Entre as ftalocianinas metálicas, a Ftalocianina de Cloroalumínio (AlClPc) apresenta as melhores características fotofísicas, com longo tempo de vida nos estados excitados e alto rendimento quântico de oxigênio singleto, além de ter boa seletividade pelo tecido tumoral e baixa toxicidade (ROSENTHAL, 1991). Porém, o principal fator que limita a utilização da AlClPc na TFD é sua considerável hidrofobicidade e conseqüente impossibilidade de administração em meio fisiológico. Para superar este problema, significantes esforços têm sido direcionados para o desenvolvimento de sistemas de liberação de fármacos através da nanotecnologia (CHATTERJEE; SRIVASTAVA, 2000; KONAN et al., 2002).

5. Sistemas de liberação de fármacos: Lipossomas

A nanotecnologia farmacêutica tem por objetivo o desenvolvimento de formulações à base de nanocarreadores biocompatíveis que apresentem algumas vantagens, como o aumento da segurança e eficácia terapêutica do fármaco (BECHET et al., 2008). Na literatura científica, as principais formulações coloidais são lipossomas, nanopartículas poliméricas biodegradáveis, micelas poliméricas e dendrímeros (KONAN et al., 2002; CHATTERJEE et al., 2008; HAMIDI et al., 2008; KIRILOV et al., 2008).

Lipossomas são pequenas vesículas esféricas formadas por bicamadas concêntricas de fosfolipídios que se organizam espontaneamente em meio aquoso. Tais partículas são consideradas uma excelente forma de sistema de liberação controlada de medicamentos ou substâncias biologicamente ativas devido a sua flexibilidade estrutural seja no tamanho, composição e fluidez da bicamada lipídica, como na sua capacidade de incorporar uma variedade de compostos. (Figura 8). (TORCHILIN, 2006).

Figura 8. Esquema representativo de um lipossoma.

O uso de formulações lipossomais, como sistemas de liberação lenta de medicamentos, é viável clinicamente por serem tipicamente feitos de moléculas lipídicas de origem natural, biodegradável e não tóxica. Os lipossomas podem proteger o fármaco de degradação enzimática, possibilitam o aumento da concentração da droga no sítio alvo, podem ser utilizados como excipientes não

tóxico para a solubilização de fármacos hidrofóbicos como as ftalocianinas, além de prolongar o tempo da vesícula na circulação, permitindo um possível direcionamento para sítios específicos de células ou órgãos (TORCHILIN, 2002).

Alguns problemas relacionados aos lipossomas têm sido a rápida liberação no sangue, devido a adsorção de proteínas do plasma (opsoninas) com a membrana fosfolipídica, como também reconhecimento e captação dos lipossomas pelo sistema fagocítico mononuclear. A habilidade dos lipossomas para penetrar nos tecidos doentes está diretamente correlacionada com o seu tamanho. Lipossomas grandes são rapidamente removidos da circulação por macrófagos e não se obtém significantes níveis nos outros tecidos do corpo, enquanto lipossomas pequenos (≤ 100 nm) demoram um pouco mais para serem reconhecidos e fagocitados, aumentando a probabilidade dos mesmos de penetrarem os tecidos. Alguns lipossomas que encapsulam fármacos e vacinas exibem melhores propriedades farmacológicas sobre os medicamentos tradicionais. Isso pode ser evidenciado em áreas como quimioterapia do câncer, terapia antimicrobiana, vacinas, diagnóstico por imagem e tratamento de distúrbios oftálmicos (MAEDA et al., 2001; TORCHILIN et al., 2003; TORCHILIN, 2002).

6. Engenharia tecidual e o modelo celular tridimensional

A cultura de células em monocamada (2D) é uma ferramenta muito importante para o desenvolvimento científico, no entanto, as respostas obtidas em cultura de células 2D nem sempre são totalmente satisfatórias, uma vez que o comportamento das células em monocamada quase sempre difere daquele observado *in vivo*, considerando-se a falta de interações célula-matriz ou célula-célula neste tipo de protocolo experimental como uma limitação do método. (WEBER et al., 2002).

De forma geral, culturas 2D de células tumorais são usadas para avaliação da atividade farmacológica de novos agentes quimioterápicos e farmacêuticos. Contudo, o modelo 2D, ignora o fato de que tumores não são formados exclusivamente por células malignas, mas sim uma mistura de células cancerosas, fibroblastos, endotélio e células do sistema imune, conjunto de fatores que influenciam a progressão tumoral (SMALLEY et al., 2008). A solução para este problema seria então, a realização de testes *in vivo* utilizando-se o modelo animal. O problema é que este modelo é altamente complexo, envolvendo diversos tipos celulares, com inúmeras variáveis, o que dificulta muito a avaliação de um

determinado fenótipo celular. Assim, culturas organotípicas, ou seja, modelos celulares tridimensionais tornam-se uma boa estratégia para a avaliação farmacológica de compostos com atividade antitumoral.

Dentre as culturas organotípicas, a pele foi o primeiro órgão humano a ser reconstruído *in vitro*, usando a tecnologia de Engenharia Tecidual (COULOMB et al., 1984). Os primeiros modelos de pele emergiram por volta de 1980 e contribuíram muito para a compreensão da fisiologia, farmacologia e patologia da pele humana. Estes modelos de pele reconstruída são chamados de Equivalentes Dermalis ou Equivalentes Teciduais. Algumas técnicas de engenharia tecidual foram desenvolvidas e avaliadas para a substituição de grandes defeitos de pele em humanos como queimaduras, doenças, acidentes ou ainda para promover a cura de feridas. (RHEINWALD; GREEN, 1975; COULOMB et al., 1989; DUBERTRET; COULOMB, 1994).

O modelo proposto por Bell e colaboradores, representa uma composição de dois tecidos: uma derme (fibroblastos e colágeno) e uma epiderme (queratinócitos) (BELL et al., 1981; BELL et al., 1983). Este modelo de pele ajudou a delinear a modulação da diferenciação de fibroblastos pela matriz de colágeno, além de permitir o estudo de funções dos fibroblastos que não podiam ser avaliadas em cultura de monocamada, como contração e remodelamento da matriz extracelular (Le PANSE et al., 1996; CHAUSSAIN et al., 2002). Finalmente, estes modelos permitiram aos pesquisadores examinar interações de derme-epiderme, e mostraram que os fibroblastos, em adição a sua função bem conhecida de síntese de matriz e remodelamento, participam no crescimento de queratinócitos e na sua diferenciação, além de modular a resposta dos queratinócitos aos agentes farmacológicos (SANQUER et al., 1990, SMALLEY et al., 2008).

A vantagem do modelo de equivalente dermal é que várias interações célula-célula e célula-matriz, existentes *in vivo*, são recuperadas *in vitro*. Isto conduz à observação de um comportamento mais próximo à situação *in vivo* em relação à morfologia, síntese de proteínas (NUSGENS et al., 1984), expressão de enzimas e também com relação ao regulamento do crescimento celular (COULOMB et al., 1984; COLIGE et al., 1992).

Para avaliar a atividade de novos agentes antitumorais, Smaley e colaboradores estabeleceram um modelo tridimensional, formado por fibroblastos em uma matriz estromal semeada com células neoplásicas (Figura 9). Este modelo

permitiu avaliar a progressão tumoral e a resposta farmacológica de forma muito próxima ao observado *in vivo*, se tornando uma valiosa ferramenta para um melhor entendimento dos mecanismos envolvidos na progressão tumoral e na resposta aos agentes antitumorais (SMALLEY et al., 2008).

Smalley, 2008

Figura 9: Reconstrução de um carcinoma de esôfago humano. Note (seta vermelha) que se trata de uma cultura organotípica madura em que as células do carcinoma invadem a camada estromal (fibroblastos e matriz de colágeno).

II – OBJETIVOS

Objetivo geral

Avaliar os efeitos da Terapia Fotodinâmica em células de melanoma humano em diferentes fases de progressão tumoral e em culturas celulares tridimensionais.

Objetivos específicos

- Desenvolvimento e caracterização da formulação AICIPc lipossomal, através da determinação de parâmetros farmacotécnicos como estabilidade, tamanho e homogeneidade das vesículas lipossomais, além de avaliar as propriedades fotoquímicas e fotofísicas do sistema.
- Caracterização da atividade biológica *in vitro* do sistema AICIPc lipossomal em TFD em modelo de cultura de células em monocamada (2D).
- Avaliação do tipo de morte celular induzida pelo tratamento.
- Construção de culturas tridimensionais (3D) de células metastáticas de melanoma humano e caracterização da atividade biológica do sistema AICIPc lipossomal em TFD nestes modelos.

III – MATERIAIS E MÉTODOS

1. Preparo de lipossomas contendo AICIPc

Os lipossomas contendo AICIPc foram preparados pelo método de injeção etanólica conforme descrito por Kremer (KREMER, 1977). Uma solução etanólica contendo fosfatidilcolina de ovo $9,70 \text{ mg.mL}^{-1}$, lisofosfatidilcolina de ovo $0,110 \text{ mg.mL}^{-1}$ e AICIPc $1,20 \text{ mg.mL}^{-1}$, foi injetada em 6.0 mL de tampão fosfato, pH = 7,4, sob agitação constante a 56°C , com uma velocidade de injeção de $380 \mu\text{L/h}$. Após cada preparação lipossomal, fez-se o registro do espectro de absorção da formulação a fim de se verificar a eficiência da incorporação e a ausência de formação de agregados superiores como dímeros. A concentração da AICIPc lipossomal foi calculada a partir do coeficiente de absortividade molar da AICIPc em etanol ($\epsilon_{674} = 2,93 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) (PETI, 2008).

2. Determinação do tamanho, índice de polidispersão e potencial de superfície (Zeta) da formulação lipossomal.

A determinação do tamanho e polidispersividade das vesículas lipossomais foi realizada no laboratório da Dr^a. Maria Vitória Lopes Badra Bentley, na Faculdade de Ciências Farmacêuticas, através da técnica de medidas de espalhamento dinâmico de luz utilizando-se o equipamento Zetasizer modelo Nano System ZS90 (Malvern-UK). As amostras, sem diluições, foram colocadas em uma cela de quartzo de 10 mm de caminho óptico e as medições foram feitas à temperatura ambiente (25°C). O equipamento possui um laser de He-Ne de 4,0 mW operando num comprimento de onda de 633 nm e realiza as medições não invasivas por “backscatter optics”. As medições foram feitas num ângulo de detecção de 173° e a posição da medição na cubeta foi automaticamente determinada pelo software do equipamento. O equipamento realiza em média 12 determinações para cada análise. A carga de superfície (potencial Zeta) foi determinada pela mobilidade eletroforética da formulação utilizando o mesmo sistema descrito acima. O protocolo experimental foi montado à partir das especificações contidas na brochura do equipamento, disponível em www.malvern.com/zetasizernano.

3. Caracterização das propriedades fotoquímicas e fotofísicas da AICIPc lipossomal

Todos os estudos de caracterização fotoquímica e fotofísica, no estado estacionário e resolvido no tempo, foram realizados com uma solução de AICIPc lipossomal de concentração igual a 2,50 µg.mL⁻¹.

3.1. Estudos da AICIPc lipossomal no estado estacionário

Os estudos no estado estacionário foram realizados em espectrofotômetro de absorção UV/visível modelo Lambda 20 Perkin Elmer, da Hitachi e espectrofluorímetro F4500 da Hitachi. As medidas de absorbância foram realizadas entre 300 e 800 nm com picos característicos em 355 e 674 nm. Já a emissão de fluorescência foi medida entre 630 e 750 nm, fendas de 5,0/5,0 com excitação fixa em 610 nm e emissão máxima em 685 nm. Estes estudos foram realizados para a AICIPc incorporada em lipossomas e solubilizada em etanol (controle usado como referência).

3.2. Rendimento quântico de fluorescência (Φ_F) da AICIPc lipossomal

Este estudo foi realizado empregando o método relativo, utilizando-se a ZnPc em etanol, como padrão, como demonstrado na Equação 1, conforme descrito por Demas e Crosby (DEMAS; CROSBY, 1971).

$$\phi_{amostra} = \frac{\text{área}_{amostra}}{\text{área}_{padrão}} \times \frac{\text{absorbância}_{padrão}}{\text{absorbância}_{amostra}} \times \frac{n_{padrão}}{n_{amostra}} \times \phi_{padrão}$$

(Equação 1)

Na equação, ϕ é o rendimento quântico; **área** é a integral sobre a banda de emissão e **n** é o índice de refração do solvente.

Uma solução de ZnPc em etanol, utilizada como padrão ($\Phi_F = 0,28$) foi inicialmente preparada de modo a obter uma absorbância constante na faixa de 0,1 (no comprimento de onda de excitação em 610 nm). As soluções de AICIPc lipossomal foram preparadas em uma concentração afim de se obter absorbâncias da ordem de 0,1 (com excitação em 610 nm), de modo a minimizar o efeito de filtro

interno. A seguir, foi traçado o espectro de emissão de fluorescência corrigido em cada ambiente estudado, sendo determinada a área sob as curvas no intervalo de 630 a 750 nm.

3.3. Tempo de vida do singleto

Para a determinação do tempo de vida de singleto do composto AIClPc foi realizado o estudo do decaimento de fluorescência através do método de contagem simples de fótons. Os comprimentos de onda de excitação e de emissão utilizados para a AIClPc lipossomal foram 350 nm e 680 nm, respectivamente. Para cada medida de decaimento foram coletadas em média 8000 contagens. As medidas foram realizadas utilizando-se como fonte de excitação um laser de diodo (Nd:YVO₄ - Millenia Xs - Spectra Physics), um cristal dobrador de frequência, e um laser de titânio-safira (Tsunami - Spectra Physics) que gera pulsos de laser (com largura de 5 ps) em uma banda que vai de 840 até 1080 nm, com frequência máxima de repetição dos pulsos igual a 82 MHz, com agitação e termostatização contínua. As curvas de decaimento de fluorescência foram analisadas utilizando-se o software operacional do próprio instrumento (Edinburgh Instruments). Os ajustes foram validados através do valor mínimo na função chi-quadrado (χ^2). Este estudo foi realizado com o auxílio do Laboratório de Biofísica Molecular da FFCLRP/USP, o qual é coordenado pelo Prof. Dr. Amando Siuiti Ito.

3.4. Tempo de vida do tripleto

A determinação do tempo de vida do primeiro estado excitado tripleto foi realizada através da técnica de fotólise por pulso de laser (MUROV, 1973) que resulta em detecções do espectro de absorção do transiente na faixa de 300 a 800 nm. Nesta técnica uma grande população de moléculas do estado fundamental é promovida para os estados excitados singletos superiores por um pulso rápido de luz de alta intensidade. Após o disparo do laser, as moléculas que se encontram no estado excitado singleto sofrem cruzamento intersistema para um estado excitado tripleto. Os registros foram feitos ponto a ponto, em intervalos de 10 nm após a excitação no terceiro harmônico ($\lambda_{\text{exc}} = 355$ nm) com 10 pulsos de laser de 15 mJ de energia (Nd-YAG, SURELITE I-10). Os sinais dos transientes gerados foram detectados por uma fotomultiplicadora R928P, Hamamatsu, transferidos para um osciloscópio digital TDS 340 A, Tektronix e analisados com o *software* Gem,

Edinburgh Analytical Instruments. O comprimento de onda utilizado para monitoramento da absorção máxima do transiente gerado e para a determinação do tempo de vida do estado excitado tripleto foi de 480 nm.

3.5. Rendimento quântico de produção de oxigênio singleto (Φ_{Δ}) da AICIPc lipossomal

O método indireto se baseia em medidas de consumo do oxigênio molecular do meio, realizadas no estado estacionário (COREY et. al., 1987). Embora a fosforescência do oxigênio singleto ($^1\text{O}_2$) seja muito baixa na maioria dos solventes aquosos e orgânicos, o emprego de detectores de alta sensibilidade torna possível a sua detecção direta. Um exemplo disso é a utilização de fotodiodos de germânio, de alta resolução, acoplados a amplificadores operacionais capazes de captar sinais da ordem de microsegundos ou menos. Isso permite que o tempo de vida do $^1\text{O}_2$ (τ_{Δ}) em muitos solventes seja medido com precisão através do seu decaimento na região do infravermelho próximo.

Analizamos a eficiência quântica de geração de $^1\text{O}_2$ da AICIPc em etanol e da AICIPc lipossomal. O experimento foi realizado com amostras com absorbância fixada em 0,30, no terceiro harmônico do laser, em 355 nm. As soluções foram então saturadas por degaseamento com oxigênio por 30 minutos. Uma solução de feoforbide-a em etanol, foi utilizada como amostra padrão. Na detecção do rendimento quântico utilizou-se o método fotofísico que consiste no monitoramento da intensidade de emissão de fosforescência do $^1\text{O}_2$ em 1270 nm, empregando-se o sistema resolvido no tempo (E.A.I. – LP 900, pulsado com um laser Nd:YAG em 355 nm, com um detector de germânio 823 A, North Coast Scientific Corporation). A potência do laser de Nd:YAG utilizado na detecção foi de 15 mJ por pulso. A intensidade máxima de fosforescência no tempo $t = 0$ foi determinada pelo método relativo, com base na Equação 2, conforme descrito por Arbogast (ARBOGAST, 1991).

$$\Phi_{\Delta} = \frac{I}{I_{Ref}} * \Phi_{\Delta_{Ref}} * \frac{\tau_{\Delta_{Ref}}}{\tau_{\Delta}}$$

(Equação 2)

Na Equação 2, I_{ref} é a intensidade de emissão de fosforescência do $^1\text{O}_2$ produzido pelo composto padrão (feoforbide-a), I é a intensidade de emissão de fosforescência do $^1\text{O}_2$ produzido pela amostra (AICIPc em etanol ou em lipossoma), $\Phi_{\Delta\text{ref}}$ é o rendimento quântico de produção de $^1\text{O}_2$ produzido pelo padrão, $\tau_{\Delta\text{ref}}$ é o tempo de vida do $^1\text{O}_2$ produzido pelo padrão e τ_{Δ} é o tempo de vida do $^1\text{O}_2$ produzido pela amostra.

4. Cultura de fibroblastos CCD27SK

A linhagem de fibroblastos CCD27SK, provenientes de derme humana, foi cedida pela Dra. Maria Aparecida Fontes do Hemocentro de Ribeirão Preto. As células foram mantidas em atmosfera úmida, com 5% CO_2 a 37°C , em meio DMEM, pH = 7,4, suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Cultilab), penicilina G ($10,000 \mu\text{g.mL}^{-1}$), estreptomicina ($10,000 \mu\text{g.mL}^{-1}$), anfotericina ($25 \mu\text{g.mL}^{-1}$), L-glutamina $2,0 \text{ mmol.L}^{-1}$ (Invitrogen) e $1,50 \text{ g.L}^{-1}$ de bicarbonato de sódio. As células foram cultivadas até atingirem a confluência (90%), lavadas com tampão fosfato PBS 1X ($\text{NaCl } 140 \text{ mmol.L}^{-1}$, $\text{KCl } 3,0 \text{ mmol.L}^{-1}$, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \text{ } 4,30 \text{ mmol.L}^{-1}$, $\text{KH}_2\text{PO}_4 \text{ } 1,40 \text{ mmol.L}^{-1}$) retiradas das placas de cultura com solução de tripsina (0,05%)/EDTA ($0,53 \text{ mmol.L}^{-1}$) (Invitrogen) e então submetidas à centrifugação a $200 \times g$ por 5 minutos. As células foram ressuspensas em meio de cultura e replaqueadas. O meio foi trocado de duas a três vezes por semana. Para os experimentos foram usadas células entre a 3ª e 6ª passagem. As células foram contadas em câmara de Neubauer e plaqueadas de acordo com o número de células estabelecido em cada protocolo experimental.

Figura 10. Cultura de fibroblastos de derme humana, CCD27SK.

5. Transdução da linhagem CCD27SK com lentivírus

Para obter células imortalizadas e fluorescentes como ferramentas que possam ser úteis em futuros estudos, principalmente no que se trata de co-cultivos, realizou-se a transdução da proteína verde fluorescente (GFP) em fibroblastos CCD27SK com a ajuda de um vetor lentiviral. Inicialmente, a linhagem celular HEK293T, foi transfectada com plasmídeos acessórios 8.91, VSV-G e 1054-GFP (QIAGEN) para posterior transdução da GFP para os fibroblastos CCD27SK. Em dois tubos, colocaram-se DNA plasmidial e DMEM (Gibco) sem soro e no outro tubo DMEM sem soro e Lipofectamine® Reagent 2000, deixando-se em temperatura ambiente por 5 minutos. Ao final do tempo, juntaram-se o material presente nos dois tubos, novamente em temperatura ambiente, agora por 20 minutos, para então incubar esta solução nas células HEK 293T, infectadas com lentivírus, por mais 6 horas a 37°C. Após este tempo, meio das células foi trocado por DMEM com 10% de SFB, deixando-as em estufa por 72 horas. Recolheu-se o sobrenadante e o adicionou aos fibroblastos CCD27SK juntamente com 20 mg.mL⁻¹ de fator de crescimento FGF-β e 4,0 µg.mL⁻¹ de polybreno (Sigma-Aldrich) . Foram realizados 3 ciclos e ao finalizar a transdução, as células fluorescentes foram separadas por citometria de fluxo.

6. Cultura de células de melanoma humano

O laboratório do Dr. Meenhard Herlyn do Instituto Wistar (Philadelphia, USA) estabeleceu uma coleção de linhagens celulares derivadas de melanoma humano em diferentes estágios da progressão tumoral. Estas células estão sob a supervisão da Dra. Enilza Maria Espreadico, na Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. Para os estudos foram cedidas três linhagens: uma representante de melanoma primário originado de lesões do estágio de crescimento radial (RGP) – WM1552C, uma do estágio de crescimento vertical (VGP) – WM278 e uma metastática (M) – WM1617 (Figura 11). Dentre elas encontra-se um par de linhagens, WM278 e WM1617, provenientes do mesmo paciente (HERLYN et al., 1985; SOUZA; ESPREADICO, 2008). A Tabela 1 apresenta algumas informações, como o sítio a partir de onde foi estabelecida a linhagem, sexo e idade do paciente.

Tabela I. Características de origem das linhagens humanas

Linhagem	Sexo/Idade	Sítio	Tumorigenicidade
WM1552C	M 72	Nádegas	Não
WM278	F 62	Tumor primário - n.d.	Sim
WM1617	F 62	NL Axila Direita	Sim

n.d = não determinado, **NL** = nódulo linfático (metástase), **M** = masculino, **F** = feminino*

As células de melanoma humano foram cultivadas em meio TU (tumoral) 2%, composto por MCDB-153 (Sigma-aldrich) 80%, pH 7.0, Leibovitz's L-15 (Invitrogen) 20%, pH 7,2, insulina 5,0 mg.mL⁻¹ (Sigma-aldrich) e CaCl₂ 2,0 mmol.L⁻¹ suplementado com 2% de SFB, em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂ a 37°C. As células foram cultivadas até atingirem a confluência (90%), retiradas das placas de cultura com tripsina (0,05%)/ EDTA 0,53 mmol.L⁻¹ (Invitrogen) em PBS 1X. A tripsina foi inativada pela adição de meio de cultura Leibovitz's L-15 contendo 10% de SFB, e então as células foram submetidas à centrifugação a 200 xg por 5 minutos, ressuspendidas e replaqueadas. O meio foi trocado de duas a três vezes por semana. As células foram contadas em câmara de Neubauer e plaqueadas de acordo com o número de células estabelecido em cada protocolo experimental.

* Fonte: Página do Laboratório do Prof. Dr. Meenhard Herlyn – Universidade da Pensilvânia: <http://www.wistar.upenn.edu/herlyn>

Figura 11. Cultura de células derivadas de melanoma humano em diferentes fases de progressão tumoral. **(A)** Células de melanoma em fase de crescimento radial **WM1552C**, em **(B)** Células de melanoma em fase de crescimento vertical **WM278** e em **(C)** Células de melanoma metastático **WM1617**

7. Extração e quantificação de colágeno tipo I

7.1. Extração de colágeno tipo I

Para a preparação das matrizes tridimensionais é necessária a obtenção de uma solução de colágeno. Esta solução foi obtida a partir da cauda de ratos *Wistar* machos com 10 semanas e peso aproximado de 300 g. As caudas foram mantidas em gelo, lavadas e então colocadas duas vezes em soluções de álcool 70% por 20 minutos. Em seguida, as caudas foram dessecadas, sendo todo o procedimento realizado em fluxo laminar em condições estéreis. Removeu-se a ponta de cada fio de tendão exposto das caudas, com o auxílio de uma pinça e imediatamente os tendões foram colocados sobre uma placa de petri contendo água Milli-Q estéril. Em seguida, os tendões foram pesados e colocados em uma solução de ácido acético 0,1%. Esta solução foi mantida a 4°C durante uma semana, com agitação diária. Após este período, a solução foi ultracentrifugada a 4°C por 2 horas a 17.500 xg (Sorvall, SLA-1500), para a remoção das partículas suspensas. O sobrenadante foi coletado e a solução de colágeno armazenada e mantida a 4°C até o uso. Uma alíquota da solução foi coletada e dialisada para a dosagem.

7.2. Dosagem de colágeno tipo I

O aminoácido hidróxiprolina é um dos constituintes do colágeno, dessa forma o colágeno obtido foi quantificado através da dosagem de hidroxiprolina na solução (Le PANSE et al., 1996; CHAUSSAIN et al., 2002). Primeiramente, a amostra foi dialisada em ácido acético 0,1% a 4°C por 48 horas. Uma solução de hidroxiprolina 20 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ foi preparada para a realização de uma curva padrão (0,80 até 2,60 $\mu\text{g.mL}^{-1}$). A amostra de colágeno foi hidrolisada a 120°C por 20 minutos e foram feitas alíquotas diluídas em água. Em seguida adicionou-se em cada amostra 200 μL de cloramina T (Merck) em temperatura ambiente por 20 minutos, 200 μL de ácido perclórico 3,15 mmol.L^{-1} (Merck) também em temperatura ambiente por 5 minutos e por fim 200 μL de solução de DMBA (dimetilamino-4-benzaldeído) (Sigma) diluída em éter monoetílico de etilenoglicol (Merck) por 20 minutos a 60°C. As amostras foram então resfriadas em gelo por 20 minutos e em seguida foi feita a leitura em espectrofotômetro em 577 nm. A concentração do colágeno obtido foi igual a 3,40 mg.mL^{-1} (Apêndice 1).

8. Construção das culturas celulares tridimensionais (3D)

8.1. Preparo das culturas tridimensionais (3D) mistas em matriz de colágeno

Para cada cultura adiciona-se 2,30 mL de solução de meio de cultura DMEM 1,86 X, suplementado com penicilina 10,000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, estreptomicina 10,000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, anfotericina B 1,0 mg.mL^{-1} , 450 μL de SFB, 1,50 mL de colágeno 3,40 mg.mL^{-1} , 250 μL de NaOH 0,10 N (filtrado) e uma solução de células constituída de $7,5 \times 10^4$ fibroblastos CCD27SK e $7,5 \times 10^4$ células de melanoma humano metastático WM1617. Todo o procedimento foi realizado em capela de fluxo laminar e todas as soluções são usadas a 4°C (Figura 12). As culturas foram mantidas por até 10 dias em estufa a 37°C e 5% CO_2 para a realização dos experimentos.

Figura 12: Preparo das matrizes 3D. Em **(A)**, no destaque a adição de colágeno (seta vermelha) extraído da cauda de ratos Wistar. **B)** Cultura 3D formada em matriz de colágeno (seta preta).

8.2. Estabelecimento de colônias de células ancoragem-independente

Em placas de 6 poços, foi semeado 1,0 mL de solução acelular de ágar 1,0 % (Sigma), incubado a 4° C por 10 minutos. Após a contagem, $5,0 \times 10^3$ células foram misturas em 1,0 mL de solução de ágar 0,35% (diluído em TU 2%) e semeado sobre a camada acelular. Após a solidificação, foi adicionado 1,0 mL de meio TU 2%. O meio foi trocado a cada dois dias por meio fresco (SATYAMOORTHY et. al., 2000). O ensaio foi realizado em réplicas de três experimentos individuais. As colônias

foram visualizadas em microscópio de epifluorescência invertido Nikon Eclipse TS100, na objetiva de 10X. Em seguida foram fotografadas e as imagens foram analisadas utilizando o software ImageJ.

Figura 13. Cultura de células metastáticas de melanoma humano **WM1617** em soft agar após 12 dias de cultivo. Note a formação de diversas colônias celulares (seta preta).

9. Tratamento com AICIPc lipossomal

Nos experimentos em monocamada (2D), as células foram contadas, transferidas para placas de 24 poços na proporção de $2,0 \times 10^5$ células por poço e incubadas por 24 horas sob condições padrão de cultivo. Já as culturas 3D foram preparadas de acordo com os itens 8.1 e 8.2. Tanto as células em monocamada (2D) como as culturas 3D foram tratadas com $0,29 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de AICIPc lipossomal, deixadas em estufa protegidas da luz por diferentes tempos de incubação e em seguida lavadas com PBS 1X. A única diferença é que as culturas em monocamada (2D) foram tratadas com AICIPc lipossomal 24 horas após o plaqueamento enquanto que as culturas 3D (soft agar e matriz mista de colágeno) foram tratadas 3 dias após a construção do modelo.

As culturas não irradiadas permaneceram em estufa, protegidas da luz, sob condições padrão de cultivo. Para os ensaios na presença de irradiação luminosa, após o tratamento com AICIPc lipossomal, as culturas foram mantidas em meio sem fenol e sem SFB e então submetidas a três diferentes doses de energia de irradiação luminosa:

70 mJ.cm^{-2} , 140 mJ.cm^{-2} e 700 mJ.cm^{-2} , com o sistema laser de diodo *Eagle* da Quantum Tech em 674 nm, acoplado a uma fibra óptica, operando com 100 mW de potência (Figura 14). Após a irradiação luminosa, as células incubadas com meio de cultivo padrão, de acordo com o protocolo descrito no item 6 da Seção III.

Figura 14. Células de melanoma humano sendo irradiadas com o sistema laser de diodo em 674 nm após o tratamento com AICIPc lipossomal.

10. Ensaio de viabilidade celular – MTT

A citotoxicidade da AICIPc lipossomal foi estabelecidas *in vitro*, através de curvas de dose-resposta obtidas pelo ensaio colorimétrico de viabilidade celular – MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)2,5-difeniltetrazolio brometo] (Sigma-aldrich).

O ensaio de MTT consiste na detecção do crescimento celular/morte celular, de acordo com a capacidade da mitocôndria em converter o sal de tetrazolio MTT em um produto de coloração roxa que pode ser medido espectrofotometricamente. O princípio deste método consiste no fato de que células vivas, em crescimento, têm mitocôndrias competentes, promovendo a respiração celular, liberando no meio, espécies redutoras provenientes da cadeia respiratória celular (NADPH), promovendo a redução do sal MTT amarelo no produto corado, roxo. Já as células mortas, ou em processo de morte celular, têm a função mitocondrial comprometida e assim não ocorre a mudança de coloração. (MOSMANN, 1983; VISTICA et al., 1991).

Este ensaio foi empregado apenas para as culturas celulares 2D, 24 horas após o tratamento estabelecido com a AICIPc lipossomal. As células foram

incubadas por 4 horas com uma solução de MTT $1,0 \text{ mg.mL}^{-1}$ e em seguida o produto colorimétrico foi solubilizado em $500 \text{ }\mu\text{L}$ de 2-propanol. Realizaram-se as medidas espectrofotométricas em 560 e 690 nm, Safire II (TECAN U.S).

11. Marcação das células com anexina V e iodeto de propídeo

Este experimento foi realizado apenas para as células em monocamada (2D) 24 horas após o tratamento com $0,29 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$ AICIPc lipossomal seguido de 70 e 700 mJ.cm^{-2} de irradiação de acordo com o protocolo descrito no item 8. As células foram lavadas com PBS 1X e incubadas por 15 minutos em temperatura ambiente com anexina V conjugada com Alexa 568 (Roche®) em tampão de ligação (NaCl 140 mmol.L^{-1} , CaCl_2 $2,50 \text{ mmol.L}^{-1}$, HEPES 10 mmol.L^{-1} , pH = 7,4) na proporção 1:100 de acordo com as especificações do fabricante (www.roche-applied-science.com). Também foi realizada a marcação com iodeto de propídeo (PI) $2,0 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$, porém, em poços distintos aos da anexina V, referentes às mesmas condições de tratamento com AICIPc lipossomal, já que ambos os fluoróforos emitem em 568 nm. Em seguida as células foram observadas e fotografadas em microscópio Confocal Leica DMI 4000 B com software Leica LAS versão 3.0 (Wetzlar, Germany).

12. Quantificação de AICIPc intracelular (uptake)

12.1. Quantificação da AICIPc intracelular por emissão de fluorescência

Neste ensaio foi determinada a quantidade intracelular do fármaco fotossensível AICIPc, em ng, para as três linhagens de melanoma humano WM1552C, WM278 e WM1617. Para tanto, realizamos a validação da metodologia analítica utilizando com padrão a AICIPc em SDS 2% em PBS1X. O padrão foi quantificado em sete pontos no intervalo de $2,26 \text{ ng.mL}^{-1}$ até 145 ng.mL^{-1} .

As células, previamente semeadas em placas de 24 poços, $2,0 \times 10^5$ céls/poço, foram incubadas com $0,29 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$ de AICIPc lipossomal em cinco diferentes tempos, sendo $T_{\text{máx}} = 180$ minutos. Em seguida, as células foram lavadas com PBS 1X, lisadas com tampão SDS 2% em PBS 1X e homogeneizadas por 5 minutos. As amostras foram transferidas para cubetas e a emissão de fluorescência foi detectada em 685 nm com fendas de 10 nm e excitação em 610 nm (Fluorímetro F4500 da Hitachi).

12.2. Detecção por microscopia confocal

Para este experimento, seguimos as mesmas condições experimentais citadas em 12.1, no entanto, as células foram semeadas em lamínulas e após a incubação com a AICIPc lipossomal, as células foram fixadas com solução de paraformaldeído 4% por 20 minutos, lavadas com PBS 1X por três vezes, e quando necessário, coradas com DAPI, para melhor visualização do núcleo. A linhagem WM1552C também foi corada com Cell Tracker, CFSE 0,50 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ (Molecular Probes), para colocação do fármaco fotossensível no citoplasma. Em seguida, as lâminas foram montadas, seladas e observadas em microscópio Confocal Leica SP5, com filtro em 633 nm (região de detecção das ftalocianinas) fotografadas com auxílio do software Leica LAS versão 3.0 (Wetzlar, Germany).

13. Análise histológica

Com 17 dias de cultivo, os equivalentes teciduais formados pelas culturas 3D mistas de fibroblastos CCD27SK e células metastáticas de melanoma humano WM1617, foram lavados com PBS 1X por três vezes e fixados com glutaraldeído 2% por 1 hora. Em seguida as amostras foram lavadas por mais três vezes em PBS 1X e desidratadas com álcool em concentrações crescentes de 50, 70, 85, 95 e 100%. (GOMES et al., 2006). Após a desidratação as amostras foram embebidas em três banhos de xilol para diafanização e em seguida incluídas em parafina e seccionadas em micrótomo manual. Cortes de 7 μm de espessura foram dispostos em lâminas de vidro, corados com hematoxilina e eosina, analisados por microscopia e fotografadas com auxílio de um microscópio Confocal Leica DMI 4000 B com software Leica LAS versão 3.0 (Wetzlar, Germany).

14. Análise estatística

Todos os cálculos e regressões lineares foram realizados pelo programa *Excell Microsoft 2007*, assumindo o valor de $R^2 \leq 1.0$ e ≥ 0.990 . As análises estatísticas foram realizadas no programa *Prisma GraphPad 3.0* através dos testes de análise de variância, *One-way Anova* e *Tukey* como pós-teste aplicado para as análises de múltiplas comparações. Todos os experimentos foram realizados em triplicatas e para todas as análises foi aceito $p < 0,05$.

IV – RESULTADOS

1. Desenvolvimento da formulação lipossomal contendo AICIPc

Como primeira etapa deste trabalho, foi realizada a incorporação do fármaco fotossensível AICIPc dentro de vesículas lipossomais conforme descrito na seção III item 1. Os lipossomas se mostraram estáveis por dez dias, quando estocados à temperatura ambiente e protegidos da luz, sendo que a incorporação do fármaco foi conseguida facilmente no sistema de liberação escolhido. Também foram sintetizados lipossomas “vazios”, sem o fármaco fotossensível, para serem utilizados como controle.

2. Determinação do tamanho, estabilidade e homogeneidade da formulação lipossomal

Estes experimentos foram realizados como descrito na seção III item 3 e as medidas foram feitas para as preparações lipossomais contendo o fármaco AICIPc e para os lipossomas “vazios”. Nos estudos de estabilidade das formulações obtiveram-se os valores dos potenciais zeta e o grau de homogeneidade das amostras através do índice de polidispersividade. A Tabela II sumariza os valores obtidos.

Tabela II: Tamanho (nm), polidispersividade (Pdl) e potencial zeta (ζ) das formulações.

Sistemas	Diâmetro* (nm)	Pdl*	ζ^* (mV)
AICIPc lipossomal	110 ($\pm 0,29$)	0,227 ($\pm 0,07$)	- 8,2 ($\pm 3,50$)
Lipossoma vazio	90 ($\pm 0,19$)	0,237 ($\pm 0,18$)	- 4,2 ($\pm 2,50$)

3. Caracterização, no estado estacionário, das propriedades fotoquímicas e fotofísicas da AICIPc lipossomal.

Após a preparação e caracterização da formulação lipossomal, iniciaram-se os estudos fotoquímicos e fotofísicos para avaliar a capacidade da AICIPc como um bom fármaco fotossensível útil em TFD, além de verificar se a incorporação do

composto em vesículas lipossomais interferiu ou não em suas propriedades químicas e físicas.

Uma das características básicas de um corante a ser utilizado como fármaco fotossensível em TFD está relacionada diretamente com a sua absorção na chamada “janela terapêutica”, faixa de comprimento de onda situada entre 600 e 800 nm, região de máxima penetração da luz nos tecidos em mamíferos e em outros sistemas biológicos (FISHER et. al., 1995).

Considerando o espectro de absorção da formulação AICIPc lipossomal, pode-se observar, na região espectral de interesse, uma absorção máxima em 674 nm (banda Q), caracterizada por uma absortividade molar elevada ($\epsilon > 10^5$). Este comportamento foi exatamente igual ao observado nos estudos com a AICIPc em meio orgânico homogêneo (etanol), usado como referência (Gráfico 1). A concentração de AICIPc incorporada aos lipossomas foi igual a $2,50 \mu\text{g.mL}^{-1}$, com base nos cálculos descritos na seção III item 1.

Gráfico 1. Espectro de absorção da AICIPc incorporada em lipossomas (—) e da AICIPc em etanol usado como referência (.....). Em ambos os casos a concentração de AICIPc foi igual a $2,50 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

Com relação à fluorescência, o máximo de emissão encontrado para a AlClPc lipossomal, foi em 685 nm, após excitação em 610 nm. É possível notar que um pequeno deslocamento do pico com relação à AlClPc em etanol. (Gráfico 2).

Gráfico 2. Espectro de emissão de fluorescência da AlClPc incorporada em lipossomas (—) e da AlClPc em etanol usado como referência (-----). Em ambos os casos a concentração de AlClPc foi igual a $2,50 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

4. Determinação do rendimento quântico de fluorescência (Φ_F) da AlClPc lipossomal

A medida da fluorescência de uma molécula é importante para o entendimento da fotoquímica e fotofísica no estado excitado singleto. A absorção de um fóton por uma molécula no estado fundamental (S_0) faz com que um elétron passe para algum estado mais energético, o singleto excitado (S_n), a partir de onde pode retornar para o estado fundamental por vários processos radiativos e não radiativos. A razão entre os números de fótons emitidos a partir do estado excitado singleto, pelo número total de fótons absorvidos, para uma mesma coleção de moléculas, define um parâmetro fotofísico denominado **rendimento quântico de fluorescência (Φ_F)** (TURRO, 1978).

Os rendimentos quânticos de fluorescência geralmente são determinados de forma relativa às propriedades previamente definidas para um composto padrão (DEMAS; CROSBY, 1971; EATON, 1988).

Neste experimento, foi utilizado como padrão a Ftalocinina de Zinco em etanol (ZnPc), cujo $\Phi_F = 0,28$. (OLIVEIRA et. al., 2005). Inicialmente, foram traçados os espectros de absorção e de emissão de fluorescência corrigido para a ZnPc em etanol e para a AICIPc lipossomal. O método utilizado é baseado no formalismo descrito por Eaton (EATON, 1988), e os valores foram calculados de acordo com o item 2.2 da seção III. O valor do Φ_F encontrado para a formulação AICIPc lipossomal foi de 0,35, muito próximo do Φ_F do padrão (Tabela III).

Tabela III: Valores do Φ_F para a ZnPc em etanol e para a AICIPc lipossomal.

Sistemas	Φ_F
ZnPc em etanol	0,28
AICIPc lipossomal	0,35
AICIPc em DMSO	0,34*

*IDOWU; NYOKONG, 2007

5. Medidas de fluorescência resolvida no tempo da AICIPc lipossomal: determinação do tempo de vida do singleto

O tempo de vida de uma substância fluorescente representa o tempo médio em que esta molécula permanece no estado excitado antes de retornar ao estado fundamental. Os valores de tempo de vida podem revelar a frequência de encontros colisionais com os agentes supressores, a velocidade de transferência de energia e as reações dos estados excitados. A natureza precisa do decaimento de fluorescência pode revelar detalhes sobre as interações do fluoróforo com o meio onde se encontra. (LAKOWICZ, 1984; FOOTE, 1968; De ROSA; CRUTCHLEY, 2002).

O **tempo de vida do singleto** é derivado das curvas de decaimento que mostram os decaimentos de fluorescência ajustados, bem como os desvios e resíduos médios (Figura 15, Tabela IV). Nas curvas de decaimento de fluorescência, a intensidade de luz decresce com o tempo após a remoção da fonte de excitação.

Para a AICIPc lipossomal foram obtidas as curvas de decaimento apresentadas na Figura 15. Estas foram analisadas através do algoritmo de análise padrão (Exponential Fit), o qual é baseado no algoritmo iterativo de Levenberg-Marquadt que faz um ajuste não linear dos mínimos quadrados no espaço de convolução entre o pulso de excitação (medido pelo espalhamento) e a função de decaimento (NUNES, 2003).

Cinética de decaimento:

Figura 15: (A) Curva de decaimento e ajuste exponencial para a AICIPc lipossomal $2,50 \mu\text{g.mL}^{-1}$. (B) Resíduo médio da medida (desvio padrão: CHISQ = 1,206).

Tabela IV: Tempos de vida do singlete (τ) em ns e amplitude relativa (**A**) para a AlClPc lipossomal.

Sistema	τ_1 (ns)	A_1 (%)	τ_2 (ns)	A_2 (%)
AlClPc lipossomal	6,35	86,9	0,85	13,1
AlClPc solventes orgânicos	3 – 8*	-	-	-

*PACHECO-SOARES et. al., 2004

Quando incorporada aos lipossomas, o decaimento cinético de fluorescência da AlClPc lipossomal apresenta uma cinética biexponencial, com dois tempos de vida singlete, 6,35 ns e 0,85 ns, sendo o primeiro preponderante.

6. Caracterização espectroscópica e determinação dos estados excitados e tempo de vida do tripleto

A ação fotodinâmica em sistemas biológicos envolve o primeiro **estado excitado tripleto** (T_1) do fármaco fotossensível, que é formado a partir do cruzamento intersistemas do estado excitado singlete de vida curto, inicialmente produzido pela absorção da energia radiante. A fotossensibilização celular ocorre devido à interação do oxigênio molecular, presente no meio, com o fármaco fotossensível excitado (T_1), gerando oxigênio singlete (SPIKES, 1984). Dessa forma torna-se essencial para a caracterização fotoquímica de uma molécula estudar as características do estado excitado tripleto.

Dentre as técnicas resolvidas no tempo baseadas no monitoramento direto da absorção ou emissão de um intermediário reacional de vida curta, a técnica de fotólise por pulso de laser é uma das mais utilizadas. A técnica é usada para gerar e estudar a reatividade dos mais diversos tipos de transientes, oriundos de estados eletronicamente excitados. (NUNES, 2003).

A diferença básica entre os processos envolvendo o estado excitado singlete e o estado excitado tripleto é que neste último, as moléculas apresentam uma vida média mais longa (da ordem de μ s a ms), podendo interagir com outras espécies além do oxigênio molecular, ou retornar ao estado fundamental por emissão de luz, por um fosforescência. Em solução homogênea, a probabilidade e a eficiência do processo de fotossensibilização dependem de vários parâmetros fotofísicos, tais como o rendimento quântico de formação do estado excitado tripleto, sua velocidade

de decaimento, ou a transferência de energia ou de elétron para o oxigênio molecular solubilizado no meio. (TEDESCO et. al., 2003).

No Gráfico 3, as regiões com absorbância acima de zero representam a absorção do tripleto e o estado excitado tripleto da AICIPc lipossomal, apresentando um perfil com absorção máxima na faixa de 380 a 600 nm. Ainda, pode-se observar um máximo na absorção dos transientes em 480 nm e o fotobranqueamento do estado fundamental centrado em aproximadamente 670 nm.

Gráfico 3. Espectro de absorção do transiente obtido através do método de fotólise por pulso de laser para a formulação AICIPc lipossomal ($2,50 \mu\text{g.mL}^{-1}$), $0,21 \mu\text{s}$ após excitação por pulso de laser em 355 nm, mostrando a absorção máxima do tripleto centrada no comprimento de onda de 480 nm e o fotobranqueamento do estado fundamental centrado a aproximadamente 670 nm.

O **tempo de vida do estado excitado tripleto (τ_{T1})** da AICIPc lipossomal foi calculado através da análise cinética das curvas de decaimento dos transientes no máximo da absorção tripleto, em 480 nm, usando-se um programa de ajuste do próprio aparelho. O valor do tempo de vida do tripleto obtido para a AICIPc lipossomal, foi de $2,63 \mu\text{s}$.

7. Determinação do rendimento quântico de produção de oxigênio singleto (Φ_{Δ}) pela AICIPc lipossomal

Dentre todos os estudos fotofísicos e fotoquímicos envolvendo fármacos fotossensíveis ativos no processo fotodinâmico, talvez o mais importante seja a detecção e quantificação da produção de oxigênio singleto ($^1\text{O}_2$). Este desempenha um papel-chave em muitos processos oxidativos fotoinduzidos em sistemas químicos e biológicos, sendo o principal agente responsável pela morte de células tumorais. (SPILLER, 1998). Assim, é de fundamental importância determinar o rendimento quântico de produção de oxigênio singleto pela formulação AICIPc lipossomal e verificar se a incorporação em vesículas lipossomais afeta ou não a produção de $^1\text{O}_2$ pelo fármaco fotossensível.

A determinação do rendimento quântico de produção de oxigênio singleto (Φ_{Δ}) foi realizada como descrito na seção III no item 2.5. Nos estudos, o composto utilizado como padrão foi o feoforbide-a, que apresenta um alto rendimento quântico de oxigênio singleto ($\Phi_{\Delta} = 0,59$). Todas as soluções possuíam a mesma intensidade de absorção em 355 nm ($\text{Abs} = 0,30$). Os valores de Φ_{Δ} do padrão e da formulação estão apresentados na Tabela V. Como se pode observar, a formulação apresentou expressivo valor de Φ_{Δ} , sendo inclusive superior ao padrão

Tabela V: **Valores de rendimento quântico de produção de oxigênio singleto $^1\text{O}_2$ (Φ_{Δ}).**

Composto	Φ_{Δ}
Feoforbide-a	0,59
AICIPc lipossomal	0,65
AICIPc DMSO	0,29*

*IDOWU; NYOKONG, 2007

8. Ensaio de Citotoxicidade

Os fotossensibilizadores usados para aplicações de TFD em neoplasias devem preencher alguns critérios a mais do que os agentes fotossensibilizantes comuns, como acúmulo preferencial nos tecidos tumorais e baixa toxicidade no escuro (De ROSA; CRUTCHLEY, 2002). Além disso, nos estudos em questão, pelo fato do fármaco fotossensível estar encapsulado em lipossomas, a formulação

também deve ser inerte. Desse modo, a primeira etapa deste trabalho foi realizar ensaios de citotoxicidade do sistema proposto, testando a atividade da AICIPc no escuro e das formulações lipossomais “vazias”. Em seguida, estabelecidas as condições ideais de tratamento, realizaram-se os ensaios na presença de diferentes doses de irradiação com luz laser em 674 nm. Todos os experimentos foram realizados de acordo com o protocolo estabelecido, descrito na seção III item 9. Este *screening* da atividade fotodinâmica da formulação AICIPc lipossomal foi estabelecido em culturas em monocamada (2D) de linhagens de melanoma humano em diferentes fases de progressão tumoral – WM1552C (radial), WM278 (vertical) e WM1617 (metastática). A metodologia empregada para quantificar a porcentagem de células vivas foi o ensaio colorimétrico de MTT, descrito detalhadamente na seção III item 10.

8.1. Citotoxicidade da formulação lipossomal

Para determinar se a formulação lipossomal era inerte ou não, as células foram incubadas por 3 horas com lipossomas vazios, ou seja, preparados sem o fármaco AICIPc. Os resultados estão representados no Gráfico 4, e mostram que as vesículas lipossomais são completamente inertes, do ponto de vista de toxicidade, em células de melanoma humano WM1552C, WM278 e WM1617.

Gráfico 4. Porcentagem de células vivas após incubação com formulação lipossomal “vazia”. Os experimentos foram realizados na ausência de irradiação luminosa com as células de melanoma humano **WM1552C**, **WM278**, **WM1617**, sendo as porcentagens de células vivas respectivamente 98,1 %; 92,0 % e 96,1 %, sendo $n=3$, $p > 0,05 \pm SE$ com relação ao controle (células mantidas em condições padrão de cultivo).

8.2. Citotoxicidade da AICIPc lipossomal no escuro

Com a confirmação de que as vesículas lipossomais não apresentam efeito tóxico às células de melanoma humano estudadas, iniciaram-se os estudos de determinação da concentração máxima na qual não haja toxicidade da formulação AICIPc lipossomal no escuro. Primeiramente, foram realizados os estudos com concentrações de $1,16 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $0,58 \mu\text{g.mL}^{-1}$ com um tempo de incubação de 3 horas (Gráficos 5 e 6). No entanto, como se pode observar, sob essas condições o sistema mostrou-se tóxico para as três linhagens de melanoma.

Gráfico 5. Porcentagem de células vivas tratadas com AICIPc lipossomal $1,16 \mu\text{g.mL}^{-1}$ no escuro. Os experimentos foram realizados com as células de melanoma humano **WM1552C**, **WM278** e **WM1617** sendo as porcentagens de células vivas respectivamente 59,8 %; 68,9 %; 60,3 %; sendo $n=3$, $p < 0,01 \pm \text{SE}$ com relação ao controle (células mantidas em condições padrão de cultivo).

Gráfico 6. Porcentagem de células vivas tratadas com AICIPc lipossomal $0,58 \mu\text{g.mL}^{-1}$ no escuro. Os experimentos foram realizados com as células de melanoma humano **WM1552C**, **WM278** e WM1617, sendo as porcentagens de células vivas respectivamente 74,6 %; 87,5 %; 85,3 %; sendo $n=3$, $p < 0,05 \pm \text{SE}$ com relação ao controle (células mantidas em condições padrão de cultivo).

Com base nos resultados obtidos, reduziu-se a concentração da AICIPc nos lipossomas para $0,29 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e variando o tempo de incubação para cada linhagem em particular. Dessa forma foram obtidas as condições ideais de tratamento para o sistema na ausência de estímulo luminoso. (Gráficos 7, 8 e 9).

Gráfico 7. Porcentagem de células vivas, **WM1552C**, após 1 h de incubação com AICIPc lipossomal $0,29 \mu\text{g.mL}^{-1}$ no escuro. As porcentagens de células vivas no controle (zero – 0) e no tratado (0.29) foram respectivamente 100% e 90,4%, sendo $n=3$, $p>0,05 \pm \text{SE}$.

Gráfico 8. Porcentagem de células vivas, **WM278**, após 2 h de incubação com AICIPc lipossomal $0,29 \mu\text{g.mL}^{-1}$ no escuro. As porcentagens de células vivas no controle (zero – 0) e no tratado (0.29) foram respectivamente 100% e 96,7%, sendo $n=3$, $p>0,05 \pm \text{SE}$.

Gráfico 9. Porcentagem de células vivas, **WM1617**, após 3 h de incubação com AICIPc lipossomal $0,29 \mu\text{g.mL}^{-1}$ no escuro. As porcentagens de células vivas no controle (zero – 0) e no tratado (0.29) foram respectivamente 100% e 96,1%, sendo $n=3$, $p>0,05 \pm \text{SE}$.

Assim, com base nos resultados descritos acima, foram estabelecidas as condições ideais de tratamento para cada linhagem de melanoma humano de acordo com os padrões estabelecidos pelos protocolos de TFD, obedecendo ao principal requisito de um bom fármaco fotossensível que é a ausência de toxicidade no escuro. Dessa forma, todas as três linhagens seriam tratadas com $0,29 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de AICIPc lipossomal e para cada uma haveria um tempo de incubação específico: células em fase radial de progressão tumoral, WM1552C, 1 hora; células em fase vertical de progressão, WM278, 2 horas; e finalmente as células metastáticas WM1617 que seriam incubadas por 3 horas. Este tipo de protocolo foi estabelecido uma vez que a linhagem WM1552C apresentou toxicidade após o tratamento com $0,29 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de AICIPc lipossomal por 2 e 3 horas de incubação, com taxas de morte celular por volta de 20% (gráfico não apresentado), enquanto que a linhagem WM278 também apresentou taxa de mortalidade em torno de 20% após 3 horas de incubação com a formulação AICIPc lipossomal $0,29 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (gráfico não apresentado).

8.3. Citotoxicidade da AICIPc lipossomal após irradiação com laser

Definidas as condições de tratamento segundo parâmetros aplicáveis em TFD, realizaram-se ensaios com a formulação AICIPc lipossomal, com concentrações previamente definidas no item 8.2, empregando as três linhagens de melanoma humano anteriormente apresentadas, agora sob irradiação com laser em 674 nm, de acordo com o item 9, na seção III. Três diferentes doses de irradiação foram testadas: 70 mJ.cm^{-2} , 140 mJ.cm^{-2} e 700 mJ.cm^{-2} , comprovando-se pelos resultados obtidos (Gráficos 10, 11 e 12), a eficácia do tratamento *in vitro*. As respostas foram satisfatórias nos três estágios de progressão do melanoma, sendo que as células menos agressivas, de crescimento radial, WM1552C apresentaram a maior taxa de morte, 90 % com a maior dose de irradiação, 700 mJ.cm^{-2} . Sob as mesmas condições experimentais, as outras duas linhagens apresentaram taxas de morte celular em torno de 80 %.

Gráfico 10. Porcentagem de células vivas, **WM1552C**, após 1 h de incubação com AICIPc lipossomal $0,29 \mu\text{g.mL}^{-1}$, seguida de irradiação com laser em diferentes doses de energia. As porcentagens de células vivas foram respectivamente 90,4 %; 64,5 %; 41,0 %; 10,0 % para doses (em mJ.cm^{-2}): 0, 70, 140 e 700, sendo $n=3$, $p<0,001 \pm \text{SE}$.

Gráfico 11. Porcentagem de células vivas, **WM278**, após 2 h de incubação com AICIPc lipossomal $0,29 \mu\text{g.mL}^{-1}$, seguida de irradiação com laser em diferentes doses de energia. As porcentagens de células vivas foram respectivamente 96,7 %; 52,2 %; 37,3 % e 22,8 % para doses (em mJ.cm^{-2}): 0, 70, 140 e 700, sendo $n=3$, $p<0,001 \pm \text{SE}$.

Gráfico 12. Porcentagem de células vivas, **WM1617**, após 3 h de incubação com AICIPc lipossomal $0,29 \mu\text{g.mL}^{-1}$, seguida de irradiação com laser em diferentes doses de energia. As porcentagens de células vivas foram respectivamente 96,1%; 50,1%; 33,3%; 19,6 % para doses (em mJ.cm^{-2}): 0, 70, 140 e 700, sendo $n=3$, $p<0,001 \pm \text{SE}$.

9. Avaliação da morte celular induzida pelo tratamento

Após o *screening* e padronização das condições de tratamento, e considerando os resultados promissores obtidos com os ensaios de citotoxicidade *in vitro*, na presença de irradiação com laser, iniciou-se a investigação do tipo de morte celular induzida pelo tratamento com AICIPc lipossomal em TFD. Para tanto, foram realizadas marcações *in vitro*, em cultura de células em monocamada, com dois diferentes fluoróforo: anexina V e iodeto de propídeo, como descrito na seção III item 11. A anexina V se liga especificamente ao resíduo de fosfatidilserina exposto na membrana plasmática após liberação do citocromo c da mitocôndria, sendo um evento inicial da apoptose. Por outro lado, o iodeto de propídeo é um corante vital que intercala no DNA genômico quebrado, processo este característico da necrose celular (LEIST; NICOTERA, 1997).

No primeiro estudo, as células de melanoma em fase de progressão radial, WM1552C foram tratadas com AICIPc lipossomal, irradiadas com 700 mJ.cm^{-2} e após 24 horas marcadas apenas com anexina V conjugada com Alexa 568. Como é possível observar na Figura 16B, as células tratadas apresentaram marcação positiva para anexina V, indicando que para esta linhagem, um dos processos de morte induzida pelo tratamento é a apoptose. As células tratadas e mantidas no escuro não apresentaram marcação (Figura 16A). Além da marcação positiva para anexina V pode-se observar

outro indício de apoptose pela morfologia arredondada das células com a presença de corpos apoptóticos (Figura 16C).

- **Células WM 1552 C**

Figura 16. Células **WM1552C** marcadas com anexina V conjugada com Alexa 568. Em **(A)** Células mantidas no escuro; em **(B)** Células tratadas com AIClPc lipossomal $0,29 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e irradiadas com 700 mJ.cm^{-2} . Objetiva 40X; **(C)** Morfologia das células em apoptose após o tratamento.

Com relação à linhagem WM278 os resultados obtidos (Figura 17) foram muito semelhantes aos das células WM1552C.

- Células WM278

Figura 17. Células **WM278** marcadas com anexina V conjugada com Alexa 568. Em **(A)** Células mantidas no escuro; em **(B)** Células tratadas com AICPc lipossomal $0,29 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e irradiadas com 700 mJ.cm^{-2} . Objetiva 40X; **(C)** Morfologia das células em apoptose após o tratamento.

No entanto, para a linhagem metastática WM1617, após observações da resposta celular aos diferentes tratamentos, optou-se por realizar marcações não só nas células tratadas com 700 mJ.cm^{-2} , mas também nas células tratadas com 70 mJ.cm^{-2} .

Observando a morfologia das células WM1617, foi possível verificar que com 70 mJ.cm^{-2} , haviam células vivas aderidas na placa, além de células mortas com morfologia arredondada, típico do processo de apoptose (Figura 19). Por outro lado, nas células tratadas com 700 mJ.cm^{-2} (Figura 20) não haviam células vivas aderidas, mas apenas células aparentemente mortas e com diferentes características, indicando nestas condições a existência de dois processos distintos de morte celular, apoptose e necrose. Dessa forma, para esta linhagem, além da marcação com anexina V, realizamos a marcação com iodeto de propídeo (Figura 21).

- **Células WM1617**

- 1) **Células controle mantidas no escuro**

Figura 18. Células **WM1617** mantidas no escuro. Objetiva 40X; Note a ausência de marcação para anexina V, evidenciando que a formulação AICIPc lipossomal não apresenta qualquer efeito na ausência de irradiação com laser.

2) Células AICIPc lipossomal + irradiação com 70 mJ.cm^{-2}

Figura 19. Células **WM1617** tratadas com AICIPc lipossomal $0,29 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e irradiadas com 70 mJ.cm^{-2} . Em **(A)** marcação com anexina V conjugada com alexa 568, note as células com morfologia arredondada e positivas para anexina V; Objetiva 40X. Em **(B)** apenas o campo claro, notam-se áreas que, mesmo após o tratamento, algumas células apresentam morfologia normal, muito semelhante às células controle (vide fotos das células controle páginas 49 e 51).

3) Células AICIPc lipossomal + irradiação com 700 mJ.cm^{-2}

Figura 20. Células **WM1617** tratadas com AICIPc lipossomal $0,29 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e irradiadas com 700 mJ.cm^{-2} . Em **(A)** marcação com anexina V conjugada com Alexa 568, note o grande número de células com morfologia arredondada e positivas para anexina V; Objetiva 40X. Em **(B)**, apenas o campo claro; note que não há áreas em que existam células com morfologia normal, semelhante às células vivas do controle (o controle corresponde às células mantidas sem AICIPc e sem irradiação, sob condições padrão de cultivo); Objetiva de 10X.

4) Marcação de células necróticas com iodeto de propídeo (PI)

Figura 21. Marcação com iodeto de propídeo (PI). Células **WM1617** tratadas com AICIPc lipossomal $0,29 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Em **(A)** células irradiadas com 700 mJ.cm^{-2} . Objetiva 40X; Em **(B)**, células tratadas com AICIPc lipossomal e irradiadas com 70 mJ.cm^{-2} , apresentando pouca marcação para PI enquanto que as células irradiadas com 700 mJ.cm^{-2} apresentam grande marcação. Objetiva 10X.

Assim, o tratamento fototerapêutico (TFD) com AICIPc lipossomal é capaz de promover a morte celular por apoptose nas três linhagens de progressão do melanoma humano. No entanto, o processo de morte não é exclusivamente este, ocorrendo também a morte por necrose. Isto fica claro nos experimentos com as

células WM1617 marcadas com PI, 24 horas após o tratamento com AICIPc lipossomal e irradiadas com 700 mJ.cm^{-2} . Deve-se ressaltar que as doses de energia de irradiação com laser, usadas nestes estudos, são extremamente baixas e, por si só, não oferecem qualquer efeito sobre as células, o que será comprovado nos estudos realizados com culturas celulares tridimensionais, descritos mais adiante.

10. Quantificação de AICIPc intracelular (uptake)

Os resultados acima descritos foram determinantes para a investigação de mais um parâmetro fundamental para a caracterização do efeito do sistema AICIPc lipossomal em TFD, a quantificação intracelular do fármaco. Estes experimentos, descritos na seção III no item 12, foram realizados de forma qualitativa, por microscopia confocal, e de forma quantitativa, ambos em função do tempo, sendo $T_{\text{máx}} = 3$ horas.

10.1. Resultados obtidos com as células WM1552C

Primeiramente quantificou-se por fluorimetria o fármaco AICIPc intracelular em 5 diferentes tempos de incubação: 10, 30, 60, 120 e 180 minutos, (Gráfico 13). Todos os cálculos foram feitos a partir de uma curva padrão da AICIPc lipossomal, expresso em ng.mL^{-1} , com $R^2 = 0,998$ (Apêndice 2).

De acordo com o Gráfico 13, nas células WM1552C, as quantidades de AICIPc intracelular foram 1,71; 3,60; 6,60; 10,80 e 14,10 ng correspondentes a 10, 30, 60, 120 e 180 minutos. A quantidade inicial de AICIPc em que as células foram expostas, $0,29 \mu\text{g.mL}^{-1}$, que corresponde a 145 ng (as células foram incubadas com 500 μL da formulação $0,29 \mu\text{g.mL}^{-1}$), representa 100 % de uptake celular. Dessa forma, a porcentagem de AICIPc intracelular em $T_{\text{máx}}$ (3 horas) é de 10 %. Já no tempo de incubação de 1 hora, que é o tempo padrão estabelecido para todos os estudos envolvendo a linhagem WM1552C, a quantidade de fármaco AICIPc intracelular foi igual a 6,60 ng, o que corresponde a um uptake de 4,5 %.

Gráfico 13. Quantidade de AICIPc intracelular em ng, **WM1552C**. Em destaque o tempo de incubação e a quantidade do fármaco que correspondente às condições experimentais padronizadas (C_{ex}) para as células **WM1552C**. $C_{inicial} = 0,29 \mu\text{g.mL}^{-1}$
 $C_{ex} = 6,60 \text{ ng}$.

- Detecção do fármaco AICIPc por microscopia confocal

1 hora

Figura 22. Células **WM1552C**; núcleo corado com DAPI (em azul) e na segunda coluna: AICIPc intracelular (vermelho), em verde marcação citoplasmática com Cell Tracker CFSE; em (S) sobreposição das imagens. No que no tempo de 1 h o fármaco está difuso por toda extensão do citoplasma celular. $C_{AICIPc} = 0,29 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

2 horas

Figura 23. Células **WM1552C**; núcleo corado com DAPI (em azul) e na segunda coluna: AICIPc intracelular (vermelho), em verde marcação citoplasmática com Cell Tracker CFSE; em (S) sobreposição das imagens. Note que no tempo de 2 h o fármaco está difuso por todo o citoplasma celular, com acúmulo preferencial na região perinuclear, sem que haja incorporação no núcleo. $C_{AICIPc} = 0,29 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

2 horas

Figura 24. Células **WM1552C**; detalhe sobreposição das imagens. Note o acúmulo preferencial do fármaco na região perinuclear (setas). $C_{\text{AICIPc}} = 0,29 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

3 horas

Figura 25. Células **WM1552C**; núcleo corado com DAPI (em azul) e na segunda coluna: AICIPc intracelular (vermelho), em verde marcação citoplasmática com Cell Tracker CFSE; em (S) sobreposição das imagens. Note a morfologia arredondada das células após 3 horas de incubação. $C_{\text{AICIPc}} = 0,29 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

10.2. Resultados obtidos com as células WM278

Assim como as células WM1552C, procedemos da mesma maneira com as células WM278 (curva padrão, $R^2 = 1,0$; Apêndice 3). De acordo com o gráfico abaixo, nas células WM278, as quantidades de AICIPc intracelular foram 1,94; 3,21; 6,46; 13,90 e 19,80 ng correspondentes a 10, 30, 60, 120 e 180 minutos, sendo a porcentagem de AICIPc intracelular em T máx (3 horas) de 13,6 %. Já no tempo de incubação de 2 hora, que é o tempo padrão estabelecido para todos os estudos com a linhagem WM278, a quantidade de fármaco AICIPc intracelular foi igual a 13,90 ng, o que corresponde a um uptake de 9,6 %.

Gráfico 14. Quantidade de AICIPc intracelular em ng, **WM278**. Em destaque o tempo de incubação e a quantidade do fármaco que correspondente às condições experimentais padronizadas (C_{ex}) para as células **WM278**, $C_{inicial} = 0,29 \mu\text{g.mL}^{-1}$ $C_{ex} = 13,90 \text{ ng}$.

- Detecção do fármaco AICIPc por microscopia confocal

Figura 26. Células **WM278**; núcleo corado com DAPI (em azul) e na segunda coluna: AICIPc intracelular (vermelho). No que no tempo de 1 h o fármaco está difuso por toda extensão celular. Já no tempo de 3 h, o fármaco apresenta um padrão de agregação vesicular no citoplasma (em destaque – setas verdes). $C_{\text{AICIPc}} = 0,29 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

Células WM278 em condições experimentais padrão de tratamento

Figura 27. Células **WM278** após 2 h de incubação com AICIPc lipossomal. Sobreposição e ampliação de imagens, núcleo corado com DAPI (em azul) e AICIPc em vermelho. Em destaque, o padrão de agregação vesicular do fármaco no citoplasma (setas verdes). $C_{\text{AICIPc}} = 0,29 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

10.3. Resultados obtidos com as células WM1617

Seguindo os mesmos procedimentos descritos anteriormente. As quantificações de AICIPc por fluorimetria estão expressas no Gráfico abaixo e foram calculadas a partir de uma curva padrão (Apêndice 4) cujo valor de $R^2 = 0,999$. As quantidades de AICIPc intracelular foram 1,71; 3,42; 5,77; 9,80 e 15,10 ng correspondentes à 10, 30, 60, 120 e 180 minutos, sendo a porcentagem de AICIPc intracelular em T máx (3 horas) de 10,4 %. Este também é o tempo padrão estabelecido para todos os estudos envolvendo a linhagem WM1617.

Gráfico 15. Quantidade de AICIPc intracelular em ng, **WM1617**. Em destaque o tempo de incubação e a quantidade do fármaco que correspondente às condições experimentais padronizadas (C_{ex}) para as células **WM1617**, $C_{inicial} = 0,29 \mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ $C_{ex} = 15,10 \text{ ng}$.

- Detecção do fármaco AlClPc por microscopia confocal

1 hora

Figura 28. Células **WM1617** após 1 h de incubação com AlClPc lipossomal. Note o padrão de distribuição intracelular do fármaco, em vermelho, difuso pelo citoplasma. $C_{\text{AlClPc}} = 0,29 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

2 horas

Figura 29. Células **WM1617** após 2 h de incubação com AICIPc lipossomal. Note o padrão de distribuição intracelular do fármaco, em vermelho, agregado no citoplasma em forma de vesículas. $C_{\text{AICIPc}} = 0,29 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

3 horas

Células WM1617 em condições experimentais padrão de tratamento

Figura 30. Células **WM1617** após 3 h de incubação com AICIPc lipossomal. Note o padrão de distribuição intracelular do fármaco, em vermelho, com maior tendência de agregação citoplasmática perinuclear (seta verde). Na seta amarela o limite do citoplasma celular. $C_{\text{AICIPc}} = 0,29 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

11. Transdução de fibroblastos CCD27SK com vetor lentiviral

Além da obtenção de colágeno tipo I para a montagem das culturas tridimensionais, outras ferramentas foram desenvolvidas para a montagem dos modelos de co-cultivo celular. Uma destas ferramentas foi a obtenção de fibroblastos fluorescentes por transdução de GFP. O objetivo de tornar os fibroblastos fluorescentes é poder diferenciá-los das demais células em experimentos que envolvam co-cultivo. A transdução foi feita em cultura de fibroblastos de derme humana CCD27SK, a partir do sobrenadante de células HEK293T infectadas com lentivírus que incorporaram o gene que codifica a GFP (Figura 31), de acordo com o protocolo descrito na seção III no item 5. Estes experimentos foram realizados no Hemocentro de Ribeirão Preto, no Laboratório de Transferência Gênica, sob supervisão da Dra. Aparecida Fontes.

Figura 31. Ensaio de transfecção. Células **HEK293T** transfectadas com plasmídeos que carregam o gene que codifica a GFP para posterior infecção das mesmas com lentivírus.

Assim, as células CCD27SK foram infectadas com os lentivírus provenientes da cultura de células HEK293T sendo a eficiência de transdução no processo muito satisfatória, em torno de 80 %. As células fluorescentes foram separadas por citometria de fluxo.

Figura 32. Transdução de células **CCD27SK** com lentivírus. Em **(A)** expressão de GFP 2 dias após a transdução, em **(B)** com 5 dias e em **(C)** com 6 dias após o experimento.

Os fibroblastos transduzidos, separados por citometria de fluxo, foram novamente colocados em cultura com o objetivo de expandir a cultura de células fluorescentes em número suficiente para fazer os estoques congelados. Isto é possível devido ao fato de que, durante o processo de transdução, os fibroblastos que incorporaram o genoma viral com o gene que codifica GFP, passam essa

“informação” para as células filhas, assim, todos os fibroblastos cultivados novamente serão fluorescentes.

No entanto, no projeto em questão não foi possível a construção de matrizes 3D mistas com estes fibroblastos fluorescentes, pois, como será mostrado mais adiante, as culturas 3D foram analisadas por histologia e para isto as amostras foram incluídas em parafina, que não permite a visualização de material fluorescente. Foram feitos cortes por congelamento, o que permitiria a visualização do material fluorescente. No entanto as amostras não resistiram ao processo e os cortes não ficaram uniformes.

12. Potencial anti-metastático do sistema AICIPc lipossomal em TFD

Um dos maiores obstáculos para a aplicação da TFD no tratamento do melanoma humano é o grande potencial invasivo e metastático deste tipo de neoplasia, o que faz com que a única alternativa de tratamento para este tipo de câncer de pele seja a remoção cirúrgica. Baseado nisto, resolveu-se testar a efetividade do sistema AICIPc lipossomal/TFD, em um modelo de cultura celular que mimetize as metástases da neoplasia *in vitro* (VULTUR A., et al., 2008; SMALLEY et. al., 2008).

Este modelo é baseado na capacidade das células metastáticas, no caso as células WM1617, em formar colônias celulares, isto é, simulando o que ocorre *in vivo*, quando as células cancerosas perdem a ancoragem com a matriz extracelular e passam a colonizar outros tecidos (metástases). Estes modelos de cultura 3D, ancoragem – independente, são feitos em matriz de soft agar como descrito na seção III no item 8.2. Os modelos foram montados e após três dias de cultivo realizaram-se os tratamentos com AICIPc lipossomal $0,29 \mu\text{g.mL}^{-1}$ por 3 horas, seguido ou não de irradiação com laser. As culturas foram fotografadas e acompanhadas durante 30 dias (Figuras 33, 34 e 35).

- 2 dias após o tratamento

Figura 33. Formação de colônias de células **WM1617** em matriz de soft agar após 2 dias do tratamento (5^o dia de cultivo). Nota-se que as culturas incubadas com AlCIPc 0,29 μg.mL⁻¹ + 700 mJ.cm⁻² ainda não apresentam formação de colônias como os controles (AlCIPc 0,29 μg.mL⁻¹ escuro e; 700 mJ.cm⁻² sem AlCIPc).

- 12 dias após o tratamento

Figura 34. Formação de colônias de células **WM1617** em matriz de soft agar após 12 dias do tratamento (15^o dia de cultivo). Nota-se a formação de grandes colônias celulares nos controles (AICIPc 0,29 μg.mL⁻¹ escuro e; 700 mJ.cm⁻² sem AICIPc) em relação às poucas e pequenas colônias formadas nas culturas tratadas com AICIPc 0,29 μg.mL⁻¹ + 700 mJ.cm⁻².

- 28 dias após o tratamento

Figura 35. Formação de colônias de células **WM1617** em matriz de soft agar após 28 dias do tratamento (30^o dia de cultivo). Nota-se a formação de grandes colônias celulares nos controles (AICIPc escuro e; 700 mJ.cm⁻² sem AICIPc) em relação às poucas e pequenas colônias formadas nas culturas tratadas com AICIPc + 700 mJ.cm⁻².

É nítido o potencial anti-metastático do sistema AICIPc lipossomal/TFD segundo os resultados obtidos com os ensaios no modelo 3D em soft agar. As fotos acima deixam claro que, mesmo após 30 dias, as culturas tratadas apresentam poucas colônias celulares sendo estas muito menores do que as colônias formadas nos dois

experimentos-controle: culturas mantidas no escuro e culturas não tratadas com AICIPc lipossomal mas apenas irradiadas com 700 mJ.cm^{-2} .

13. Avaliação da resposta terapêutica do sistema AICIPc lipossomal em TFD em culturas 3D mistas em matriz de colágeno

Visando avaliar não só o fenótipo metastático, mas, além disso, a relação existente entre dois tipos distintos de células, neste caso, fibroblastos de derme e células metastáticas de melanoma humano (WM1617), foi fundamental a montagem de um modelo de co-cultivo tridimensional em uma matriz de colágeno. Assim, além de mimetizar *in vitro* a condição de metástases em que as células se livram da adesão ao substrato (matriz extracelular) e colonizam outros órgãos, a presença de fibroblastos em uma matriz 3D, torna o modelo ainda mais próximo das reais condições de progressão da neoplasia *in vivo*, uma vez que os fibroblastos sintetizam proteínas como o colágeno e a elastina, além das glicosaminoglicanas e glicoproteínas multiadesivas que farão parte da matriz extracelular. Além disso, os fibroblastos também estão envolvidas na produção de **fatores de crescimento**, que controlam o **crescimento** e a **diferenciação** das demais células que constituem a pele. (COLIGE et al., 1992; CHAUSSAIN et al., 2002).

Três dias após a montagem dos modelos (de acordo com o protocolo descrito na seção III no item 8.1), as culturas foram submetidas aos seguintes tratamentos: **controle (CT)**: cultura mantida sob condições padrão de cultivo; **laser (LA)**: cultura apenas irradiada com laser 700 mJ.cm^{-2} ; **escuro (E)**: cultura apenas incubada com AICIPc lipossomal $0,29 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$ por 3 horas; **70 mJ.cm⁻²**, **140 mJ.cm⁻²** e **700 mJ.cm⁻²**: culturas incubadas com AICIPc lipossomal $0,29 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$ por 3 horas e irradiadas com as respectivas doses de energia. As culturas foram fotografadas e acompanhadas por 14 dias (Figuras 36, 37 e 38).

Após o primeiro dia de tratamento (Figura 36), que corresponde ao 4º dia de cultivo, não é possível observar qualquer diferença entre as culturas tratadas com o sistema AICIPc lipossomal/TFD e as culturas controles. Todas as culturas apresentam a formação de uma rede tridimensional de fibroblastos na matriz de colágeno (setas pretas), enquanto que as células de melanoma se encontram dispersas não sendo possível identificá-las ainda.

No entanto, a partir de 7 dias após o tratamento (10º dia de cultivo) já se pode notar a diferença entre as variáveis (Figura 37). As culturas **CT** (controle), **LA** (700

mJ.cm⁻²), **E** (AICIPc lipossomal no escuro) e **AICIPc lipossomal + 70 mJ.cm⁻²** com aspectos bem semelhantes, passam a apresentar alguns aglomerados de células pigmentadas por cima das redes de fibroblastos na matriz de colágeno. Na verdade, estes aglomerados correspondem às células de melanoma humano WM1617 começando a formar as colônias típicas do processo de metastáses. Por outro lado, a cultura tratada com **AICIPc lipossomal + 140 mJ.cm⁻²** apresenta apenas alguns pontos de células pigmentadas e a cultura **AICIPc lipossomal + 700 mJ.cm⁻²** não apresenta nenhum ponto ou aglomerado de células pigmentadas, apenas as redes de fibroblastos na matriz de colágeno.

Com 14 dias após o tratamento, (17 dias de cultivo), as diferenças entre as culturas ficam ainda mais evidentes (Figura 38). Na verdade, as maiores diferenças são notadas na cultura tratada com **AICIPc lipossomal + 140 mJ.cm⁻²**, que apresenta poucas e menores colônias; e principalmente na cultura tratada com **AICIPc lipossomal + 700 mJ.cm⁻²** que não apresentou formação de colônias de células de melanoma humano.

1 dia após o tratamento

Figura 36. Culturas mistas de fibroblastos e células **WM1617** em matriz de colágeno 3D, 1 dia após o tratamento. **CT** (controle); **LA** (laser); **E*** (escuro); **70*** (70 mJ.cm^{-2}); **140*** (140 mJ.cm^{-2}); **700*** (700 mJ.cm^{-2}). ***AICIPc lipossomal** = $0,29 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Nota-se a formação de fibroblastos em “rede tridimensional” (setas pretas) sem que ainda seja evidente a distinção entre as células de melanoma humano e a matriz tridimensional.

7 dias após o tratamento

Figura 37. Culturas mistas de fibroblastos e células **WM1617** em matriz de colágeno 3D, 7 dias após o tratamento. **CT** (controle); **LA** (laser); **E*** (escuro); **70*** (70 mJ.cm⁻²); **140*** (140 mJ.cm⁻²); **700*** (700 mJ.cm⁻²). ***AICIPc lipossomal = 0,29 μg.mL⁻¹**. Nota-se o início da formação de colônias pigmentadas de células metastáticas de melanoma humano WM1617 (em destaque – setas vermelhas) logo acima da rede tridimensional de fibroblastos.

14 dias após o tratamento

Figura 38. Culturas mistas de fibroblastos e células **WM1617** em matriz de colágeno 3D. 14º dia após o tratamento. **CT** (controle); **LA** (laser); **E*** (escuro); **70*** (70 mJ.cm⁻²); **140*** (140 mJ.cm⁻²); **700*** (700 mJ.cm⁻²). ***AlCIPc lipossomal** = 0,29 μg.mL⁻¹. Nota-se a formação de colônias pigmentadas bem características de células metastáticas de melanoma humano WM1617 (em destaque – setas vermelhas) logo acima da rede tridimensional de fibroblastos.

Assim, realizou-se uma análise mais precisa, processando algumas culturas (**LA, E e AICIPc lipossomal + 700 mJ.cm⁻²**) pela técnica histológica de inclusão em parafina e posterior coloração dos cortes por hematoxilina e eosina. Esta técnica permitiu uma visualização mais abrangente do tecido (vários cortes de várias regiões e com ângulos diferentes) além de ser mais minuciosa com relação à morfologia das células permitindo uma melhor identificação do material.

As análises histológicas (Figuras 39, 40 e 41) corroboram com os dados obtidos pela microscopia direta das matrizes 3D (Figuras 36 a 38). É possível identificar o grande número de colônias de células de melanoma formadas na cultura incubada com AICIPc lipossomal que permaneceu no escuro (**E**) e na cultura não tratada com o fármaco mas apenas irradiada com 700 mJ.cm⁻² (**LA**) (Figura 39A e 39B; Figura 40A e 40B), em contrapartida, na cultura tratada com **AICIPc lipossomal e irradiada com 700 mJ.cm⁻²**, não se observa a formação de colônias de células de melanoma, mas apenas as redes de fibroblastos dispersas na matriz de colágeno (Figura 39C).

Nas culturas não tratadas com o sistema AICIPc lipossomal/TFD, pode-se identificar a ampla distribuição das colônias de células metastáticas tanto na superfície como no meio da matriz de colágeno (Figura 41A), o que é característico de células potencialmente invasivas. Com relação à morfologia, identificam-se colônias celulares grandes e bem delimitadas (Figura 41B).

Figura 39. Corte histológico de culturas 3D mistas de fibroblastos (setas pretas) e células de melanoma humano **WM1617** (setas vermelhas). Objetiva 10X. Coloração hematoxilina-eosina.

Figura 40. Corte histológico de culturas 3D mistas de fibroblastos (setas pretas) e células de melanoma humano **WM1617** (setas vermelhas). Objetiva 40X. Coloração hematoxilina-eosina.

Figura 41. Corte histológico de culturas 3D mistas de fibroblastos (setas pretas) e células de melanoma humano **WM1617** (setas vermelhas). Objetiva 40X. Coloração hematoxilina-eosina.

V. DISCUSSÃO

O melanoma maligno é o tipo de câncer de pele com pior prognóstico, devido à sua elevada probabilidade de originar metástases e se disseminar para outros órgãos. Apesar dos significantes progressos científicos no entendimento da biologia e genética do melanoma, nenhum tratamento efetivo contra esse tipo de câncer está atualmente disponível (VILLANUEVA; HERLYN, 2008; MUHRER, 2009). Sob estes aspectos, são de fundamental importância as pesquisas e estudos de novas estratégias terapêuticas para este tipo de neoplasia.

1. Discussão dos resultados acerca do desenvolvimento de lipossomas, estudos de tamanho, estabilidade e homogeneidade da formulação

O efeito dos fármacos fotossensíveis aplicáveis em TFD não é governado apenas pelas suas propriedades fotoquímicas e/ou fotofísicas, mas também pela especificidade de suas interações com os sistemas biológicos (KESSEL, 1984; BONNETT et al., 1989). Contudo, a localização preferencial do fármaco no tecido tumoral é fator determinante que afeta não só a terapêutica, mas também o mecanismo que leva à destruição do tumor. O aumento da seletividade aos tecidos tumorais é um dos principais objetivos dentro da TFD, o que pode ser conseguido pelo uso de sistemas de liberação de fármacos como os lipossomas, nanoemulsões e microesferas (ZHOU, 1989; JORI, 1992; PRIMO et. al., 2008).

O uso de lipossomas como vetor de quimioterápicos abrem grandes perspectivas para o tratamento do câncer, pois são sistemas altamente versáteis já que suas propriedades físicas e químicas podem ser alteradas de acordo com requisitos farmacotécnicos e farmacológicos, de modo a permitir o direcionamento específico e a liberação sustentada e controlada do fármaco encapsulado (SAPRA et al., 2006). Essas características conferem aos lipossomas maior eficácia terapêutica em relação a outras formas farmacêuticas. O fármaco encapsulado apresenta diminuição significativa da toxicidade e das interações medicamentosas, maior tempo de permanência na circulação, no caso de lipossomas revestidos com polietilenoglicol, e menor ocorrência de processos inflamatórios em resposta às drogas (PAPAHADJOPOULOS et al., 1991; FRANK, 1993; BLOCK, 2006).

Neste trabalho, a incorporação da AICIPc no sistema de liberação lipossomal foi facilmente conseguida pelo método empregado. Os lipossomas apresentaram tamanho nanométrico, 110 nm, dentro da faixa esperada para este tipo de vesícula

(LASIC, 1993; SCARPA et al., 1998). No entanto, a formulação se mostrou estável por apenas dez dias, o que já era esperado de acordo com o valor do potencial zeta encontrado, -8,2 mV. Este parâmetro é capaz de prever a estabilidade de suspensões coloidais, sendo que formulações estáveis apresentam valores menores que - 30 mV ou maiores que + 30 mV. (HUNTER, 1981; WONGSAGONSUP et al., 2005).

Com relação à homogeneidade, o baixo valor de polidispersividade encontrado, 0,227, sugere que a distribuição do tamanho das vesículas formadas na formulação é homogênea e monodispersa (KÜLKAMP et al., 2009).

2. Discussão dos resultados fotoquímicos e fotofísicos da formulação AICIPc lipossomal.

A formulação AICIPc lipossomal apresentou o mesmo perfil espectral observado no padrão usado como referência, AICIPc em etanol, e absorção dentro da região de máxima penetração da luz nos tecidos, (674 nm), característica fundamental de um bom fármaco fotossensível e essencial para a sua aplicação em TFD (FISHER et al., 1995). Com relação à fluorescência, pode-se observar um pequeno deslocamento no máximo de emissão quando se compara a formulação lipossomal com o padrão em etanol. Este fenômeno é chamado de efeito batocrômico, que na verdade consiste em um deslocamento da banda de emissão da molécula em questão, para uma região de menor energia. Isto ocorre devido à interação da AICIPc com os fosfolípidos das vesículas lipossomais, sendo associado a menor polaridade dos lipossomas (NETTO-FERREIRA et al., 1999). De forma geral, pode-se dizer que a incorporação da AICIPc em lipossomas não alterou significativamente suas propriedades no estado estacionário. Apesar do deslocamento de emissão de fluorescência para 685 nm, esta faixa de emissão ainda está dentro do desejável para TFD.

O rendimento quântico de fluorescência (Φ_F) é uma propriedade fotofísica de grande importância para determinar se o fármaco fotossensível é um bom produtor de oxigênio singleto (1O_2). Compostos altamente fluorescentes usualmente são pouco eficientes como agentes fotodinâmicos, uma vez que é baixa a produção de estados excitados tripleto formados pelo processo de cruzamento intersistemas, o que resulta em baixos processos de transferência de energia entre o estado excitado tripleto e o oxigênio molecular, produzindo pouco 1O_2 (DYSART et al., 2005). No

entanto, nem sempre um composto pouco fluorescente dissipa o excedente de energia e atinge o estado tripleto. Neste caso, também pode ocorrer a convergência interna de S_1 para S_0 produzindo calor (TURRO, 1978). O valor de Φ_F da formulação lipossomal AICIPc, 0,35, está dentro do esperado para fármacos fotossensíveis úteis em TFD, como é o caso do padrão utilizado, a Ftalocianina de Zinco (ZnPc) em etanol, cujo valor de Φ_F nos experimentos realizados foi igual a 0,28. Além disso, a encapsulação da AICIPc em vesículas lipossomais não alterou este parâmetro, pois o Φ_F da AICIPc em meio homogêneo (DMSO) é igual a 0,34 (IDOWU; NYOKONG, 2007).

Já o decaimento biexponencial observado para a formulação em questão é característico da heterogeneidade do sistema lipossomal. Os dois tempos de vida do singlete encontrados, 6,35 ns e 0,85 ns, podem ser atribuídos às moléculas de AICIPc localizadas em diferentes ambientes químicos das vesículas lipossomais, distribuídas em áreas com diferentes propriedades físico-químicas, isto é, na parte interna e na parte externa da bicamada fosfolipídica. Resultados similares são relatados para muitos outros fármacos fotossensíveis hidrofóbicos, tais como os derivados de fenotiazinas incorporados em diferentes meios micro-heterogêneos como os lipossomas (VISWANATHAN; NATARAJAN, 1996; BALASUBRAMANIAM; NATARAJAN, 1997). No entanto, os resultados obtidos neste trabalho, levam a crer que o tempo de vida do singlete de 0,85 ns, é muito pequeno e de baixa relevância com relação ao outro tempo de vida encontrado, 6,35 ns, podendo o tempo de 0,85 ser apenas um resíduo causado pela própria análise dos dados, sem qualquer significado importante.

O oxigênio singlete (1O_2), é o principal agente responsável pela inativação da célula tumoral durante o processo de fotossensibilização na TFD de neoplasias. O 1O_2 formado interage com resíduos de aminoácidos protéicos, sendo mais comum a interação com cisteína, metionina, tirosina, histidina e triptofano (MIDDEN; DAHL, 1992; GRUNE, 2001). O DNA genômico também é oxidado, sendo a guanina o ácido nucléico mais susceptível aos efeitos oxidativos do 1O_2 , (CASTANO et al., 2005). A formulação AICIPc lipossomal apresentou alto valor de rendimento quântico de 1O_2 (Φ_Δ), 0,65, sendo inclusive superior ao padrão feoforbide, 0,59, que é um excelente produtor de 1O_2 . O valor do Φ_Δ da formulação também está bem próximo aos valores

encontrados para outras ftalocianinas úteis em TFD, como a ZnPc que em etanol apresenta Φ_{Δ} igual a 0,67 (IDOWU; NYOKONG, 2007).

No entanto, a fototoxicidade das ftalocianinas não se limita apenas à produção de $^1\text{O}_2$ como espécies reativas de oxigênio. A absorção de elétrons fotoinduzida por biomoléculas apropriadas leva às reações de transferência de elétrons, que resultam na produção de radicais livres que podem atuar simultaneamente com a produção de oxigênio singleto, pelo processo do Tipo II e também com a produção de outras espécies reativas de oxigênio (EROS), pelo processo do Tipo I (VIOLA et al., 1998). Assim, moléculas que apresentam uma vida média mais longa no estado excitado tripleto, (na ordem de μs), podem reagir com outras espécies, aumentando a eficiência do processo de fotossensibilização (ROSENTHAL et al., 1995; MA; JIANG; 2001). Os resultados obtidos com a formulação AICIPc lipossomal, mostram a presença de uma espécie transiente que decai monoexponencialmente com um tempo de vida tripleto (τ_{T1}) igual a 2,63 μs , o que sugere a possibilidade de uma fotoeficiência não só na produção de $^1\text{O}_2$ como também de outras espécies reativas de oxigênio, o que aumentaria a ação fotodinâmica da formulação por gerar maiores quantidades de espécies reativas citotóxicas nas células tumorais.

3. Discussão da atividade biológica da formulação AICIPc lipossomal em cultura em monocamada (2D) de células de melanoma humano em diferentes fases de progressão tumoral.

Os estudos *in vitro*, com células de melanoma humano (2D) em diferentes fases de progressão da neoplasia, serviram como um excelente modelo para testes iniciais da formulação, pois, embora existam diferenças entre linhagens imortalizadas e o que ocorre *in vivo*, a cultura 2D é uma ferramenta muito simples de ser utilizada, permitindo o conhecimento de diversos mecanismos celulares, moleculares e de resposta à drogas (FRESHNEY et. al., 1986; PERSIANI; LARGER, 2006).

A caracterização da formulação lipossomal AICIPc juntamente com os estudos fotofísicos e fotoquímicos foram fundamentais para iniciar a caracterização da atividade biológica, *in vitro*, do sistema proposto, no entanto, as formulações úteis em TFD de neoplasias devem preencher alguns critérios a mais do que os demais

agentes fotossensibilizantes. Primeiramente, as vesículas lipossomais devem ser biocompatíveis e livres de toxicidade, além disso, é de fundamental importância a rápida absorção da formulação pelo organismo com baixo ou nenhum efeito tóxico na ausência de irradiação com laser (GREGORIADIS, 1984; HENDERSON; DOUGHERTY, 1992; ASTIER, 2006).

No que diz respeito aos parâmetros citados acima, a formulação AICIPc lipossomal preencheu, todos os requisitos necessários para um bom fármaco fotossensível em TFD nos testes *in vitro*, com as três linhagens de melanoma humano, apresentando vesículas lipossomais biocompatíveis, cuja toxicidade não ultrapassou 8,0%, e ausência de efeito tóxico no escuro, sendo a maior taxa de morte celular, 9,6%, apresentada pela linhagem de crescimento radial WM1552C.

O efeito farmacológico da formulação na presença de irradiação com laser em 674 nm foi extremamente satisfatório nas três linhagens testadas, sendo mais pronunciado nas células de crescimento radial WM1552C, com 90% de morte celular. As linhagens de crescimento vertical, WM278, e metastático, WM1617, apresentaram taxas de morte em torno de 80%. Esta diferença com relação à linhagem de progressão primária WM1552C já era esperada, uma vez que quanto maior o grau de malignidade das células, menor é a resposta frente ao tratamento quimioterápico (SCHERPHOF; CZARNETZKI, 1994; McCLAY et al., 1996; SERRONE; HERSEY, 1999; MERIC et al., 2003). É importante lembrar que o melanoma é um tipo de câncer que apresenta resistência a diversos tipos de quimioterápicos como a cisplatina, a vincristina, a camptotecina, a vindesina, o etoposide, o tamoxifeno e o ácido betulínico (McCLAY et al., 1996; SERRONE; HERSEY, 1999). Os mecanismos de resistência destas células incluem, mutações no gene da proteína p53 (LI et al., 1998), aumento da expressão de *C-MYC* e *BCL-2* (LEONETTI et al., 1999; JANSEN et al., 1998), mutações em oncogenes como *N-RAS* (JANSEN et al., 1997) além de mecanismos de reparo do DNA danificado pelas drogas (RUNGER et al., 2000).

Os dados obtidos também mostram que a citotoxicidade nas três células testadas com a formulação AICIPc lipossomal é diretamente proporcional ao aumento da dose de energia de irradiação, comprovando que a terapia só surte efeito em combinação com a luz, o que é fundamental em TFD.

Em comparação a outros estudos envolvendo ftalocianinas aplicáveis em TFD, a formulação AICIPc lipossomal apresentou o máximo efeito farmacológico de

indução de morte das células tumorais com baixas doses, tanto do fármaco, $0,29 \mu\text{g.mL}^{-1}$, como de irradiação, com 700 mJ.cm^{-2} sendo a dose máxima. Em dois trabalhos recentes, Kolarova e colaboradores reportaram a ação de uma ftalocianina hidrofílica de cloro alumínio dissulfonada (AICIPcS₂) em células metastáticas de melanoma humano - G361 (KOLAROVA et al., 2007). Nestes estudos, o máximo efeito apresentado, aproximadamente 90% de morte celular, foi obtido combinando-se $5,0 \text{ g.mL}^{-1}$ de AICIPcS₂ e 25 J.cm^{-2} de dose de irradiação, ou seja, concentrações 15 vezes maiores do fármaco e cerca de 35 vezes a energia de irradiação utilizada na tese em questão.

A alta eficiência das ftalocianinas hidrofóbicas, como a AICIPc, é em parte devido ao rápido uptake deste composto para o citoplasma celular (LUO; KESSEL, 1997). Outro ponto que justifica a maximização do efeito farmacológico da formulação AICIPc lipossomal é a interação das vesículas lipossomais com a superfície celular, o que proporciona maior entrada do fármaco nas células, otimizando os efeitos desejados (ANDRADE et al., 2004;). Estudos mostram que ftalocianinas encapsuladas em nanopartículas de sílica são mais eficientes na geração de oxigênio singleto do que ftalocianinas não encapsuladas, aumentando o efeito farmacológico destas moléculas (ZHAO et al., 2009). Além disso, nos trabalhos realizados por Kolarova, a ftalocianina estudada, AICIPcS₂, apresenta menor interação com a superfície celular por se tratar de uma molécula hidrofílica, o que não acontece com a AICIPc que é uma ftalocianina hidrofóbica e que portanto apresenta melhor interação com as células (KOLAROVA et al, 2007; KOLAROVA et al., 2007).

Os resultados obtidos foram o ponto de partida para a realização de estudos mais aprofundados, como a quantificação do fármaco AICIPc intracelular (uptake), que foi fundamental para a elucidação dos resultados e comparação das respostas entre os três diferentes fenótipos das células de melanoma. Relacionando o efeito farmacológico com os resultados obtidos com o uptake celular, pode-se dizer que a linhagem de melanoma humano de fenótipo menos agressivo, WM1552C, é sem dúvidas, mais sensível ao tratamento; apenas 6,60 ng de AICIPc promove o efeito máximo de morte celular (90%), enquanto que, para as outras duas linhagens, em fase de progressão tumoral mais avançada, WM278 e WM1617, as quantidades de fármaco incorporado, nos tempos relativos às condições experimentais que causaram máximo efeito de morte celular, 80%, são iguais a 13,90 ng e 15,10 ng,

respectivamente. Lembrando que nos ensaios de citotoxicidade, o tempo de incubação com a formulação AICIPc lipossomal variou de acordo com a linhagem, 1, 2 e 3 horas para WM1552C, WM278 e WM1617, respectivamente. Assim, mesmo com quantidades maiores de AICIPc incorporada, as células de fenótipo mais agressivo são mais resistentes ao tratamento, o que corrobora os dados descritos na literatura e já citados acima (SCHADENDORF; CZARNETZKI, 1994; McCLAY et al., 1996; SERRONE; HERSEY, 1999; MERIC et al., 2003).

Por outro lado, o perfil de incorporação do fármaco nas três linhagens é bem semelhante, apenas as células WM278 tem um uptake um pouco maior, em torno de 13 % com 3 horas de incubação, enquanto que, as outras duas linhagens no mesmo tempo, apresentaram um uptake de 10%. Apesar de parecerem baixas as taxas de incorporação, é importante lembrar que o experimento foi realizado com um tempo máximo de 3 horas, o que condiz com os dados presentes na literatura, que descrevem o uptake de outros fármacos fotossensíveis veiculados em sistemas de liberação controlada (SILVA et. al., 2009). Além disso, esses resultados tornam ainda mais evidente a eficiência do sistema AICIPc lipossomal em TFD de células de melanoma humano, ou seja, quantidades bem pequenas do fármaco, na ordem de nanogramas, são capazes de promover 80 a 90% de morte celular.

Os fármacos fotossensíveis tendem a acumular preferencialmente nos tecidos tumorais, e isto é bem evidenciado em estudos *in vivo*. Este fato se deve ao aumento da permeabilidade vascular na região do tumor, o que promove um aumento do aporte de macromoléculas e o extravazamento do fármaco fotossensível para a neoplasia. Além disso, a região do tumor apresenta menor drenagem linfática o que contribui para um maior acúmulo do fármaco nesta região. (CASTANO et al., 2005). No entanto, em cultura de células nem sempre é possível verificar a diferença na incorporação do fármaco de acordo com o fenótipo celular. Assim como os resultados obtidos neste trabalho, estudos realizados com fibroblastos, NHI/3T3 e células metastáticas UV-2237, ambos tratados com uma ftalocianina de alumínio sulfonada (AISPc) e com um derivado da hematoporfirina (HpD), mostram que não há diferenças no uptake dos fármacos entre as duas linhagens estudadas (CHAN et al., 1986).

Ainda com relação a incorporação da formulação AICIPc lipossomal, é possível notar pela microscopia confocal, o padrão de distribuição intracelular do fármaco de acordo com o tempo de incubação. Nas três linhagens de melanoma

humano, com 1 hora de incubação, o fármaco tende a ficar amplamente distribuído pelo citoplasma, de forma difusa, enquanto que com 2 e 3 horas, a tendência da molécula é se agregar, como se estivesse dentro de vesículas acumulando preferencialmente na região perinuclear. Cabe aqui ressaltar que nas células WM1552C, após 3 horas de incubação com a formulação, as células passam a apresentar morfologia arredondada, típica de processos de morte celular, o que já havia sido evidenciado nos primeiros ensaios de toxicidade no escuro, em que após 3 horas de incubação estas células apresentavam aproximadamente 30% de morte celular. Este fato reforça e justifica o protocolo adotado como ideal, com apenas 1 hora de incubação com AICIPc lipossomal para as células WM1552C.

O acúmulo dos fármacos fotossensíveis nas organelas celulares é descrito por diversos autores e corroboram com os resultados obtidos. O padrão de distribuição da formulação AICIPc lipossomal, de forma difusa pelo citoplasma, é bem semelhante ao que ocorre quando fármacos fotossensíveis acumulam em lisossomos. Esta é uma característica relevante durante o desenvolvimento de novos fármacos, uma vez que o fato da molécula acumular em organelas citoplasmáticas ao invés do núcleo, significa que tal droga apresenta poucas chances de ser uma molécula mutagênica, pois apresenta baixa afinidade em intercalar nos ácidos nucléicos.

Nagata e colaboradores mostraram que em 70% das células tratadas com clorina (C_{E6}), os lisossomos são o primeiro sítio de acúmulo do composto e que logo após a irradiação com laser apropriado, a apoptose ocorre via desestabilização mitocondrial, em consequência ao dano promovido nos lisossomos (NAGATA et al., 2003). Runnels também relatou o acúmulo destes agentes fotossensibilizantes em mitocôndrias, com dano nestas organelas e disparo da apoptose (RUNNELS et al., 1999). Estudos com uma ftalocianina tetrasubstituída ($Pc4$) e com a própria AICIPc lipossomal mostram que o acúmulo ocorre não só em mitocôndrias, mas, sobretudo no Complexo de Golgi e Reticulo Endoplasmático, apresentando distribuição citoplasmática perinuclear, assim como os resultados obtidos com 2 e 3 horas de incubação com a formulação em questão (TRIVEDI et al., 2000; PACHECO-SOARES et al., 2008).

De forma geral, a terapia fotodinâmica induz a morte tanto por necrose quanto por apoptose, de acordo com as doses do fármaco e de irradiação luminosa; de alterações genéticas, metabólicas e do fenótipo celular; da natureza do fármaco

fotossensível e de sua localização intracelular. (GRANVILLE et al., 1998; MOONEY et al., 2002; OLEINICK et al., 2002).

Estudos realizados por Granville e colaboradores mostram que em células HeLa submetidas a TFD com o agente fotossensibilizante BPD-MA (derivado monoácido de benzoporfirina), ocorre a liberação do Citocromo c para o citosol logo após a ativação do fármaco com irradiação. Em seguida, o encolhimento e a presença de *blebbings* (corpos apoptóticos), característicos do processo apoptótico, começam a ser evidenciados nas células. Dentro de 1 a 2 horas, ocorre a ativação das caspases 3, 6, 7 e 8, e a marcação positiva para Anexina V se torna evidente a partir 2 horas após a TFD (GRANVILLE et al., 1998).

Segundo estudos de Luo e Kessel, é predominante a indução da apoptose pela ftalocianina AICIPc após a TFD com baixas doses de irradiação com laser, ocorrendo dano em lisossomos, mitocôndrias, fragmentação do DNA e clivagem da PARP (poliadenosilribose polimerase). Por outro lado, altas doses de irradiação induzem o dano na membrana celular com aumento da permeabilidade aos corantes TDPH (trimetilamino-difenilhexatrieno) e PI (iodeto de propídeo), o que é característico da necrose celular. Outra evidência deste tipo de morte é a ausência de fragmentação do DNA e a ausência de morfologia compatível com a apoptose (núcleo apoptótico, encolhimento e *blebbings*), mesmo após 24 horas (LUO; KESSEL, 1997).

Os resultados obtidos em neste trabalho corroboram com os dados acima descritos. As três linhagens de melanoma apresentaram marcação positiva para Anexina V, após a TFD com a formulação AICIPc lipossomal. Além disso, nas células WM1552C e WM278, a apoptose celular também é evidenciada pela morfologia das células que apresentam núcleo apoptótico, encolhimento e *blebbings*. Também estão de acordo os dados obtidos com a linhagem WM1617, com relação às diferentes doses de irradiação. Assim como descrito por Luo e Kessel, em doses menores de energia (70 mJ.cm^{-2}), o tipo predominante de morte celular é apoptose; por outro lado, com 700 mJ.cm^{-2} ocorre dano na membrana citoplasmática e as células se tornam permeáveis ao PI, evidenciando a necrose celular, o que é pouco observado nas células submetidas a menor dose de irradiação.

4, Discussão a cerca do estabelecimento de culturas tridimensionais (3D) de células metastáticas de melanoma humano e posterior avaliação da atividade biológica da formulação AICIPc lipossomal nestes modelos

Com poucas exceções, os experimentos de toxicidade são realizados primeiramente em culturas em monocamada, 2D, que são ensaios simples e reprodutíveis. Porém, a monocamada não reflete o microambiente celular adequadamente e os resultados podem ser irrelevantes quando comparados com as reais situações que ocorrem *in vivo* (CUKIERMAN et al., 2001). Nos estudos de desenvolvimento de novos fármacos, as culturas em monocamada são importantes para um delineamento inicial da atividade farmacológica, assim como mostram os resultados obtidos neste trabalho. No entanto, a cultura 2D não permite a exploração mais aprofundada do espectro de ação das drogas uma vez que estas respostas variam de acordo com a arquitetura das células, com a polaridade dos tecidos e com a influências de outros tipos celulares. (PRESTWICH, 2007).

A engenharia tecidual e o desenvolvimento de culturas celulares 3D, mistas ou não, são ferramentas importantes e vêm sendo usadas por diversos grupos de pesquisas, não só no que diz respeito aos screenings de novos fármacos. Bissell estudou os mecanismos moleculares de invasão do câncer de mama em culturas 3D de células MCF-10A em matriz de laminina e constataram que neste tipo de cultivo, estas células formavam colônias esféricas ricas em caseína. (BISSELL, 2006).

A composição das matrizes que servem de substratos para a formação das culturas 3D deve ser personalizada de acordo com o(s) tipos(s) celulares empregados. A matriz é constituída de um polímero, geralmente poliacrilamida, e uma combinação de diversas proteínas, dentre as quais, colágeno tipo I, III, IV, laminina e fibronectina, além de fatores de crescimentos (FLAIM et al., 2005). No trabalho de doutorado em questão, a cultura 3D foi estabelecida em uma matriz polimérica a base de colágeno tipo I extraído da cauda de ratos *Wistar*. Este modelo mostrou-se adequado para cultivo das células de melanoma WM1617 que formam colônias “gigantes”, junto às redes tridimensionais de fibroblastos CCD27SK, o que é bem evidenciado nos resultados obtidos por microscopia direta das culturas e também pelas análises histológicas realizadas.

O primeiro modelo 3D construído neste trabalho foi baseado na formação de colônias de células metastáticas WM1617 em matriz de soft agar, mostrando-se altamente reprodutível de acordo com o que ocorre *in vivo*, ou seja, as células

WM1617 formaram colônias livres de adesão ao substrato, o que é característico da metástase tumoral. Os resultados obtidos com a formulação AICIPc lipossomal em TFD também foram satisfatórios e corroboram com os dados descritos na literatura. Chan e colaboradores comprovaram os efeitos da TFD com algumas ftalocianinas sulfonadas em culturas 3D de soft agar com células humanas de adenocarcinoma de intestino (WiDr) (CHAN et al., 1991). Os resultados apresentados por Chan apontam uma diminuição do tamanho e formação das colônias (esferóides) em relação ao controle, assim como obtido no trabalho de doutorado em questão, no entanto, com doses de fármaco e de irradiação luminosa cerca de 20 vezes maiores ao apresentado nesta tese, comprovando mais uma vez a eficácia da formulação AICIPc lipossomal.

Os estudos desenvolvidos por Chan também destacam que os esferóides celulares apresentam menor incorporação do fármaco quando comparados com as células em monocamada, o que faz com que sejam necessárias doses maiores de irradiação luminosa para que se tenha o mesmo efeito de morte celular apresentado pela cultura 2D. Este fato também foi observado no trabalho em questão. Nos experimentos realizados com as células WM1617 e os fibroblastos CCD27SK em matriz de colágeno, fica evidente que o tratamento só é realmente eficaz na maior dose de irradiação luminosa, 700 mJ.cm^{-2} . Na presença de menores doses de irradiação, 70 e 140 mJ.cm^{-2} , ainda há a formação de colônias celulares, sobretudo na menor dose de energia em que praticamente não há diferenças com relação ao controles.

Além disso, os resultados obtidos indicam que o modelo construído é funcional e mais do que isso, que os parâmetros isolados irradiação e fármaco no escuro não interferem no fenótipo e no crescimento das culturas, ou seja, apenas a formulação AICIPc lipossomal em combinação com a luz apropriada é capaz de produzir o efeito anti-neoplásico, reforçando mais uma vez que o sistema é apropriado para a aplicação em TFD.

VI. CONCLUSÕES

- A formulação AICIPc lipossomal apresenta parâmetros farmacotécnicos adequados, como tamanho nanométrico e baixo índice de polidispersividade, sendo estável por 10 dias. Além disso, o veículo (lipossomas) mostrou-se inerte e não tóxico. A encapsulação do fármaco fotossensível AICIPc em lipossomas não alterou as propriedades fotoquímicas e fotofísicas no estado estacionário e resolvido no tempo, apresentando todas as características adequadas para um bom fármaco fotossensível.
- Na presença de irradiação com laser apropriado, o sistema AICIPc lipossomal promoveu a morte das três linhagens de melanoma humano em diferentes fases de progressão da neoplasia, sendo que as células de fenótipo menos agressivo, WM1552C, se mostraram mais sensíveis ao tratamento. Além disso, o efeito citotóxico obtido é diretamente proporcional ao aumento da dose de irradiação luminosa. Não houve diferenças significativas nas taxas de incorporação do fármaco nos três diferentes fenótipos do melanoma, sendo a localização intracelular do fármaco citoplasmática o que indica que a molécula não acumula ou intercala em ácidos nucleicos, o que aponta um efeito não mutagênico.
- O tipo de morte celular induzida pelo tratamento, nas três linhagens estudadas, sugere apoptose. Além disso, nas células metastáticas WM1617, doses maiores de irradiação com laser sugere a morte também por necrose.
- Dois diferentes modelos celulares tridimensionais (3D) foram construídos, *in vitro*, com células WM1617, mimetizando a formação de colônias típicas do processo de metástase que ocorre *in vivo*, sendo que o sistema AICIPc lipossomal em TFD foi efetivo nas culturas 3D após irradiação com 700mJ.cm^{-2} , diminuindo a formação de colônias celulares, ou seja, mostrando-se potencialmente anti-metastático.

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRADE, C.A.S.; CORREIA, M.T.S.; COELHO, L.C.B.B.; NASCIMENTO, S. C.; SANTOS-MAGALHÃES, N. S. Antitumor activity of Cratylia mollis lectin encapsulated into liposomes. **Int. J. Pharm.**, vol. 278, p.435-445, 2004.

ARBOGAST, J; FOOTE. Photophysical Properties of C70. **J. Am. Chem. Soc.**, vol.23, p.8886-8889, 1991.

ASTIER A., New drug formulations for cancer therapy. **Ann. Pharma.**, vol. 64, p.23-35, 2006.

ATKINS, P., ELUMALAI, P, DE PAULA, J. **Atkins' Physical Chemistry**, Oxford University Press, 2002.

BALASUBRAMANIAM, E.; NATARAJAN, P. Photophysical properties ofprotoporphyrin IX and thionine covalently attached to macromolecules. **J. Photochem. Photobiol.**, vol.103, p.201-211, 1997.

BALL, D.J.; MAYHEW, S.; WOOD, S.R.; GRIFFITHS, J.; VERNON, D.I.; BROWN, S.B. A comparative study of the cellular uptake and photodynamic efficacy of three novel zinc phthalocyanines of differing charge. **J. Photochem. Photobiol.**, vol. 69. p.390-396, 1999.

BECHET, D.; COULEAUD, P.; FROCHOT, C.; VIRIOT, M.L.; GUILLEMIN, F.; BARBERI-HEYOB, M. Nanoparticles as vehicles for delivery of photodynamic therapy agents. **Trends Biotechnol.**, vol.11, p.612-621, 2008.

BELL, E.; EHRLICH, H.P.; SHER, S.; MERRILL, C.; SARBER, R.; HULL, B.; NAKATSUJI, T.; CHURCH, D.; BUTTLE, D.J. Development and use of a living skin equivalent. **Plast. Reconstr. Surg.**, vol.67, p.386-92, 1981.

BELL, E.; SHER, S.; HULL, B.; MERRILL, C.; ROSEN, S.; CHAMSON, A.; ASSELINEAU, D.; DUBERTRET, L.; COULOMB, B.; LAPIERE, C.; NUSGENS, B.; NEVEUX, Y. The reconstitution of living skin. **J. Invest. Dermatol.**, vol.81. p.2-10, 1983.

BISSELL, M. Modelling molecular mechanisms of breast cancer and invasion: lessons from the normal gland. **Biochem. Soc. Trans.**, vol.35, p.18-22, 2006.

BLOCK, W. Pegylated liposomes: a revolution in the making. **Life Enhancem.**, vol 1097, p. 45, 2006.

BOUWSTRA, J.A.; PONEC, M. The skin barrier in healthy and diseased state **Biochim. Biophys. Acta.**, vol.1758, p.2080-2095, 2006.

BONNETT, R.; BERENBAUM, M. Porphyrins as photosensitizers. **Ciba Foundation Symposium.**, vol.146, p.40-53, 1989.

BROWN, S.B.; BROWN, E.A.; WALKER, I. The present and future role of photodynamic therapy in cancer treatment. **Lancet Oncol.**, vol.5, p.497-508, 2004.

BUGGIANI, G.; TROIANO, M.; ROSSI, R.; LOTTI T. **Photodiagnosis Photodyn. Ther.**, vol.5, p.134, 2008.

CASTANO, A.P.; DEMIDOVA, T.N.; HAMBLIN, M.R. Mechanisms in photodynamic therapy: part one: photosensitizers, photochemistry and cellular localization. **Photodiagnosis Photodyn. Ther.**, vol.1, p.279-293, 2004.

CASTANO, A.P.; DEMIDOVA, T.N.; HAMBLIN, M.R. Mechanisms in photodynamic therapy: part two: cellular signaling, cell metabolism and modes of cell death. **Photodiagnosis Photodyn. Ther.**, vol.2, p.1-23, 2005.

CASTANO, A.P.; DEMIDOVA, T.N.; HAMBLIN, M.R.; Mechanisms in photodynamic therapy: part three: photosensitizer pharmacokinetics, biodistribution, tumor localization and modes of tumor destruction. **Photodiagnosis Photodyn. Ther.**, vol.2, p.91-106, 2005.

CHAN, W.S.; WEST, C.M.L.; MOORE, J.V.; HART, I.R. Photocytotoxic efficacy of sulphonated species of aluminium phthalocyanine against cell monolayers, multicellular spheroids and in vivo tumours. **Br. J. Cancer.**, vol.64, p.827-832, 1991.

CHAN, W.S.; SVENSEN, R.; PHILLIPS, D.; HART, I.R. Cell uptake, distribution and response to aluminium chloro sulphonated phthalocyanine, a potential anti-tumour photosensitizer. **Br. J. Cancer.**, vol.53, p.255-263, 1986.

CHARTTERJEE, S.; SRIVASTAVA, T.S. Spectral investigations of the interactions of some porphyrins with bovine serum albumin. **J. Porphyr. Phtalocyanines**, vol.4, p.147-57, 2000.

CHAUSSAIN, M.C.; SEPTIER, D.; BONNEFOIX, M.; LECOLLE, S.; LEBRETON, C.; COULOMB, B.; PELLAT, B. Human dermal and gingival fibroblasts in a three-

dimensional culture: a comparative study on matrix remodeling. **Clin. Oral Investig.**, vol.6, p.39-50, 2002.

COLIGE, A.C.; LAMBERT, C.R.; NUSGENS, B.V.; LAPIERE, C.M. Effect of cell-cell and cell-matrix interactions on the response of fibroblasts to epidermal growth factor in vitro. Expression of collagen type I, collagenase, stromelysin and tissue inhibitor of metalloproteinases. **J. Biochem.**, vol.285, p.215-21, 1992.

COREY, E.J.; MEHROTRA, M.M.; KHAN, A.U. Water induced dismutation of superoxide anion generates singlet molecular oxygen. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, vol.145, p.842-46, 1987.

COULOMB, B.; DUBERTET, L.; MERRIL, C.; TOURAINE, R.; BELL, E. The collagen lattice: a model for studying the physiology, biosynthetic function and pharmacology of the skin. **Br. J. Dermatol.**, vol.111, p.83-87, 1984.

COULOMB, B.; LEBRETON, C.; DUBERTET, L. Influence of human dermal fibroblasts on epidermalization. **J. Invest. Dermatol.**, vol.92, p.122-25, 1989.

CUKIERMAN, E.; PANKOV, R.; STEVENS, D.R.; YAMADA, K. M. Taking cell-matrix adhesions to the third dimension. **Science**, vol.294, p.1708–1712, 2001.

DE ROSA, M. C.; CRUTCHLEY, R. J. Photosensitized singlet oxygen and its applications. **Coord. Chem. Rev.**, vol.233, p.351-71, 2002.

DEMAS, J.; CROSBY, G. Measurement of photoluminescence Quantum Yields: A Review. **J. Phys. Chem.**, vol.75, p.992-1024, 1971.

DYSART J.S.; SINGH G.; PATTERSON M.S. Calculation of singlet oxygen dose from photosensitizer fluorescence and photobleaching during mTHPC photodynamic therapy of MLL cells. **J. Photochem. Photobiol.**, 2005.

DOUGHERTY, T.J. Photodynamic therapy: Part II. **Semin. Surg. Oncol.**, vol.11, p.333-34, 1995.

DOUGHERTY, T.J. A brief history of clinical photodynamic therapy development at Roswell Park Cancer Institute. **J. Clin. Laser Med. Surg.**, vol.14, p.219-21, 1996.

DUBERTRET L.; COULOMB B. Reconstruction of human skin in culture. **Soc. Biol. Fil.**, vol.188, p.235-244, 1994.

EATON, F. Reference Material for Fluorescence Measurement. **Pure Appl. Chem.**, vol.60, p.1107-14, 1988.

FICHEUX, H. Photodynamic therapy: principles and therapeutic indications. **Ann. Pharm. Fr.**, vol.67, p.32-40, 2009.

FISHER, A.M.R.; MURPHREE, A.; GOMER, C. Clinical and Preclinical Photodynamic Therapy. **Lasers Surg. Med.**, vol.37, p.2-31, 1995.

FLAIM, C.; CHIEN, S.; BHATIA, S. An extracellular matrix microarray for probing cellular differentiation. **Nat. Methods.**, vol.2, p.119-125, 2005.

FOOTE, C.S. Mechanisms of photosensitized oxidation. There are several different types of photosensitized oxidation which may be important in biological systems. **Science**. v. 162, p.963-970, 1968.

FRANK, M.M. The reticuloendothelial system and bloodstream clearance. **J. Lab. Clin. Med.**, vol.122, p.487-488, 1993.

FRESHNEY, R.I.; MERRY, S.; FETHERSTON, C.A.; KAYE, S.B.; PLUMB, J.A. Resistance of human glioma to adriamycin in vitro: the role of membrane transport and its circumvention with verapamil. **Br. J. Cancer.**, vol.53, p.129-135.

GARBO, G.M.; FINGAR, V.H.; WIEMAN, T.J.; NOAKES, E.B.; HAYDON, P.S.; CERRITO, P.B.; KESSEL, D.H.; MORGAN, A.R.; In vivo and in vitro photodynamic studies with benzochlorin iminium salts delivered by a lipid emulsion. **J. Photochem. Photobiol.** vol.4, p.561-568, 1998.

GILLIES, R.; KOLLIAS, N.; HASAN, T.; DIDDENS, H.; Spectral characterization of the benzoporphyrin derivative monoacid ring-A photoproduct formed in fetal calf solutions during irradiation with 694 nm continuous-wave radiation. **J. Photochem. Photobiol.**, vol.33, p.87-90, 1996.

GOLDBERG, M.S.; DOUCETTE, J.T.; LIM, H.W.; SPENCER, J.; CARUCCI, J.A., RIGEL, D.S. Risk factors for presumptive melanoma in skin cancer screening: American Academy of Dermatology National Melanoma/Skin Cancer Screening Program experience 2001-2005. **J. Am. Acad. Dermatol.**, vol.57, p.60, 2007.

GRANVILLE, D.J.; CARTHY, C.M.; JIANG, H.; SHORE, G.C.; MCMANUS, B.M.; HUNT, D.W. Rapid cytochrome c release, activation of caspases 3, 6, 7 and 8 followed by Bap31 cleavage in HeLa cells treated with photodynamic therapy. **FEBS Lett.**, vol.437, (1-2):5-10, 1998.

GOMES, C.C.M., ESPÍNOLA, A.V., SANTOS, J.N., DECHICHI, P. Histological Analysis in Light Microscope and Transmission Electron Microscope. **Revista Odonto Ciência – Fac. Odonto/PUCRS**, v. 21, p. 54, 2006.

GREGORIADIS, G. Liposome technology: Preparation of liposomes. **CRC Press.**, 1984.

GRUNE, T. Oxidative stress, aging and the proteasomal system. **Biogerontology.**, vol.1, p.31-40. 2000.

HALL, H.I.; MILLER, D.R.; ROGERS, J.D.; BEWERSE, B. Update on the incidence and mortality from melanoma in the United States. **J. Am. Acad. Dermatol.** vol.40, p.35-42, 1999.

HAMIDI, M.; AZADI, A.; RAFIEI, P. Hydrogel nanoparticles in drug delivery. **Adv. Drug. Deliv. Rev.**, vol.15, p.1638-1649, 2008.

HENDERSON, B. W. Photofrin photodynamic therapy com significantly deplete or preserve oxygenation in human basal cell carcinomas during treatment, depending on fluence rate. **Cancer Res.**, vol.60, p.525-29, 2000.

HENDERSON, B. W.; DOUGHERTY, T. J. How does photodynamic therapy work? **J. Photochem. Photobiol.**, vol.55, p.145-57, 1992.

HENDERSON, B. W.; SITNIK-BUSCH, T. M.; VAUGHAN, L. A. Potentiation of photodynamictherapy antitumor activity in mice by nitric oxide synthase inhibition is fluence rate dependent. **J. Photochem. Photobiol.**, vol.70, p.64-71, 1999.

HERLYN, M.; THURIN, J.; BALABAN, G.; BENNICELLI, J.L.; HERLYN, D.; ELDER, D.E.; BONDI, E.; GUERRY, D.; NOWELL, P.; CLARK, W.H. Characteristics of cultured human melanocytes isolated from different stages of tumor progression. **Cancer Res.**, vol.145, p.5670-5676, 1985.

HUNTER, R. J. Zeta Potential in Colloid Science. Principles and applications. **Acad. Press.**, 1981.

IDOWU, M.; NYOKONG, T. Photophysical and photochemical properties of zinc and aluminum phthalocyanines in the presence of magnetic fluid. **J. Photochem. Photobiol. A: Chem.**, vol.188, p.200-206, 2007.

INCA: <http://www.inca.gov.br/>

JANSEN, B.; SCHLAGBAUER-WADL, H.; EICHLER, H. G.; WOLFF, K.; VAN ELSAS, A.; SCHRIER, P. I.; PEHAMBERGER, H.; Activated N-ras contributes to the chemoresistance of human melanoma in severe combined immunodeficiency (SCID) mice by blocking apoptosis. **Cancer Res.**, vol.57, p.362-365, 1997.

JEMAL, A.; SIEGEL, R.; WARD, E.; HAO, Y.; XU, J., MURRAY, T., THUN, M.J. **Cancer J. Clin.**, vol.58, p.71, 2008.

JUNQUERIA, J.; CARNEIRO, L. **Tecido Conjuntivo**. In:10.ed, cap.4, p.132-150, 2009.

JORI, G. Low density lipoproteins-liposome delivery systems for tumor photosensitizers in vivo. **J. Photochem. Photobiol. B: Biol.**, 1992.

KESSEL, D. Hematoporphyrin and HPD: Photophysics, Photochemistry and Phototerapy. **J. Photochem. Photobiol.**, vol.39, p.851-59, 1984.

KIRILOVA, E.M; KALNINA, I; KIRILOV, G.K; MEIROVICS, I. Spectroscopic study of benzanthrone 3-N-derivatives as new hydrophobic fluorescent probes for biomolecules.. **J. Fluoresc.**, vol.18, p.645-648, 2008.

KOLAROVA, H.; LENOBEL, R.; KOLAR, P.; STRNAD, M. Sensitivity of different cell lines to phototoxic effect of disulfonated chloroaluminium phthalocyanine. **Toxicol. In Vitro**. vol.7, p.1304-1306, 2007.

KOLAROVA, H.; NEVRELOVA, P.; BAJGAR, R.; JIROVA, D.; KEJLOVA, K.; STRNAD, M. In vitro photodynamic therapy on melanoma cell lines with phthalocyanine. **Toxicol. In Vitro.**, vol.21. p.249-253, 2007.

KONAN, Y.N.; GURN, R.; ALLÉMANN, E. State of the art in the delivery of photosensitizers for photodynamic therapy. **J. Photochem. Photobiol. B: Biol.**, vol.66, p.89-106, 2002.

KREMER, J. et. al. Vesicles of variable diameter prepared by a modified injection method. **Biochemistry.**, vol.16, p.3932-35, 1977.

KÜBLER, A.; NIZIOL, C.; SIDHU, M.; DÜNNE, A.; WERNER, J.A. Analysis of cost effectiveness of photodynamic therapy with Foscan (Foscan-PDT) in comparison with palliative chemotherapy in patients with advanced head-neck tumors in Germany. **Laryngorhinootologie.**, vol.10, p.725-732, 2005.

KÜLKAMP, I.C.; PAESE, K.; GUTERRES, S.S. Stabilization of lipoic acid by encapsulation in polymeric nanocapsules designed for cutaneous administration. **Quim. Nova.**, vol. X, p.1-7, 2009.

LARROQUE, C.; PELEGRIN, A.; VAN LIER, J.E. Serum albumin as a vehicle for zinc phthalocyanine: photodynamic activities in solid tumour models. **Br. J. Cancer.**, vol.12, p.1886-1890, 1996.

LASIC, D.D. Liposomes: From Physics to Applications. **Elsevier.**, 1993.

LEONETTI, C.; BIROCCIO, A.; CANDILORO, A.; CITRO, G.; FORNARI, C.; MOTTOLESE, M.; DEL, D.; ZUPI, G. Increase of cisplatin sensitivity by c-myc antisense oligodeoxynucleotides in a human metastatic melanoma inherently resistant to cisplatin. **Clin. Cancer Res.**, vol.5, p.2588-2595, 1999.

LE PANSE, R.; BOUCHARD, B.; LEBRETON, C.; COULOMB, B. Modulation of keratinocyte growth factor (KGF) mRNA expression in human dermal fibroblasts grown in monolayer or within a collagen matrix. **Exp. Dermatol.** vol.5, p.108-14, 1996.

LEIST, M.; NICOTERA, P. The shape of cell death, **Biochem. Biophys. Res. Commun.** Vol.236, p.1-9, 1997.

LI, G.; TANG, L.; ZHOU, X.; TRON, V.; HO, V. Chemotherapy-induced apoptosis in melanoma cells is p53 dependent. **Melanoma Res.**, vol.8, p.17-23, 1998.

LUO, Y.; KESSEL D. Initiation of apoptosis versus necrosis by photodynamic therapy with chloroaluminum phthalocyanine. **J. Photochem. Photobiol.**, vol.66, p.479, 1997.

MAEDA, H. Polymer-conjugated macromolecular drugs: advantages in cancer chemotherapy. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, vol.46, p.169–185, 2001.

MACCORMACK, M.A. **Semin. Cutan. Med. Surg.** vol.27, p.52, 2008.

MA, J.; JIANG, L. Photogeneration of singlet oxygen ($^1\text{O}_2$) and free radicals by tetra-brominated hypocrellin B derivative. **Free Radic. Res.**, vol.6, p.767-777, 2001.

McCLAY, E.F.; JONES, J.A.; WINSKI, P.J.; ALBRIGHT, K.D.; CHRISTEN, R.D.; HOWELL, S.B. Determinants of tamoxifen sensitivity control the nature of the synergistic interaction between tamoxifen and cisplatin. **Cancer Res.**, vol.56, p.3993-3997, 1996.

MERIC, J.B.; RIXE, O. Metastatic malignant melanoma. **Drugs Today (Barc.)**, vol.39, p.17-38, 2003.

MEIER, F.; SATYAMOORTHY, K.; NESBIT, M.; HSU, M.Y.; SCHITTEK, B.; GARBE, C.; HERLYN, M. Molecular Events in Melanoma Development and Progression. **Front. Biosci.**, vol.3, p.1005-1010, 1998.

MOONEY, D. J.; HANSEN, L.; VACANTI, J.; LANGER, R.; FARMER, S.; INGBER, D. Switching from differentiation to growth in hepatocytes: Control by extracellular matrix. **J. Cell. Physiol.**, vol.151, p.497-505, 1992.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **J. Immunol. Methods.**, vol.65, p.55-63, 1983.

MUHRER, J.C. Melanoma: Current Incidence, Diagnosis, and Preventive Strategies **J. Nurs. Pract.**, vol.5, p.35-41, 2009.

MUROV, S. L.; **Handbook of Photochemistry**, New York, 1973.

NAGATA, S.; OBANA, A.; GOHTO, Y.; NAKAJIMA, S. Necrotic and apoptotic cell death of human malignant melanoma cells following photodynamic therapy using an amphiphilic photosensitizer ATX-S10(Na). **Lasers Surg. Med.**, vol.33, p.64-70, 2003.

NETTO-FERREIRA, J.C.; FERREIRA, L.F.V.; LEMOS, M.J. A técnica da reflectância difusa aplicada ao estudo da fluorescência de 2,3-naftalimidaz n-substituídas com grupos alquila incluídas em b-ciclodextrina e adsorvidas em celulose microcristalina. **Quím. Nova.**, vol.22 p.4, 1999.

NUNES, S.M. A potencialidade do uso de diferentes sistemas de liberação de fármacos na terapia fotodinâmica: preparação e estudos fotofísicos. **Doutorado**, Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto-USP, 2003.

NUNES, S. M. T.; SGUILLA, F. S.; TEDESCO, A. C. Photophysical studies of zinc phthalocyanine and chloroaluminium phthalocyanine incorporated into liposomes in the presence of additives. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, vol.37, p.273-84, 2004.

NUSGENS, B.; LAPIERE, C.; MERRILL, C.; BELL, E. Collagen biosynthesis by cells in a tissue equivalent matrix in vitro. **Coll. Relat. Res.**, vol.4, p.351-63, 1984.

ODASHIRO, A.N.; PEREIRA, P.R.; MARSHALL, J.-C.; GODEIRO, K.; BURNIER M.N. Skin cancer models. **Drug Discov. Today**, vol.2, p.71, 2005.

OLIVEIRA, D. M.; MACAROFF, P. P.; RIBEIRO, AZEVEDO, R. B.; LIMA, E.L.; MORAIS, P. C.; TEDESCO, A. C. Studies of zinc phthalocyanine/magnetic fluid complex as a bifunctional agent for cancer treatment. **J. Magnetism and Magnetic Mat.**, v. 289, p. 476-479, 2005.

OLEINICK, N.L.; MORRIS, R.L.; BELICHENKO, I. The role of apoptosis in response to photodynamic therapy: what, where, why and how. **Photochem. Photobiol. Sci.**, vol.1, p.1-21, 2002.

OKU, N.; NICHAUD, N.; OKADA, S. Tumor accumulation of novel RES-avoiding liposomes. **Biochem. Biophys. Acta.**, vol.1126, p.255-60, 1992.

PACHECO-SOARES, C.; MAFTOUM-COSTA, M.; NAVES, K.T.; OLIVEIRA, A.L.; TEDESCO, A.C.; SILVA, N.S. Mitochondria, endoplasmic reticulum and actin filament behavior after PDT with chloroaluminum phthalocyanine liposomal in HeLa cells. **Cell Biol. Int.**, vol.32, p.1024-1028, 2008.

PACHECO-SOARES C., ABRAHÃO M.V., SIMIONE A.R., TEDESCO A.C. Ação da quimioterapia fotodinâmica antimicrobiana em colônias de actinobacillus actinomycetemcomitans. Um estudo in vitro. In: IV **Encontro de Pós-Graduação – UNIVAP**. São José dos Campos, v. 01. p. 1234-1236, 2004.

PAPAHADJOPOULOS, D.; ALLEN, T.M.; GABIZON, A.; MAYHEW, E.; MATTHAY, K.; HUANG, S.K ET AL. Sterically stabilized liposomes: improvements in pharmacokinetics and antitumor therapeutic efficacy. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, vol.24, p.11460-11464, 1991.

PETI, A.P.F. Desenvolvimento e validação de métodos analíticos espectrofotométricos e fluorimétricos para quantificação de ftalocianina de cloroaluminio em nanoemulsões e nanocapsulas. **Monografia de conclusão de graduação em Química**. Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto, USP, 2008.

PERLIS, C.; HERLYN, M.; SMITH, A.B.; JONES C.D.; ROBERTS, E.F. Recent advances in melanoma biology. **Oncologist.**, vol.9, p.182, 2004.

PERSIANI, S.; LARGER, P. Strategies to assess the drug interaction potential in translational medicine. **Expert Opin. Drug Metab.Toxicol.**, vol.5, p.675-686, 2006.

PERVAIZ, S.; OLIVO M. Art and science of photodynamic therapy. **Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.**, 2006.

PLAETZER, K.; KIESSLICH, T.; ERWANGER, T.V.; KRAMMER, B.; Krammer, B.: The modes of cell death induced by PDT: an overview. **Med. Laser Appl.**, vol.18, p.7-19, 2003.

PLAETZER K, KRAMMER B, BERLANDA J, BERR F, KIESSLICH T. Photophysics and photochemistry of photodynamic therapy: fundamental aspects. **Lasers Med Sci.**, vol.2. p 59-68, 2008.

PRIMO, L.F.; TEDESCO A.C.; BENTLEY, M.V.L.B. Photophysical studies and in vitro skin permeation/retention of Foscan[®]/Nanoemulsion (NE) applicable to Photodynamic Therapy skin cancer. **J. Nanosc. Nanotechnol.** v.8, p.340-347, 2008.

PRESTWICH, G.D. Evaluating drug efficacy and toxicology in three dimensions: using synthetic extracellular matrices in drug discovery. **Acc. Chem. Res.**, vol.41, p.139-148, 2008.

REMONTET, L.; ESTÈVE, J.; BOUVIER, A.M.; GROSCLAUDE, P.; LAUNOY G. ET AL. Cancer incidence and mortality in France over the period 1978-2000. **J. Rev. Epidemiol.**, vol.51, p.3-30, 2003.

RHEINWALD, J. G.; GREEN, H. Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells. **Cell.**, vol.6, p.331-43, 1975.

ROKITSKAYA, T.I.; BLOCK, M.; ANTONENKO, Y.N.; KOTOVA, E.A.; POHL, P. Photosensitizer binding to lipid bilayers as a precondition for the photoinactivation of membrane channels. **J. Biophys.**, vol.5, p.2572-2580, 2000.

ROSENTHAL, I.; Phtalocyanines as photodynamic sensitizers. **J. Photochem. Photobiol.**, vol.53, p.859-70, 1991.

ROSENTHAL, I.; BEN-HUR, E. Role of oxygen in the phototoxicity of phtalocyanines International. **J. Radiat. Biol.**, vol.67, p.85-91, 1995.

RUNGER, T.M.; EMMERT, S.; SCHADENDORF, D.; DIEM, C.; EPE, B.; HELLFRITSCH, D. Alterations of DNA repair in melanoma cell lines resistant to cisplatin, fotemustine, or etoposide. **J. Investig. Dermatol.**, vol.114, p.34-39, 2000.

RUNNELS, J.M.; CHEN, N.; ORTEL, B.; KATO, D.; HASAN, T. BPD-MA mediated photosensitization in vitro and in vivo: cellular adhesion and beta1 integrin expression in ovarian cancer cells. **Br. J. Cancer.**, vol.80, p.946-953, 1999.

SANQUER, S.; COULOMB, B.; LEBRETON, C.; DUBERTET, L. Human dermal fibroblasts modulate the effects of retinoids on epidermal growth. **J. Invest. Dermatol.**, vol.6, p.700-04, 1990.

SAPRA, P.; TYAGI, P.; ALLEN, T.M. Ligand-targeted liposomes for cancer treatment. **Curr. Drug. Deliv.**, vol.4, p.369-381, 2005.

SATYAMOORTHY, K., OKA, M., HERLYN, M. An Antisense Strategy for Inhibition of Human Melanoma Growth Targets the Growth Factor Pleiotrophin. **Pigment Cell Res.**, vol. 8, p.87-93, 2000.

SCARPA, M.V.; OLIVEIRA, A.G.; CARDILLO, J.A.; WANCZINSKI, B.J.; ARNÓBIO ANTÔNIO DA SILVA JÚNIOR, A.A.S. Studies on the controlled drug delivery and drug targeting through liposomes. **Rev. Bras. Med.**, p.238-244.

SCHERPHOF, G.; CZARNETZKI, B.M. Drug resistance of malignant melanoma. Mechanisms and possible modulation. **Hautarzt.**, vol.10, p.678-84, 1994.

SERRONE, L.; HERSEY, P. The chemoresistance of human malignant melanoma: an update. **Melanoma Res.**, vol.9, p.51-58, 1999.

SHARMAN, W.M.; ALLEN, C.M.; VAN LIER, J.E. Liposomes in drug delivery. **Drug. Discov. Today.**, vol.4, p.507, 1999.

SILVA, A.R.; INADA, N.M.; RETTORI, D.; BARATTI, M.O.; VERCESI, A.E.; JORGE, R.A. In vitro photodynamic activity of chloro(5,10,15,20-tetraphenylporphyrinato) indium(III) loaded-poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles in LNCaP prostate tumour cells. **J. Photochem. Photobiol. B: Biol.**, vol.94, p.101-112, 2009.

SLAPER, H.; VELDERS, G.J.M.; MATTHIJSEN, J.J. Estimates of ozone depletion and skin cancer incidence to examine the Vienna Convention achievements. **Nature**, vol.384, p.256-258, 1996.

SMALEY, K.; LIONI, M.; NOMA, K.; HAASS, K. N.; HERLYN, M. In vitro three-dimensional tumor microenvironment models for anticancer drug discovery. **Drug.Discov.**, vol.3, p.1-10, 2008.

SOUSA, J. F.; ESPREAFICO, E. M. Suppression subtractive hybridization profiles of radial growth phase and metastatic melanoma cell lines reveal novel potential targets. **BMC Cancer**, v. 8, p. 1-18, 2008.

SPIKES, J. Photosensitizing properties of porphyrin in model cell systems. **Prog. Clin. Biol. Res.** p.51-60, 1984.

SPILLER, W. Singlet Oxygen Quantum Yields of Different Photosensitizers in Polar Solvents and Micellar Solutions. **J. Porphyr. Phthalocyanines.** vol.2, p.145-48, 1998.

STERNBERG, E.G.; DOLPHIN, D. Second generation photodynamic agents: a review. **J. Clin. Laser Med. Surg.**, vol.11, p.233-41, 1993.

TEDESCO, A.C.; ROTTA, J.C.G.; LUNARDI, C.N. Synthesis, Photophysical and Photochemical aspects of phthalocyanines for photodynamica therapy. **Curr. Org. Chem.**, v.7, p.187-196, 2003.

TORCHILIN, V.P. Strategies and means for drug targeting: an overview. **Biomed. Drug Targ.**, p.3-26, 2002.

TORCHILIN, V.P.; LUKYANOV, A.N.; GAO, Z.; PAPAHAADJOPOULOS-STERNBERG B. Immunomicelles: targeted pharmaceutical carriers for poorly soluble drugs. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, vol.100, p.6039–6044, 2003.

TORCHILIN, V.P. Multifunctional nanocarriers. **Adv. Drug. Deliv. Rev.**, vol.14, p.1532-1555, 2006.

TRIVEDI, N.S.; WANG, H.W.; NIEMINEN, A.L.; OLEINICK, N.L.; IZATT, J.A. Quantitative analysis of Pc4 localization in mouse lymphoma (LY-R) cells via double-label confocal fluorescence microscopy. **J. Photochem. Photobiol.**, vol.71, p.634-639, 2000.

TURRO, N.J. Convenient and simple methods for the observation of phosphorescence in fluid solutions. Internal and external heavy atom and micellar effects. **J. Photochem. Photobiol.**, vol.27, p.523-529, 1978.

VAN HENEGOUWEN, G.M.; STEENVOORDEN D.P. The use of endogenous antioxidants to improve photoprotection. **J. Photochem. Photobiol. B. Biol.**, vol.2, p.1-10, 1997.

VAN HILLEGERSBERG R, KORT WJ, WILSON JH. Current status of photodynamic therapy in oncology. **Drugs.**, vol.5, p. 510-527, 1994.

VAN LIER, J.; SPIKES, J. The chemistry, photophysics and photosensitizing properties of phthalocyanines. **Ciba Foundation Symposium.**, vol.149, p.17-26, 1989.

VILLANUEVA, J.; HERLYN, M. Melanoma and the tumor microenvironment **Curr. Oncol.**, vol.5, p.439-446, 2008.

VIOLA, A. et. al. ESR studies of a series of phthalocyanines. Mechanism of phototoxicity comparative quantitation of O₂ - using ESR - spin trapping and cytochrome c reduction techniques. **Free Rad. Res.**, vol.28, p.517-32, 1998.

VISTICA, D.T.; SKEHAN, P.; SCUDIERO, D.; MONKS, A.; PITTMAN, A.; BOYD, M.R. Tetrazolium-based assays for cellular viability: a critical examination of selected parameters affecting formazan production. **Cancer Res.**, vol.10, p.2515-2520, 1991.

VISWANATHAN, K.; NATARAJAN, P. Photophysical properties of thionine and phenosafranine dyes covalently bound to macromolecules. **J. Photochemistry Photobiology.**, vol.95, p.245, 1996.

VULTUR A, HERLYN M. Cracking the system: melanoma complexity demands new therapeutic approaches. **Pigment Cell Mel. Res.** v. 1, p. 4-5, 2009.

WEBER, J.E.; GONI, A.R.; PUSIOL, D.J.; THOMSEN, C. Raman spectroscopy on surfacted ferrofluids in a magnetic field. **Phys. Rev.**, vol.66, p.1407, 2002.

WICKETT, R.R.; VISSCHER, M.O. Structure and function of the epidermal barrier. **Am. J. Infect. Control.**, vol.34, p.98, 2006.

WONGSAGONSUP, R.; SHOBSNGOB, S.; OONKHANOND, B.; VARAVINIT, S. Zeta Potential Analysis for the Determination of Protein Content in Rice Flour. **Starch/Stärke.**, vol.57, p.25-31, 2005.

ZHAOA, B.; YINB, J.J.; BILSKIA, P.J.; CHIGNELLA, C.F. et. al. Enhanced photodynamic efficacy towards melanoma cells by encapsulation of Pc4 in silica nanoparticles. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**; vol.241, p.163-172, 2009.

ZHOU, C. Mechanisms of tumor necrosis induced by photodynamic therapy. **J. Photochem. Photobiol. B: Biol.**, vol.3, p.299-318, 1989.