PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO INTERUNIDADES BIOENGENHARIA
EESC / FMRP / IQSC – USP São Carlos

AÇÃO SINÉRGICA ENTRE TERAPIA FOTODINÂMICA E TERAPIA
HIPERTÉRMICA UTILIZANDO NANOBARRAS DE OURO

Versão corrigida da tese submetida ao Programa de Pós Graduação Interunidades Bioengenharia da Universidade de São Paulo visando a obtenção do título de Doutor em Ciências - ênfase em Bioengenharia.

Orientadora: Ana Maria de Guzzi Plepis

LUCAS FREITAS DE FREITAS

São Carlos

2016.

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

F862a Freitas de Freitas, Lucas
AÇÃO SINÉRGICA ENTRE TERAPIA FOTODINÂMICA E TERAPIA
HIPERTÉRMICA UTILIZANDO NANOBARRAS DE OURO / Lucas
Freitas de Freitas; orientadora Ana Maria de Guzzi
Plepis. São Carlos, 2016.

Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação
Interunidades Bioengenharia e Área de Concentração em
Bioengenharia -- Escola de Engenharia de São Carlos;
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto; Instituto de
Química de São Carlos, da Universidade de São Paulo,
2016.

1. Câncer. 2. Nanobarras. 3. Ouro. 4. Porfirina. 5.
Ftalocianina. 6. PDT. 7. hipertermia. I. Título.

Folha de aprovação

A todos aqueles que travam uma batalha diária contra o câncer, passando por sofrimentos inimagináveis, dedico este trabalho, na esperança de ter contribuído um pouco mais na erradicação dessa condição.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela presença, por todo o amparo e proteção durante toda a minha vida.

Aos meus pais, Agostinho e Fátima, pelos exemplos e ensinamentos morais que me garantiram uma conduta idônea e pelo sustento material que garantiu meu percurso.

Aos meus irmãos, Leandro, Luciana e Lisiane, os quais me apoiaram desde o início e contribuíram significativamente para que realizasse minhas aspirações.

À professora Dra. Ana Maria de Guzzi Plepis, cuja orientação foi fundamental para meu crescimento profissional e intelectual.

A Vitor Basso Schul que me apresentou a linha de pesquisa, o laboratório e me incentivou desde a graduação.

À Dra. Virgínia C. A. Martins, por todo o auxílio imprescindível e não menos abnegado que dispensou a mim, contribuindo de forma fundamental para a conclusão de meu trabalho.

Ao Dr. Nelson Junior, por todo o auxílio com a parte histológica e de biotério, além da amizade em todos esses anos.

À professora Dra. Janice Rodrigues Perussi, que gentilmente cedeu alguns dos materiais utilizados neste trabalho.

Ao professor Dr. Anderson Ribeiro, da Universidade Federal do ABC, que gentilmente sintetizou e cedeu as ftalocianinas utilizadas neste trabalho.

À professora Dra. Cristina Kurachi, juntamente com Dr. Clóvis Grecco, Dra. Lilian Tan Moriyama e Dra. Natalia Inada, os quais me auxiliaram em toda a parte *in vivo* deste trabalho e me acolhem até hoje de forma calorosa em seu laboratório.

A todos os integrantes do Grupo Yanagi Taiko, cujos momentos passados juntos me proporcionaram o alívio dos problemas do dia-a-dia e me fizeram sentir bem acolhido na cidade de São Carlos. Um agradecimento especial a Sônia Mitsue Kaibara, e Guilherme Kawamata, Kamila Kotsubo e Érika Takahashi pela amizade sincera.

A todos os meus colegas república, de doutorado e de laboratório, com os quais me diverti durante todos os momentos juntos, e aprendi lições preciosas para a vida.

Ao professor Dr. Michael R. Hamblin que, juntamente com Andrea Brissette, Nicole Devoe e Yingying Huang, me deram a oportunidade de fazer boa parte de meu doutorado em seu laboratório no Wellman Center for Photomedicine, Boston.

A William Bruillete, Florian Anzenruber, Fabiano Oliveira Antoniak, Sebastian Fischer e Tania Rogalska, amigos que fiz em Boston e cuja amizade iniciada lá permanece mesmo diante da distância que nos separa.

Um agradecimento especial a Mariana Moraes, Paula Llanos e Vanessa R. Machado, pois as considero irmãs, mais do que amigas.

Aos professores de todo o período do doutorado, que certamente contribuíram de alguma forma para meu crescimento pessoal.

Finalmente, à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP, que financiou a realização deste trabalho (Processo 2011-23660-0).

*"If I have seen further, it is by standing on the
shoulders of giants ". Isaak Newton, em referência a
Bernardo de Chartres*

RESUMO

DE FREITAS, L. F. **Ação sinérgica entre terapia fotodinâmica e terapia hipertérmica utilizando nanobarras de ouro.** 2016. 116 pp. Tese (Doutorado) - Programa de Pós Graduação Interunidades Bioengenharia, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2016.

Estudos com tratamento hipertérmico de tumores utilizando nanopartículas metálicas têm sido realizados durante as últimas décadas e mostram resultados bons quanto à remissão de tumores, por vezes chegando à cura completa. O mesmo acontece em relação aos tratamentos baseados em ação fotodinâmica de fotossensibilizadores. Tratamentos aliando a terapia hipertérmica com nanopartículas de ouro e a terapia fotodinâmica com diversos fotossensibilizadores tem efeito sinérgico e apresenta excelente potencial terapêutico, em que pese serem necessários mais estudos para que uma nova terapia conjunta possa ser implementada. A proposta deste trabalho foi investigar esse efeito sinérgico utilizando nanobastões de ouro complexados com fotossensibilizadores. Após a síntese dos nanobastões pelo método de *seeding*, a eficácia do tratamento fotodinâmico e da terapia hipertérmica, separadamente, foi investigada. A metodologia do recobrimento dos nanobastões por fotossensibilizador, em um primeiro momento, não logrou êxito com a porfirina, porém com a ftalocianina tetracarboxilada se mostrou mais eficaz. A taxa de fotodegradação da ftalocianina em solução foi investigada como parâmetro para a eficiência em geração de oxigênio singlete. Após centrifugação e lavagem das nanopartículas, no entanto, evidenciou-se por espectrofotometria que o fotossensibilizador não permaneceu aderido aos nanobastões. Em um segundo momento, optamos por recobrir os nanobastões por porfirinas tetrassulfonadas, com ou sem grupamentos metil-glucamina. Após o processo de recobrimento, essas ftalocianinas formaram complexos iônicos com o CTAB que recobre os nanobastões. Os complexos nanobastões-ftalocianinas foram analisados por microscopia eletrônica de transmissão e as taxas de geração de oxigênio singlete e de radical hidroxil foram investigadas. Além disso, foram utilizadas para testes *in vivo* e *in vitro* com células de melanoma melanótico (B16F10) ou amelanótico (B16G4F). As células tumorais em cultura ou os tumores em camundongos C57BL6 foram irradiados com luz em 635 nm e os tumores foram observados por 15 dias após o tratamento. Houve evidente aumento na geração de oxigênio singlete por ambos fotossensibilizadores, e maior geração de radicais livres por parte do fotossensibilizador metilglucaminado. O oposto ocorre com o fotossensibilizador sem metilglucamina. Houve, também, moderada citotoxicidade no escuro quando células foram incubadas com nanopartículas recobertas por ftalocianinas ou não. Quando ativados pela luz, os complexos ftalocianinas-nanobastões desencadearam um aumento de 5°C no meio de cultura das células, e a morte celular observada foi extensa (91% para a linhagem B16G4F e 95% para a linhagem B16F10). Tanto os resultados *in vitro* quanto os *in vivo* indicam que as propriedades das ftalocianinas testadas são melhoradas significativamente quando elas estão complexadas aos nanobastões. Este é um estudo pioneiro por utilizar duas porfirinas tetrassulfonadas específicas e por utilizar o mesmo comprimento de onda para a ativação dos fotossensibilizadores e nanobastões.

Palavras-chave: Câncer, nanobastões, ouro, porfirina, ftalocianina, PDT, hipertermia

ABSTRACT

DE FREITAS, L. F. **Synergic action between photodynamic therapy and hyperthermic therapy using gold nanorods.** 2016. 116 pp. Thesis (PhD) - Programa de Pós Graduação Interunidades Bioengenharia, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2016.

Studies with hyperthermic tumor ablation using metallic nanoparticles have been performed on the last decades, and show promising results on tumor remission, sometimes achieving the complete cancer elimination. The same occurs regarding on treatments based on photodynamic activity of photosensitizer compounds. Studies indicate that those therapeutic interventions - hyperthermic therapy using gold nanorods and photodynamic activity with many photosensitizers - together can present a synergistic effect, and offer a great therapeutic potential, although more investigation needs to be performed before such approach could be implemented. We proposed to investigate the effect of the attachment of photosensitizers onto the surface of gold nanorods (well-characterized devices for hyperthermia generation). After nanorods synthesis through a seed-mediated method, the PDT and hyperthermia's efficacy was assessed separately. The method used for covering the gold nanorods with photosensitizers did not permit, in a first approach, the attachment of porphyrins onto the nanoparticles surface, but the attachment of tetrasulfonated phthalocyanines was more successful. The phthalocyanine's degradation rate was assessed as an indirect parameter of singlet oxygen generation. After centrifuging and washing the nanoparticles, we saw that the photosensitizers do not keep attached to the nanorods. On a second approach, we chose to recover the nanorods with two zinc phthalocyanines - with or without methyl-glucamine groups. After the recovering process, the phthalocyanines formed ionic complexes with the CTAB that is previously recovering the nanoparticles. The nanorod-phthalocyanines complexes were analyzed by TEM, and their singlet oxygen and hydroxyl radical generation yield were assessed. Furthermore, they were tested *in vitro* in melanotic B16F10 and amelanotic B16G4F melanoma cells, and *in vivo*. The tumor cells (*in vitro*) and the tumor tissue (*in vivo*) with nanoparticles were irradiated with laser (at 635 nm), and the tumor growth in mice was observed for 15 days after the laser irradiation. It is evident the increase in the singlet oxygen generation, and higher HPF activation for the glucaminated Pc, but the inverse for the other photosensitizer. It seems like there is a type I to type II switch on the action mechanism of the latter Pc. A mild cytotoxicity was observed with the nanorods conjugated with photosensitizer in the dark, but when they are activated by light (and taken into account a 5° C rise in the temperature because of the surface plasmon resonance from the gold nanorods), the cell killing is intense (91% for B16G4F cell line, and 95% for B16F10 cell line). Both *in vitro* and *in vivo* results indicate that the photodynamic properties of the phthalocyanines tested are enhanced when they are attached onto the nanorods surface. This is a novel study because we used two tetrasulfonated phthalocyanines and because we used the same wavelength to activate both the nanorods and the photosensitizers.

Key words: Cancer, Nanorods, Gold, Porphyrin, Phthalocyanines, PDT, Hyperthermia

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Processo de malignização das células. Uma célula normal sofre várias mutações e ciclos de proliferação até ser transformada, perdendo o controle de seu crescimento. Fonte: ALISON, 2007.....22
- Figura 2:** Micrografia de luz mostrando um tumor primário superficial de melanoma. Fonte: <http://www.histopathology-india.net> (acessado em 04/12/2015).....26
- Figura 3:** Animais portadores de Tumor de Ehrlich. (A): um animal portando tumor ascítico e outro saudável. (B): vários animais portadores da forma sólida do tumor.....27
- Figura 4:** Quantum Dots emitindo em três diferentes comprimentos de onda em tumores murinos. Fonte: (Henry, 2004).....32
- Figura 5.** Mecanismo de ação dos lipossomas. Fonte: Somani, 2008 (adaptado).....33
- Figura 6:** Oscilação da nuvem eletrônica de uma partícula metálica esférica. Fonte: Hao; Schatz, 2004 (adaptado).....35
- Figura 7:** Coloração e bandas de ressonância de nanobastões com razões de proporção variando de 2,12 até 5,56. Fonte: (ROZANOVA; ZHANG, 2009) (adaptado).....41
- Figura 8:** Fórmula estrutural condensada linear do brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB).....42
- Figura 9.** CTAB formando uma bicamada em torno de uma nanobastão de ouro. Fonte: (PARK et al., 2007) (adaptado).....43
- Figura 10:** Estrutura química da porfirina, como encontrada no produto Photogem®.....59
- Figura 11.** Estrutura química de uma molécula de TPPS₄, a porfirina tetrassulfonada.....59
- Figura 12.** Procedimento do tratamento hipertérmico. Irradiação de camundongo portador de tumor de Ehrlich por luz em comprimento de onda de 808 nm (dose de luz de 216 J cm⁻²). Um

Termistor digital foi utilizado para medir a temperatura da superfície e da base do tumor.....62

Figura 13. Estrutura química da ftalocianina tetracarboxilada. Neste trabalho, o metal central é o zinco, e no caso da ftalocianina tetracarboxilada com metilglucamina, dois dos radicais - R são hidroxilas, e os outros dois são metilglucamina. Na ausência de metilglucamina, os quatro radicais - R são hidroxilas (OH). Fonte: autor.....66

Figura 14. Espectro de absorção dos nanobastões de ouro.....70

Figura 15. Curva de sobrevivência de camundongos portadores de tumor de Ehrlich após tratamento hipertérmico. Cada ponto das curvas representa o número de animais vivos (de acordo com o eixo Y) nos dias que se seguiram após o tratamento (de acordo com o eixo X). Em preto, os animais controle; em vermelho os animais tratados hipotermicamente.....71

Figura 16. Cinética de acúmulo de Photogem® ($1,0 \text{ mg kg}^{-1}$) no foco tumoral após administração por via intraperitoneal. Em preto, a autofluorescência do tumor, e em vermelho a fluorescência do tumor após a administração de Photogem®.....72

Figura 17. Cinética de acúmulo de Photogem® ($1,0 \text{ mg kg}^{-1}$) no foco tumoral após administração por via peritumoral. Em preto, a autofluorescência do tumor, e em vermelho a fluorescência do tumor após a administração de Photogem®.....73

Figura 18. Crescimento dos tumores após tratamento fotodinâmico utilizando Photogem® ($1,5 \text{ mg kg}^{-1}$, luz em 630 nm e doses de 90 J cm^{-1} para animais tratados por 10 minutos, e de 180 J cm^{-1} para animais tratados por 20 minutos.....74

Figura 19. Cinética de acúmulo de porfirina tetrassulfonada ($1,0 \text{ mg kg}^{-1}$) no foco tumoral após administração por via endovenosa. Em preto, a autofluorescência do tumor, e em vermelho a fluorescência do tumor após a administração de TPPS₄.....75

Figura 20. Espectro de absorção de solução aquosa de TPPS₄ e solução aquosa de nanobastões com porfirina. A seta verde indica onde a contribuição da banda de Soret da ftalocianina deixa de aparecer no espectro das nanobarras.....76

Figura 21. Espectros de fluorescência de solução aquosa de TPPS₄ e de soluções de nanobastões conjugados com porfirina (excitação de 360 a 1050 nm).....77

Figura 22: Taxa de fotodegradação de ftalocianina tetracarboxilada de zinco em solução aquosa com 0,2% de surfactante Tween 80, concentrações de 1,0 e $2,0 \times 10^{-6} \mu\text{g mL}^{-1}$ 78

Figura 23. Espectro de absorção dos nanobastões de ouro, ftalocianina tetracarboxilada metilglucaminada de zinco (ZnTcPc-G) e dos complexos nanobastões-ftalocianinas (antes e depois da centrifugação), bem como dos sobrenadantes.....80

Figura 24. Espectro de absorção dos nanobastões de ouro, ftalocianina tetracarboxilada de zinco (ZnTcPc) e dos complexos nanobastões-ftalocianinas (antes e depois da centrifugação), bem como dos sobrenadantes.....81

Figura 25. Imagem de microscopia eletrônica de transmissão (TEM) de nanobastões de ouro sem recobrimento por fotossensibilizador. A barra preta representa 100 nm. Aumento de 18.000 X. HV = 80,0 kV.....82

Figura 26. Imagem de microscopia eletrônica de transmissão (MET) de nanobastões de ouro recobertas por ZnTcPc-G. A barra preta representa 100 nm. Aumento de 18.000 X. HV = 80,0 kV.....82

Figura 27. Imagem de microscopia eletrônica de transmissão (MET) de nanobastões de ouro recobertos por ZnTcPc. A barra preta representa 100 nm. Aumento de 18.000 X. HV = 80,0 kV.....83

Figura 28. Imagem de microscopia eletrônica de transmissão (TEM) de nanobastões de ouro sem recobrimento por fotossensibilizador. A barra preta representa 100 nm. Aumento de 46.000 X. HV = 80,0 kV.....83

Figura 29. Imagem de microscopia eletrônica de transmissão (MET) de nanobastões de ouro recobertas por ZnTcPc-G. A barra preta representa 100 nm. Aumento de 46.000 X. HV = 80,0 kV.....84

Figura 30. Imagem de microscopia eletrônica de transmissão (MET) de nanobastões de ouro recobertos por ZnTcPc. A barra preta representa 100 nm. Aumento de 46.000 X. HV = 80,0 kV.....84

Figura 31. Comparação entre a geração de oxigênio singlete dos nanobastões de ouro recobertos somente por CTAB, somente os fotossensibilizadores ZnTcPc e ZnTcPc-G, além dos complexos nanobastões-ftalocianinas. A dose de luz utilizada foi de 1 J cm^{-2} 85

Figura 32. Comparação entre a geração de radicais hidroxil dos nanobastões recobertos somente por CTAB, dos fotossensibilizadores ZnTcPc e ZnTcPc-G, e dos complexos nanobastões-ftalocianinas. A dose de luz utilizada foi de 1 J cm^{-2} 86

Figura 33. Resultados do teste de viabilidade celular por Azul de Presto para células da linhagem B16G4F, 12 horas após a PDT utilizando luz em 635 nm, 20 J cm ⁻² . Todos os grupos apresentam diferença estatística em relação aos controles.....	88
Figura 34. Resultados do teste de viabilidade celular por Azul de Presto para células da linhagem B16F10, 12 horas após a PDT utilizando luz em 635 nm, 20 J cm ⁻² . Todos os grupos apresentam diferença estatística em relação aos controles.....	88
Figura 35. Tumor melanótico de um animal antes dos tratamentos fotodinâmico e hipertérmico.....	90
Figura 36. Tumor melanótico de um animal controle 15 dias após a irradiação dos grupos experimentais.....	90
Figura 37. Tumor melanótico de um animal tratado com PDT utilizando ZnTcPc, quinze dias após o tratamento.....	91
Figura 38. Tumor melanótico de um animal tratado com PDT utilizando ZnTcPc-G, quinze dias após o tratamento.....	91
Figura 39. Tumor melanótico de um camundongo tratado hipertermicamente com nanobastões, quinze dias após o tratamento.....	92
Figura 40. Região onde foi implantado o tumor melanótico em um animal tratado com nanobastões de ouro recobertos por ZnTcPc, quinze dias após a irradiação.....	92
Figura 41. Outro ângulo de visão do camundongo mostrado na figura anterior: região onde foi implantado o melanoma melanótico em um animal tratado com nanobastões recobertos por ZnTcPc, quinze dias após o tratamento.....	93
Figura 42. Região onde foi implantado melanoma melanótico em um animal tratado com nanobastões de ouro recobertos por ZnTcPc-G, quinze dias após a irradiação.....	93
Figura 43. Outro ângulo de visão do camundongo mostrado na figura anterior: área onde foi implantado melanoma melanótico em camundongo tratado com nanobastões recobertos por ZnTcPc-G, quinze dias após a irradiação.....	94
Figura 44. Fotomicrografia de um tumor de animal controle com aumento de 100 vezes, mostrando uma área necrótica eosinofílica ao centro (N) e grande quantidade de células de melanoma basofílicas ao redor (M).....	95
Figura 45. Fotomicrografia de um tumor de animal controle com aumento de 400 vezes, mostrando uma área necrótica eosinofílica à direita (N) e grande quantidade de células de melanoma basofílicas à esquerda (M).....	95
Figura 46. Fotomicrografia de um tumor de animal tratado com PDT utilizando ZnTcPc com aumento de 100 vezes, mostrando uma extensa área necrótica eosinofílica formada após 5 dias da terapia.....	96

Figura 47. Fotomicrografia de um tumor de animal tratado com PDT utilizando ZnTcPc com aumento de 400 vezes, mostrando uma extensa área necrótica eosinofílica formada após 5 dias da terapia.....	96
Figura 48. Fotomicrografia de um tumor de animal tratado com PDT utilizando ZnTcPc-G com aumento de 100 vezes, mostrando uma extensa área necrótica eosinofílica formada após 5 dias da terapia.....	97
Figura 49. Fotomicrografia de um tumor de animal tratado com PDT utilizando ZnTcPc-G com aumento de 400 vezes, mostrando uma área necrótica eosinofílica formada após 5 dias da terapia.....	97
Figura 50. Fotomicrografia de um tumor de animal tratado hipotermicamente utilizando anobarras, com aumento de 100 vezes, mostrando uma extensa área necrótica eosinofílica formada após 5 dias da terapia.....	98
Figura 51. Fotomicrografia de um tumor de animal tratado hipotermicamente utilizando nanobastões de ouro, com aumento de 400 vezes, mostrando uma área necrótica eosinofílica e algumas áreas de congestão sanguínea formadas após 5 dias da terapia.....	99
Figura 52. Fotomicrografia de um tumor de animal tratado com hipertermia e PDT utilizando nanobastões recobertos por ZnTcPc-G com aumento de 100 vezes, mostrando uma extensa área necrótica eosinofílica formada após 5 dias da terapia.....	100
Figura 53. Fotomicrografia de um tumor de animal tratado com hipertermia e PDT utilizando nanobastões recobertos por ZnTcPc-G com aumento de 400 vezes, mostrando uma extensa área necrótica eosinofílica formada após 5 dias da terapia.....	101
Figura 54. Fotomicrografia de um tumor de animal tratado com hipertermia e PDT utilizando nanobastões recobertos por ZnTcPc com aumento de 100 vezes, mostrando uma extensa área necrótica eosinofílica formada após 5 dias da terapia.....	101
Figura 55. Fotomicrografia de um tumor de animal tratado com hipertermia e PDT utilizando nanobastões recobertos por ZnTcPc com aumento de 400 vezes, mostrando uma extensa área necrótica eosinofílica formada após 5 dias da terapia.....	102

LISTA DE ABREVIATURAS

ALA - Ácido Aminolevulênico

bFGF - Fator Básico de Crescimento de Fibroblastos (do inglês, *basic Fibroblasts Growth Factor*)

Ce6 - Clorina e6

CTAB - Brometo de Cetiltrimetilamônio (do inglês, *Cethyltrimethylammonium bromide*)

DMEM - Meio de cultura Eagle modificado por Dulbecco (do inglês, *Dulbecco's Modified Eagle Medium*)

DNA - ácido desoxirribonucléico

FDA - *Food and Drug Administration*

GN - Nanobastões de Ouro (do inglês, *gold nanorods*)

HO[•] - Radical hidroxil

HSP - Proteína de Choque Térmico (do inglês, *Heat Shock Proteins*)

ICG - Indocianina *Green*

IL-3 - Interleucina 2

NK - Células *Natural Killer*

¹O₂- Oxigênio Singlete

PBS - Tampão Salina Fosfato (do inglês, *Phosphate Buffered Saline*)

PDT - Terapia Fotodinâmica (do inglês, *Photodynamic Therapy*)

PEG - Polietileno glicol

P-gp-P-glicoproteína

PpIX - protoportifirina IX

RNA - Ácido ribonucléico

ROS - Espécies reativas de oxigênio (do inglês, *reactive oxygen species*)

TNF - Fator de Necrose Tumoral (do inglês, *Tumoral Necrosis Factor*)

TTPS - Porfirina tetracarboxilada(meso-tetrakis (4-sulfonato-fenil) porfirina)

VEGF - Fator de Crescimento Endotelial Vascular (do inglês, *Vascular Endothelium Growth Factor*)

ZnTcPc - Porfirina tetrassulfonada de zinco

ZnTcPc-G - Porfirina tetrassulfonada de zinco com grupamentos metil-glucamina

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	21
2.1. CÂNCER.....	21
2.2. MELANOMA	25
2.3. TUMOR DE EHRLICH.....	27
2.4. TRATAMENTOS	28
2.5. NANOTECNOLOGIA NO TRATAMENTO E DIAGNÓSTICO DE CÂNCER	31
2.6. HIPERtermia	37
2.7. TERAPIA HIPERTÉRMICA COM NANOBASTÕES	39
2.8. TERAPIA FOTODINÂMICA	45
2.9. FOTOSSENSIBILIZADORES.....	48
2.10. MORTE CELULAR POR APOPTOSE OU NECROSE.....	51
3. JUSTIFICATIVA.....	55
4. OBJETIVOS	56
4.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	56
5. MATERIAL E MÉTODOS	57
5.1. Métodos para porfirina comercial (Photogen®) e porfirina tetrassulfonada.....	57
5.1.1. Síntese dos nanobastões	57
□ Síntese das sementes	57
□ Síntese dos nanobastões	57
□ Caracterização dos nanobastões	58
5.1.2. Fotossensibilizadores	58
Fonte: Próprio autor.	59
5.1.3. Animais experimentais	59
5.1.4. Manutenção das Células Tumerais.....	60
5.1.5. Inoculação do Tumor de Ehrlich	61
5.1.6. Tratamento Hipertérmico	61
5.1.7. Cinética de Acúmulo de Porfirina no Tumor	62
5.1.8. Tratamento Fotodinâmico	63
5.1.9. Análise de Sobrevida	63
5.1.10. Observação do Volume Tumoral	63
5.1.11. Síntese de Nanobastões acoplados a Fotossensibilizador	63
5.1.12. Fotodegradação de porfirina tetrassulfonada	64

5.2. Métodos para ftalocianina tetracarboxilada de zinco e ftalocianina tetracarboxilada metilglucaminada de zinco.....	65
5.2.1. Fotossensibilizadores utilizados	65
5.2.2. Recobrimento dos nanobastões por ftalocianinas.....	66
5.2.3. Análise da geração de oxigênio singlete	67
5.2.4. Análise da geração radical hidroxil	67
5.2.5. Verificação da fototoxicidade <i>in vitro</i>	68
5.2.6. Avaliação da citotoxicidade <i>in vivo</i>	68
5.2.7. Análise histológica	69
5.2.8. Análise estatística.....	69
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	70
6.1. Experimentos para recobrimento com porfirinas (primeira etapa do trabalho).....	70
6.1.1. Caracterização das nanopartículas sem fotossensibilizador	70
6.1.2. Terapia hipotérmica em camundongos portadores de tumor de Ehrlich	71
6.1.3. Cinética de acúmulo de Photogem® no tumor.....	72
6.1.4. Terapia fotodinâmica em camundongos portadores de tumor de Ehrlich	73
6.1.5. Cinética de acúmulo de porfirina tetrassulfonada (TPPS ₄) no tumor.....	74
6.1.6. Recobrimento dos nanobastões por porfirinas	75
6.1.7. Taxa de fotodegradação de porfirina tetrassulfonada de zinco	77
6.2. Recobrimento com ftalocianinas tetracarboxiladas de zinco	79
6.2.1. Recobrimento dos nanobastões por ZnTcPc e ZnTcPc-G.....	79
6.2.2. Geração de oxigênio singlete por ZnTcPc e ZnTcPc-G acopladas ou não a nanobastões ..	85
6.2.3. Geração de radical hidroxil por ZnTcPc e ZnTcPc-G acopladas ou não a nanobastões	86
6.2.4. Terapias fotodinâmica e hipotérmica <i>in vitro</i>	87
6.2.5. Terapias fotodinâmica e hipotérmica <i>in vivo</i>	89
8. CONCLUSÃO	104
9. CONTINUIDADE DO TRABALHO	106
ANEXO 1 - PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA - Brasil.....	114
ANEXO 1 - PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA - Estados Unidos	115

1. INTRODUÇÃO

O câncer é uma desordem fisiológica de grande incidência cuja característica principal é o crescimento anormal e alta demanda energética, podendo fazer uso de substratos como glicose, lipídios ou aminoácidos. Pela alta necessidade energética, as células tumorais utilizam os nutrientes do próprio hospedeiro, presentes no sangue, o que leva ao surgimento de adaptações orgânicas visando à preservação de tecidos nobres como o sistema nervoso central e a musculatura cardíaca. O que mais se observa é o estabelecimento de um quadro de acidose, uma vez que os tecidos menos nobres passam a ter um metabolismo anaeróbio em decorrência da priorização do uso da glicose pelos outros tecidos (GROSVENOR; BULCAVAGE; CHLEBOWSKI, 1989). Sugere-se que tal modificação metabólica deve-se a um aumento no *turn over* de glicose que pode ter um custo energético maior de 260 Kcal/dia ou entre 10 e 15% do total de energia gasto por um indivíduo (EDÉN et al., 1984).

Os tratamentos clássicos para o câncer incluem a remoção cirúrgica de tumores sólidos, radioterapia, quimioterapia, imunoterapia, hormonioterapia, entre outros. Porém, devido às altas taxas de reincidência de tumores, bem como o desgaste orgânico proporcionado por tais intervenções, há uma crescente procura pelo desenvolvimento de terapias mais eficazes, porém menos invasivas e debilitantes. Nas últimas décadas, um esforço significativo tem sido feito para desenvolver intervenções terapêuticas baseadas em luz ou em laser, sendo sua interação com as células e tecidos a base para a maioria delas (ROZANOVA; ZHANG, 2009). Um dos principais efeitos desencadeados pela aplicação de ondas eletromagnéticas, como o laser, em tecidos é o hipertérmico.

Alguns estudos revelam os efeitos da hipertermia visando à morte celular. Experimentos *in vitro* e em animais demonstram indução de morte celular quando as células são expostas a temperaturas entre 42 e 47°C, que é proporcional ao tempo de tratamento hipertérmico. Em alguns tipos de tumor, o tratamento hipertérmico é capaz de diminuir o fluxo sanguíneo na região tratada, levando a um quadro de acidose e hipóxia local (HILDEBRANDT et al., 2004).

Observou-se que a hipertermia gera modificações na permeabilidade e na conformação das membranas celulares, porém pouco se sabe sobre a relação dessas modificações e as taxas de morte celular obtidas no tratamento hipertérmico. Além disso, são observadas alterações no citoesqueleto, o que desencadeia deformidades e desregulação de ciclo celular.

Paralelamente, há agregação de proteínas nucleares desnaturadas na matriz nuclear, o que é capaz de prejudicar funções celulares, tais como a síntese e o reparo de DNA e RNA.

Por fim, a hipertermia é capaz de desencadear a morte celular tanto por necrose quanto por apoptose (HILDEBRANDT, 2002), porém, o mecanismo de ativação da cascata apoptótica ainda não está totalmente elucidado. Estudos indicam um aumento da proteína p53 em células tratadas hipertermicamente. Essa proteína é um dos principais ativadores da cascata apoptótica, e é sintetizada em grande quantidade mediante estímulos apoptóticos. Pequenas bolhas na membrana plasmática, em decorrência do tratamento hipertérmico, podem desencadear apoptose, porém o mecanismo de sinalização não foi comprovado (LAPOTKO et al., 2006). Ainda, quando células em fase S do ciclo celular são tratadas hipertermicamente, alguns fragmentos de DNA tendem a fundir-se incorretamente, levando a célula à apoptose (BULLIVANT, 2008).

Estudos *in vitro* são os mais frequentemente realizados, e mostram que 10 exposições de 60 μ s a um laser no infravermelho próximo com potência de 7 mW já são suficientes para comprometer a integridade da membrana plasmática das células tumorais, o que pode ser evidenciado por parâmetros bioquímicos relativos ao estresse oxidativo (HUFF et al., 2007), com mínima perda de integridade de membrana de células não malignas (LAPOTKO et al., 2006).

O'Neal e colaboradores (O'NEAL et al., 2004) utilizaram partículas de sílica recobertas com ouro em camundongos portadores de carcinoma no flanco, sendo que após o tratamento houve redução total do volume do tumor e não foi observada reincidência do carcinoma nesses animais. Em um experimento em humanos, taxas de morte maiores que 99% foram observadas para células de leucemia, enquanto até 87% das células de medula normais ao redor não sofreram danos (LAPOTKO et al., 2006). Apesar dos resultados observados, poucos são os estudos realizados até a presente data utilizando modelos animais ou humanos e há várias conformações de nanopartículas que poderiam ser analisadas.

As partículas mais amplamente utilizadas nas últimas décadas são as nanopartículas de ouro maciças, em geral recobertas por um polímero como o polietilenoglicol (PEG), além das partículas compostas por um núcleo de sílica recoberto por uma camada metálica ultrafina (O'NEAL et al., 2004). As nanopartículas de ouro destacam-se devido às propriedades intrínsecas deste metal, que incluem baixa toxicidade, flexibilidade conformacional, e ressonância plasmônica de superfície na região da luz visível e do infravermelho próximo. Esta última propriedade permite a geração de calor através da irradiação eletromagnética, observada no tratamento hipertérmico (HIRSCH et al., 2006).

Uma nova conformação para nanopartículas metálicas chama a atenção dos pesquisadores nos últimos anos, os nanobastões de ouro (*gold nanorods*). Estes são facilmente sintetizados a partir de partículas de ouro pré-formadas de maneira simples, além de apresentarem uma maior superfície disponível para interação com o infravermelho próximo por unidade de volume, quando comparadas a outras conformações de nanopartículas. Em geral são recobertas por moléculas de brometo de cetiltrimetilamônio (do inglês CTAB) (HUFF et al., 2007).

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. CÂNCER

O câncer atualmente tem uma grande prevalência na população mundial, apesar das taxas de mortalidade para muitas formas dessa doença terem mudado significativamente nos últimos anos, a exemplo da diminuição da mortalidade global de mulheres por câncer de útero, estômago, fígado e colo uterino. Quanto ao câncer de pulmão, sua incidência continua a aumentar em ambos os sexos. A incidência de câncer depende muito da região geográfica, ou seja, dos fatores ambientais e comportamentais das diferentes localidades do planeta. Exemplos de fatores de risco incluem obesidade, abuso de álcool, cigarro, idade e hereditariedade.

Foi demonstrado que temos, durante a vida, centenas de iniciações, ou seja, alterações genéticas em uma célula capazes de alterar sua capacidade proliferativa e sua sobrevivência. No entanto, o sistema imunológico e o sistema de reparo celular são capazes de neutralizar, senão todas, a sua maioria. Em outras palavras, em situações fisiológicas, fatores de crescimento e citocinas são responsáveis por controlar a proliferação celular quando se ligam aos receptores de membrana das células, podendo exercer atividade inibitória ou excitatória. Quando uma célula iniciada escapa dos mecanismos de controle, perpetua suas mutações e adquire outras, pode ser promovida a uma célula maligna e, por sua proliferação descontrolada e imortalização, leva o paciente a desenvolver um câncer, como mostra a figura 1 (KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2005; ALISON, 2007; INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER, 2008).

O câncer é um dos processos patológicos que levam mais prejuízo ao organismo dos pacientes, e sua incidência é cada vez maior, principalmente em decorrência dos hábitos cotidianos desregrados e do aumento da expectativa de vida. Essa desordem fisiológica de alta incidência tem por características principais uma alta demanda metabólica e um crescimento anormal, o que leva a um consumo de nutrientes do organismo hospedeiro que acaba por induzir adaptações orgânicas visando à preservação de tecidos nobres como o cardíaco e o nervoso. Devido à alta atividade metabólica, as células cancerosas consomem substratos orgânicos como glicose, lipídeos e aminoácidos em grande quantidade, sendo uma das

principais consequências o aparecimento de um quadro de acidose, já que a maioria dos tecidos passa a ter um metabolismo anaeróbico em virtude da priorização do uso de nutrientes pelos tecidos nobres (KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2005).

Figura 1: Processo de malignização das células. Uma célula normal sofre várias mutações e ciclos de proliferação até ser transformada, perdendo o controle de seu crescimento.

Fonte: ALISON, 2007.

A proliferação desordenada das células cancerosas tem início com as alterações genéticas não-letais, chamadas de mutações, as quais podem ser herdadas ou adquiridas por agentes biológicos, químicos ou físicos. Em grande parte dos tecidos neoplásicos, uma única célula carregando a mutação sofre uma intensa e descontrolada expansão clonal e acaba por formar uma massa amorfa de células indiferenciadas, após várias outras mutações (INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER, 2008).

A carcinogênese biológica deve-se principalmente à ação de vírus, como o do papiloma humano (HPV), de Epstein-Barr (EBV), da hepatite B (HBV) e do linfoma de

células T (HTLV). O processo de inserção de seu DNA no material genético do hospedeiro, bem como as próprias proteínas sintetizadas pela transcrição de seu material genético podem gerar mutações permanentes e incitar a carcinogênese (INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER, 2008).

No caso de agentes físicos agindo como fatores carcinogênicos, podemos citar a ação das radiações, principalmente as ionizantes, como causadora de mutações e outros danos ao ácido desoxirribonucleico (DNA), tanto de forma direta (ação ionizante na própria cadeia nucleotídica) quanto indireta (pela ação de espécies reativas geradas a partir da interação da radiação com moléculas de água ou de oxigênio). Como exemplo, a radiação ultravioleta nas faixas UVA e UVB são conhecidas por propiciar o aparecimento de tumores de pele, uma vez que, ao interagir com a molécula de DNA, tal radiação promove dimerização de pirimidinas, além de exercerem um efeito imunossupressor. Outras radiações, tais como partículas alfa e beta, radiação gama e raios X também são capazes de induzirem mutações por ação direta no material genético (Instituto Nacional do Câncer, 2008).

A carcinogênese química pode ser dividida em duas fases principais: iniciação e promoção. A primeira é resultado da ação de um agente carcinogênico capaz de gerar uma mutação permanente e que pode manter-se silenciosa até que haja a ação de um agente promotor, tornando a célula propensa a tornar-se um tumor. A promoção decorre da ação de agentes capazes de induzir mutações por incitarem a proliferação celular, malignizando a célula. Tais agentes incluem compostos como asbesto, mediadores inflamatórios e compostos produzidos na inflamação, hormônios e fatores de crescimento, além de compostos tóxicos presentes na alimentação (principalmente de produtos industrializados), no cigarro ou no ambiente em geral (gases tóxicos, metais pesados, entre outros).

Ao contrário dos agentes iniciadores, a ação dos promotores não afeta diretamente o DNA e é reversível. Para que as células iniciadas sejam promovidas e tornem-se malignas (transformação), é necessário que os agentes promotores permaneçam no ambiente por um período relativamente grande, e a célula deve sofrer ao menos um ciclo de proliferação (que envolve a replicação do material genético) carregando a mutação para que esta torne-se permanente. As células iniciadas respondem de maneira singular aos agentes promotores, sofrendo, então, uma expansão seletiva. Os clones iniciados proliferam de maneira forçada, o que incita o surgimento de novas mutações. Após passar por essas duas etapas, ocorre a fase de proliferação, onde o tumor cresce mais ou menos rapidamente, dependendo do tipo de câncer e de vários outros fatores (KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2005; ALISON, 2007; INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER, 2008).

As mutações que predisõem ao aparecimento de neoplasias podem ocorrer em três grupos de genes principais: os proto-oncogenes promotores do crescimento (como os genes N-myc, L-myc, N-Ras e H-Ras), os genes supressores dos inibidores de crescimento tumoral (tais como os genes Rb, p53, BRCA 1 e 2), e os reguladores da apoptose (genes ligados ao controle do ciclo celular) (ALISON, 2007). Os proto-oncogenes são considerados dominantes, visto que a mutação de um dos alelos é suficiente para malignizar a célula. Os supressores de inibidores do crescimento tumoral são recessivos, enquanto que os reguladores da apoptose podem ser considerados dominantes ou recessivos. Outro grupo de genes importantes para a carcinogênese são os relacionados ao reparo de DNA, pois influenciam na proliferação e na sobrevivência das células e, se mutados, podem facilitar a iniciação de células (KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2005).

Com o crescimento descontrolado, surge a necessidade da formação de novos vasos sanguíneos quando o diâmetro do tecido neoplásico ultrapassa os 2 mm, para que o suprimento de nutrientes seja garantido e a proliferação das células continue, podendo até mesmo levar à formação de metástases. Dados na literatura indicam que o grau de vascularização de neoplasias resulta de um equilíbrio entre fatores angiogênicos - principalmente do Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF) e o Fator Básico de Crescimento de Fibroblastos (bFGF) - e fatores anti-angiogênicos, tais como angiostatina, trombospondina-1, vasculostatina e endostatina (KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2005).

Um dos modelos de desenvolvimento de tumor em animais mais utilizados, podendo ser aplicado no estudo das nanopartículas, é o do carcinoma murino de Ehrlich, capaz de crescer em suspensão no líquido ascítico ou em tecido celular subcutâneo, sendo o líquido ascítico obtido pelo crescimento tumoral em suspensão utilizado mais comumente para a manutenção das células, enquanto o tumor sólido é mais utilizado para experimentos (DAGLI; GUERRA; SALDIVA, 1992; SAAD-HOSSNE; SAAD-HOSSNE; PRADO, 2004). O tumor ascítico é transplantável para qualquer linhagem de camundongos, provavelmente pela perda do complexo de histocompatibilidade (MHC) (BERGAMI-SANTOS; MARIANO; BARBUTO, 2004).

2.2. MELANOMA

Melanomas malignos estão entre as maiores causas de morte por câncer, e sua incidência vem aumentando drasticamente nas últimas décadas. Segundo a Organização Mundial da Saúde, cerca de 132.000 novos casos de melanoma são diagnosticados a cada ano. No Brasil, embora o câncer de pele seja o mais prevalente, os melanomas representam apenas 4% dos casos, porém respondem pela maior parte dos óbitos em decorrência da doença. Estima-se que no Brasil sejam diagnosticados 5.670 novos casos de melanoma em 2016, sendo 3.000 homens e 2.670 mulheres (INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER, 2016).

Os melanomas mimetizam alguns aspectos de uma grande variedade de tumores, tais como linfomas, carcinomas indiferenciados, tumores neuroendócrinos, sarcomas e tumores de células germinativas. As células de melanoma variam morfológicamente de epitelióides a células fusiformes, podendo apresentar citoplasma claro, em forma de anel de sinete, rabdóides, abalonadas ou com aparência plasmocitóide. Quanto à organização histológica, as células de melanoma assumem diversos padrões estruturais, incluindo ninhos, nódulos, rosetas, formações glandulares e papilares (OHSIE et al., 2008).

Apesar de todo o progresso no entendimento da genética e da bioquímica de melanomas malignos, os pacientes com melanoma metastático ainda possuem poucas opções de tratamento e, geralmente, o prognóstico é ruim. O estabelecimento de metástases em órgãos distantes do corpo é um processo que consiste em várias etapas, iniciado pela invasão da derme ao redor do tumor primário e terminando com a colonização de sítios ectópicos. Cada uma das etapas da cascata metastática é limitante para o processo, daí a necessidade de pesquisas acerca da identificação de novos mecanismos e fatores reguladores da progressão dos melanomas, de forma a desenvolver novas modalidades terapêuticas para este tipo de câncer (TRIMMER et al., 2010).

O diagnóstico de melanomas se dá, em geral, pela observação clínica e pela detecção de marcadores. A proteína ligadora de cálcio S100, com 21 kDa, foi inicialmente descoberta em células da glia, e seu nome se dá em virtude de sua solubilidade de 100% em solução de sulfato de amônio. Esta proteína é marcadora para melanoma, tumores de bainha nervosa, tumores de células granulares e mioepiteliomas. Nos melanomas, está presente no núcleo e no citoplasma, e apresenta uma sensibilidade de 97 a 100%, porém a especificidade é limitada (ao redor de 75 a 87%) devido à sua expressão constitutiva em diferentes tipos celulares. Desta forma, outros marcadores devem ser investigados em paralelo à proteína S100,

incluindo marcadores específicos para lesões não-melanóticas, para aumentar a confiabilidade do diagnóstico (OHSIE et al., 2008).

Figura 2: Micrografia de luz mostrando um tumor primário superficial de melanoma.

Fonte: <http://www.histopathology-india.net> (acessado em 04/12/2015).

Outros exemplos de marcadores incluem o HMB45 (um marcador da glicoproteína pré-melanossômica gp100), um dos primeiros marcadores para melanomas, o qual apresenta sensibilidade limitada mas uma grande especificidade quando comparado à proteína S100. Em lesões melanocíticas, este marcador é expresso no citoplasma, sendo sua expressão maior em tumores primários do que em lesões metastáticas. Outro exemplo é o antígeno de melanoma reconhecido por células T 1 (MART-1), uma proteína de diferenciação melanossomal e cujos anticorpos disponíveis garantem uma sensibilidade e uma especificidade comparáveis às do marcador HMB45 (OHSIE et al., 2008).

Vários estudos utilizam linhagens melanocíticas para pesquisa em diagnóstico e tratamento de tumores superficiais, tanto em modelos *in vitro* quanto *in vivo*, mas poucos dados estão disponíveis para terapia fotodinâmica e terapia hipertérmica (LI et al., 1996; OHSIE et al., 2008; TRIMMER et al., 2010). Os resultados variam em taxas de sucesso, porém os dados disponíveis tendem a ser promissores.

2.3. TUMOR DE EHRLICH

O tumor de Ehrlich foi descoberto por Paul Ehrlich no ano de 1886, porém somente após 20 anos é que foi descrito como um carcinoma mamário de camundongos fêmeas. Em 1932 foi constatada, pela primeira vez, a possibilidade de se utilizar essa linhagem em sua forma ascítica (líquida). É um adenocarcinoma murino espontâneo de origem mamária e que foi adaptado para crescimento em cavidade peritoneal (forma ascítica) ou como tumor sólido quando induzido na região subcutânea ou intradérmica (figura 3). Esta linhagem tem por característica a falta de antígeno de histocompatibilidade do tipo H2, o que confere sua alta velocidade de crescimento. É de fácil manutenção em laboratório, bastando somente o cultivo ascítico e posterior passagem para outro animal por via intraperitoneal, mas o congelamento em solução de glicerol é de uso comum também (JAGANATHAN ET AL., 2010). Além da simplicidade de manutenção em laboratório, a facilidade na padronização do número de células a serem inoculadas e no monitoramento do crescimento do volume tumoral são mais vantagens que contribuem para a ampla utilização desta linhagem na rotina de pesquisa (SAAD-HOSSNE ET AL., 2004; MACHADO, 2006).

Figura 3: Animais portadores de Tumor de Ehrlich. (A): um animal portando tumor ascítico e outro saudável. (B): vários animais portadores da forma sólida do tumor.

Fonte: Imagens obtidas pelo autor.

Como características morfológicas observadas ao microscópio, o tumor de Ehrlich apresenta intensa atipia celular, com grande número de células anaplásicas e vários focos necróticos. Seu estroma é escasso e a presença de células inflamatória é pequena. Observa-se um intenso pleomorfismo celular. e o número de núcleos é variável de célula a célula, mas em geral apresenta-se gigante e hipercromático (MACHADO, 2006).

A cinética de crescimento das formas sólida e ascítica do tumor de Ehrlich diferem entre si em alguns pontos. Por exemplo, o decréscimo da taxa de crescimento evidente durante os estágios avançados do tumor em sua forma ascítica ocorrem devido a uma maior duração do ciclo celular, principalmente da fase S. No caso do tumor sólido, o menor crescimento nos estágios avançados do tumor se deve a uma maior taxa de morte celular e a uma menor quantidade de fatores de crescimento (TANNOCK, 1969).

2.4. TRATAMENTOS

Quando se fala em terapias antitumorais, os tratamentos clássicos e mais utilizados incluem a remoção cirúrgica, a quimioterapia, a radioterapia e, em menor grau, a imunoterapia e a hormonioterapia. Entretanto, devido aos altos níveis de recidivas, bem como ao desgaste orgânico desencadeado por esses tratamentos, busca-se cada vez mais o desenvolvimento de intervenções terapêuticas mais eficazes e menos invasivas (ROZANOVA; ZHANG, 2009).

A remoção cirúrgica ainda é considerada o padrão ouro quando se trata de intervenção anti-tumoral, a despeito de todas as pesquisas realizadas com o intuito de desenvolver alternativas terapêuticas para o câncer. Houve significativo progresso na área cirúrgica visando a diminuição dos traumas e efeitos deletérios sofridos pelos pacientes após a cirurgia de retirada de tumores. Desde as cirurgias laparoscópicas ou endoscópicas até microcirurgias e cirurgias com auxílio de robôs, grandes avanços foram alcançados, inclusive nas tecnologias de obtenção e processamento de imagens. No entanto, essa modalidade terapêutica é extremamente invasiva, pois os cirurgiões devem retirar toda a massa tumoral e qualquer estrutura ao redor dentro de uma margem de segurança, incluindo vasos sanguíneos e linfáticos e qualquer tecido onde o tumor possa se multiplicar (FALCONER et al., 2015). Os prejuízos físicos, estéticos e psicológicos são intensos, o que incita ainda mais a pesquisa de

novas terapias menos invasivas.

Dentre as intervenções terapêuticas mais comuns podemos encontrar a quimioterapia, aplicada como terapia única ou como tratamento adjuvante após a remoção cirúrgica de tumores (visando evitar o aparecimento de metástases). É aplicada para os mais variados tipos de câncer, baseando-se na administração de fármacos que, em sua maioria, direcionam as células com alto índice proliferativo à apoptose.

Há várias classes de quimioterápicos, tais como os antimetabólicos, os agentes alquilantes, os inibidores da topoisomerase, e os agentes antimitóticos. Os compostos antimetabólicos são moléculas estruturalmente semelhantes a vitaminas, purinas ou pirimidinas, nucleosídeos e aminoácidos, podendo substituir os metabólitos que fazem parte de biomoléculas importantes, tais como ácidos nucleicos, ou podem competir por sítios catalíticos ou regulatório de enzimas. Já os agentes alquilantes intercalam-se no DNA formando ligações covalentes com os sítios nucleofílicos do mesmo, através de seu grupamento alquila, enquanto que as drogas baseadas em platina formam tais ligações pelo átomo metálico, impedindo a replicação do material genético. Os inibidores da enzima topoisomerase, por sua vez, agem nesta enzima importante para a replicação e transcrição do material genético, sendo considerados uns dos mais eficazes quimioterápicos. Por fim, os agentes antimitóticos agem por meio da inibição da polimerização dos dímeros de tubulina, ou fazem com que eles tenham uma polimerização descontrolada, o que impede a formação do fuso mitótico e, conseqüentemente, a proliferação celular (INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER, 2008).

Por agirem em células que apresentam altas taxas metabólica e replicativa, de maneira inespecífica, os quimioterápicos acabam por desencadear efeitos deletérios nos pacientes. Apesar de eficazes em grande parte dos casos, acabam por agir nos tecidos epiteliais e hematopoiéticos, comprometendo a saúde daqueles que se submetem ao tratamento quimioterápico.

Paralelamente à quimioterapia, outro tratamento de uso comum na terapia antitumoral é a radioterapia, usada com o objetivo de destruir tecidos neoplásicos com alta intensidade de radiação, porém preservando as células saudáveis o máximo possível. Sua ação baseia-se, principalmente, na geração de espécies reativas de oxigênio provenientes da quebra de moléculas de água, tais como radical hidroxil, superóxido e peróxido de hidrogênio. Ao reagirem com biomoléculas de maneira inespecífica, formam ligações irreversíveis entre elas e comprometem as funções celulares. Um exemplo é a formação de dímeros de pirimidina no DNA, que acabam levando a célula à morte pela impossibilidade de replicar o material

genético. Tais danos podem ser, também, induzidos pela ação direta da radiação nas biomoléculas. Assim, a radiação pode, por si só, causar quebras em uma ou nas duas fitas do DNA, ou formar dímeros de pirimidinas, ou ainda formar ligações cruzadas entre ácidos nucleicos e proteínas associadas. Apesar de a maioria desses danos serem reparados pelos mecanismos de reparo celular, se eles ocorrerem em grande quantidade e em um segmento curto do material genético, os mecanismos de morte celular são ativados. A ação radioterápica, tal qual a quimioterápica, é inespecífica, afetando as células por onde a radiação passa, podendo induzir efeitos colaterais.

Os avanços na área da imunologia relacionada ao câncer permitiram o surgimento de terapias imunológicas utilizando citocinas e anticorpos como forma de ablação tumoral. As citocinas agem, geralmente, pelo recrutamento e pela ativação de linfócitos T CD4⁺ e/ou CD8⁺, os quais reconhecem especificamente os antígenos tumorais. Então, os linfócitos recrutados podem interagir diretamente com as células neoplásicas e levá-las à morte, ou podem recrutar outras células efectoras do sistema imune, tais como monócitos e macrófagos. Exemplos de citocinas utilizadas atualmente para tratamento antitumoral são a Interleucina-2 (IL-2), o interferon-alfa (IFN- α) e o fator de necrose tumoral (TNF).

A ação dos anticorpos, por sua vez, é baseada na ativação do sistema complemento e na citotoxicidade mediada por células (monócitos, macrófagos e células *Natural Killer* (NK)). No entanto, outras ações dos anticorpos na terapia antitumoral foram descobertas, tais como o bloqueio dos receptores de fatores de crescimento, o bloqueio e sequestro desses fatores de crescimento, o desencadeamento de uma cascata de sinais pro-apoptóticos quando se ligam a uma molécula específica na superfície celular, a ruptura dos vasos sanguíneos tumorais ou a prevenção da angiogênese. Diversos anticorpos já estão disponíveis comercialmente para o tratamento antineoplásico, e apresentam resultados positivos (SCHUMACHER; SCHREIBER, 2015).

A despeito das conquistas decorrentes da pesquisa no campo das terapias antitumorais, ainda se buscam novas terapias que sejam menos desgastantes sem perder sua eficiência, além de serem mais acessíveis. As terapias baseadas na interação entre luz e os tecidos ganham cada vez mais espaço nesta área, justamente por apresentarem menores efeitos colaterais e por terem eficácia significativa, além de serem relativamente acessíveis. A terapia hipertérmica e a terapia fotodinâmica são bons exemplos de tratamentos sob investigação e que apresentam resultados promissores. A primeira consiste na ablação de tumores por aquecimento, com ou sem o auxílio de dispositivos tais como as nanopartículas metálicas. A segunda é baseada na geração de espécies reativas por parte de compostos fotossensibilizadores ativados por luz em

determinado comprimento de onda, e na ação oxidativas de tais espécies reativas sobre as biomoléculas das células tumorais de maneira localizada (HILDEBRANDT et al., 2004; NOWAK-STEPNIEWSKA et al., 2011).

Em relação às terapias fotônicas antitumorais, os comprimentos de onda mais utilizados encontram-se entre 600 e 800 nm. Isso se deve ao fato de que a diversidade de biomoléculas presentes no organismo, tais como ácidos nucleicos, proteínas, carboidratos, hemoglobina e a própria água, leva a uma absorção intensa de luz, principalmente em comprimentos de onda de maior energia. As proteínas apresentam alta absorção na região ultravioleta, violeta e azul do espectro da luz, enquanto que a hemoglobina absorve intensamente no verde e no amarelo. A água, por sua vez, apresenta intensa absorção no infravermelho acima de 800 nm. Comprimentos de onda entre 600 e 800 nm, no entanto, não são absorvidos pelas biomoléculas de maneira tão intensa, favorecendo a utilização de luz dentro dessa "janela terapêutica", como fora denominada esta região do espectro de luz, para terapias antitumorais, antimicrobianas, estéticas e para diagnóstico de várias patologias (SALOMAO et al., 2015).

2.5. NANOTECNOLOGIA NO TRATAMENTO E DIAGNÓSTICO DE CÂNCER

O uso de nanotecnologia no tratamento e no diagnóstico de tumores pode ser denominado de nanooncologia. A nanooncologia é o ramo da ciência que consiste no desenvolvimento de dispositivos direcionados à liberação controlada de fármacos em escala nanométrica, no desenvolvimento de nanopartículas que absorvem luz visando seu aquecimento (terapia hipertérmica) ou para diagnóstico específico, dentre várias outras aplicações terapêuticas (JAIN, 2008).

Sabe-se que quanto mais precoce é o diagnóstico de câncer, melhor o prognóstico. Neste sentido, o diagnóstico por imagem fornece uma valiosa contribuição, principalmente com a utilização de compostos fluorescentes e nanodispositivos. Um exemplo é a utilização de nanopartículas (de um a dez nanômetros) fluorescentes denominadas *Quantum Dots*, as quais são excitadas em comprimento de onda específico, emitindo, então, luz em diferentes cores. Atualmente existem *quantum dots* acoplados a anticorpos específicos para diversos antígenos tumorais e que emitem um sinal de grande intensidade se comparados aos corantes

clássicos. Além disso, apresentam grande fotoestabilidade e uma alta razão sinal-ruído (ONOSHIMA; YUKAWA; BABA, 2015). A figura 4 ilustra a utilização dos *quantum dots* no diagnóstico de tumores.

Ainda com relação ao diagnóstico, podemos citar a utilização de nanopartículas com capacidade de se anelarem à sequência nucleotídica TTAGGG sintetizada especificamente pelas telomerasas. Quando assim o fazem, as nanopartículas passam a ter atividade magnética, permitindo o monitoramento da atividade de telomerase nos tecidos, a qual consiste em um dos mais eficientes indicadores de replicação celular sem controle (FERRARI, 2005).

Figura 4: Quantum Dots emitindo em três diferentes comprimentos de onda em tumores murinos.

Fonte: (Henry, 2004).

A farmacocinética de várias drogas pode ser melhorada com o auxílio da nanotecnologia, mediante o desenvolvimento de partículas em escala nanométrica (nanoesferas poliméricas e nanopartículas metálicas, principalmente) acopladas às drogas em questão. Isso aumenta a área de superfície dos dispositivos, aumentando, em consequência, a biodisponibilidade dos fármacos, principalmente se são compostos apolares. Paralelamente, as

nanopartículas podem proporcionar uma liberação controlada de fármacos por um longo tempo e podem ser combinadas a ligantes específicos para o tecido de interesse, garantindo a ação específica e localizada das drogas antitumorais (HWANG et al., 2015; WANG et al., 2015b).

Os lipossomas, apesar de muitas vezes não serem considerados nanomateriais devido ao tamanho que assumem ultrapassar muitas vezes os 200 nm de diâmetro, são muito utilizados para a liberação controlada e localizada de fármacos. Eles foram testados quanto à liberação controlada de fármacos e à inserção de genes ligados ao controle da angiogênese, do ciclo celular e da apoptose, sendo esta inserção realizada em células tumorais, e os resultados foram promissores. Com o objetivo de aumentar a eficácia da inserção gênica em células tumorais, os lipossomas podem ser complexados a moléculas de oligosina histidinadas sensíveis ao pH, as quais os ajudam a escapar dos endossomos e evitando, assim, a degradação do DNA inserido e a transfecção (KAWASAKI; PLAYER, 2005). A figura 5 ilustra a ação de um lipossoma para transfecção de uma sequência nucleotídica em uma célula hospedeira, porém o mesmo mecanismo ocorre para a liberação de drogas e outras substâncias.

Figura 5. Mecanismo de ação dos lipossomas.

Fonte: Somani, 2008 (adaptado).

A utilização de biomateriais e nanodispositivos tem demonstrado eficácia na interação com ondas eletromagnéticas para desempenho de funções terapêuticas. As nanopartículas metálicas, as quais podem constituir materiais não-magnéticos, paramagnéticos e superparamagnéticos, são conhecidas há mais de três décadas e têm sido utilizadas com sucesso em campos de atuação cada vez mais variados. Nanopartículas metálicas de ouro, prata e platina, por exemplo, são capazes de emitirem calor mediante excitação por luz e consequente ressonância plasmônica de superfície, sendo o ouro o mais utilizado para a síntese de nanoestruturas, devido à sua estabilidade no organismo e ao custo relativamente baixo, quando comparado à platina (AMENDOLA, 2016).

Um dos últimos avanços na nanooncologia é a utilização de materiais plasmônicos, tanto para o diagnóstico óptico ultra-sensível quanto para técnicas espectroscópicas e para o tratamento de neoplasias (VON MALTZAHN et al., 2009). Materiais plasmônicos são aqueles que possuem elétrons livres em sua superfície, em geral materiais condutores como os metais, chamados de plasmons de superfície. Mediante excitação, geralmente por radiação em comprimento de onda determinado, a os elétrons da nuvem eletrônica na superfície dos materiais plasmônicos sofrem oscilações de forma coletiva, movimentando-se na direção inversa à componente elétrica do campo eletromagnético da radiação. Esse fenômeno é chamado de ressonância plasmônica de superfície, e está ilustrado na figura 6. Ao retornarem a um estado de menor energia, os plasmons de superfície liberam fótons, fenômeno importante no diagnóstico óptico por técnicas espectroscópicas ou térmicas. Além disso, esses fótons podem ser transferidos à malha atômica na qual os elétrons estão imersos, e esta passa a oscilar. Conforme a malha atômica retorna a um estado energético basal, transfere energia para o meio em que estão na forma de calor, e este fenômeno é responsável pelo efeito hipertérmico dos materiais plasmônicos e que pode ser utilizado na terapia antitumoral hipertérmica (HU et al., 2006; SINGH et al., 2015) (HU et al., 2006).

O efeito máximo da hipertermia nos tecidos é a morte celular. Estudos *in vitro* e em animais mostram que a exposição das células a temperaturas entre 42°C e 47°C é suficiente para induzir morte celular, e a taxa de ablação tumoral é maior quanto mais tempo é utilizado no tratamento hipertérmico. Os estudos *in vitro* mostram, também, que dez exposições curtas, de apenas 60 μ s, a um laser que emite na região do infravermelho próximo e com uma potência de 7 mW já são suficientes para induzir alterações na conformação das membranas celulares, e isso é acompanhado por um aumento no estresse oxidativo celular, indicando uma relação com este fenômeno e a geração de espécies reativas (HUFF et al., 2007). Esse comprometimento da integridade das membranas celulares, principalmente da membrana

plasmática, ocorre localmente, com mínimo prejuízo às membranas de células não tratadas (LAPOTKO et al., 2006). Além disso, em alguns tipos de tumor, a hipertermia induz uma diminuição no fluxo sanguíneo do tecido tratado, o que desencadeia um quadro de acidose e hipóxia (baixa pressão de oxigênio) local (HILDEBRANDT et al., 2004; RATTTO et al., 2015).

Figura 6: Oscilação da nuvem eletrônica de uma partícula metálica esférica.

Fonte: Hao; Schatz, 2004 (adaptado).

Como mencionado anteriormente, a hipertermia também gera modificações na morfologia (principalmente bolhas) e, consequentemente, na permeabilidade e estabilidade das membranas celulares, porém ainda não se sabe muito sobre a relação das modificações na conformação de membrana com as taxas de morte obtidas no tratamento hipertérmico. Por alterar a fluidez e a estabilidade das membranas, a hipertermia altera a ação de receptores de superfície e de proteínas estruturais. Ademais, o aumento de temperatura local pode levar a agregação de proteínas nucleares desnaturadas na matriz nuclear, efeito que pode prejudicar a síntese e o reparo de DNA e de RNA e levar as células afetadas à morte celular por necrose ou apoptose (HILDEBRANDT, 2002).

Estudos indicam que há um aumento na expressão da proteína p53 nas células tratadas hipertermicamente. Esta proteína é um dos ativadores clássicos da cascata apoptótica e é

sintetizada em grande quantidade somente após estímulos pro-apoptóticos chegarem às células. As pequenas bolhas formadas nas membranas celulares em decorrência da hipertermia também podem direcionar as células à apoptose, porém o mecanismo pelo qual isso se dá ainda não está completamente elucidado (LAPOTKO et al., 2006). Outro efeito decorrente da hipertermia é a fusão incorreta de fragmentos de DNA quando células que estão em fase S do ciclo celular são tratadas, o que induz apoptose (BULLIVANT, 2008).

As nanopartículas para tratamento hipertérmico podem assumir diversas formas, e a frequência e a localização das bandas de ressonância plasmônica no espectro de absorção das mesmas dependem de seu tamanho, de sua forma, de sua constante dielétrica e do meio no qual estão inseridas (AFSHAR, 2007). O acúmulo de nanopartículas no tecido neoplásico se deve à maior retenção de metabólitos pelo tumor em virtude da alta demanda metabólica por parte dos tumores, além da presença de grande quantidade de capilares fenestrados, os quais são muito mais permeáveis do que os capilares que não apresentam fenestrações. Esta retenção, no entanto, pode ser aumentada conforme se utilizam anticorpos específicos para determinado tipo de tumor acoplados à superfície das nanopartículas (LOO et al., 2005).

O material mais utilizado na síntese de nanopartículas nas últimas décadas é o ouro, e as nanopartículas podem ser maciças ou ter um núcleo polimérico recoberto por esse metal, podendo ou não ter um recapeamento polimérico, como por polietilenoglicol (PEG). O ouro é amplamente utilizado em virtude de suas propriedades intrínsecas que incluem flexibilidade conformacional, baixa toxicidade e ressonância plasmônica de superfície quando iluminado com luz na região do visível e do infravermelho próximo. Dessa forma, nanopartículas de ouro são ótimas para aplicações envolvendo hipertermia a partir de irradiação eletromagnética (ZHAO et al., 2015).

Uma das formas mais comuns de nanopartículas é a chamada *nanoshell*, que consiste em um núcleo de sílica recoberto por uma camada mais ou menos espessa de um metal, em geral ouro. A espessura da camada metálica determina o comprimento de onda que desencadeará a ressonância plasmônica de superfície, podendo ir desde o ultravioleta até o infravermelho próximo, onde a penetração nos tecidos é maior, como citado anteriormente (O'NEAL et al., 2004). Além das propriedades de absorção da radiação, pode-se controlar as propriedades de espalhamento da luz mediante o controle da espessura da camada metálica, o que é importante no diagnóstico óptico de diversos tipos de câncer (JAIN, 2008).

O'Neal e colaboradores utilizaram, *nanoshells* recobertas com ouro em camundongos portadores de carcinoma induzido no flanco, e observaram que houve redução total do volume tumoral após o tratamento hipertérmico, e não foi observada reincidência após o período de

acompanhamento dos animais (O'NEAL et al., 2004). Quando aplicadas em humanos, as *nanoshells* apresentaram 99% de eficácia na morte de células tumorais de leucemia, sendo que 87% das células de medula normais ao redor da lesão foram preservadas (LAPOTKO et al., 2006).

Outra conformação de nanopartículas que vem ganhando espaço na pesquisa em tratamento hipertérmico é a de nanobastões. Nanobastões de ouro são facilmente sintetizados por diversas metodologias, sendo a mais simples referente à síntese de nanopartículas a partir de partículas de ouro esféricas pré-formadas (método de *seeding*). Elas chamam a atenção por apresentarem maior superfície disponível para interação com a radiação por unidade de volume, em comparação com outras conformações de nanopartículas, inclusive as *nanoshells*. Se o método de *seeding* é utilizado, as nanopartículas sintetizadas são recobertas por um detergente catiônico denominado brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) (HUFF et al., 2007).

2.6. HIPERTERMIA

Terapia Hipertérmica é o conjunto de técnicas baseadas no aumento de temperatura, seja local ou generalizado, disponíveis atualmente para serem utilizadas como terapias adjuvantes às intervenções terapêuticas tradicionais. Bons resultados têm sido obtidos no tratamento de tumores, além de outras finalidades terapêuticas (ROZANOVA; ZHANG, 2009).

Como dito anteriormente, o nível de morte celular obtido pela terapia hipertérmica é dependente do tempo de exposição ao tratamento e da temperatura atingida. Estudos indicam que uma hora de exposição a temperaturas variando entre 42 e 47 graus Celsius é suficiente para tornar uma grande quantidade de células em cultura inviáveis, de acordo com a linhagem celular utilizada. Observou-se, também, que a dose de radiação necessária para induzir tais níveis de morte celular devido ao tratamento hipertérmico é proporcional àquela necessária para que ocorra desnaturação protéica, o que indica que esse fenômeno está intrinsecamente relacionado ao mecanismo de ação da hipertermia em células tumorais. Por fim, quanto mais alta a temperatura obtida, maiores as chances de que a célula seja direcionada a necrose ao invés de a apoptose (HILDEBRANDT, 2002).

Além do tempo de exposição e da temperatura atingida, os níveis de morte celular dependem ainda da fase do ciclo celular em que as células tumorais se encontram. Em geral, a fase mitótica é a mais sensível ao aumento de temperatura, uma vez que a hipertermia induz uma degradação do aparato mitótico e dificulta a formação do fuso, levando a poliploidias e a mitoses ineficientes. Células em fase S (fase de síntese de nutrientes e de material genético) são igualmente suscetíveis à ação hipertérmica, pois altas temperaturas desnaturam biomoléculas importantes e danificam o DNA que está sendo sintetizado. Enquanto células em fase mitótica e em fase S sofrem um processo de morte celular lento em decorrência do tratamento hipertérmico, as células em fase G1 podem, em alguns casos, sofrer um processo rápido de morte celular, a despeito de terem por característica uma maior resistência ao aumento de temperatura e de não haver danos celulares aparentes nestas células após o tratamento hipertérmico (HILDEBRANDT, 2002).

O efeito citotóxico da hipertermia pode ser desencadeado de maneira direta ou indireta. Esta última se refere às alterações no fluxo sanguíneo no sítio tumoral, ou seja a hipertermia é capaz de diminuir o suprimento sanguíneo para as células tumorais, desencadeando quadros de hipóxia e acidose que acabam por levar as células neoplásicas à morte. Essa diminuição no suprimento sanguíneo ocorre devido a um inchaço do endotélio, a um extravasamento de plasma para o interstício, a uma hemostasia que culmina com microtrombose, e a mudanças na viscosidade das membranas das células sanguíneas. Este efeito pode ser mais intenso se um quadro de hiperemia é estimulado nos tecidos saudáveis ao redor da neoplasia, ou mesmo quando uma acidose é desencadeada no interior do tecido tumoral por meio da administração de glicose em altas concentrações (HILDEBRANDT, 2002).

A hipertermia age ainda na síntese de RNA e DNA, processo que acaba sendo prejudicado quando as células são expostas a temperaturas acima de 42°C, sendo que a partir de 45°C a polimerização de DNA e RNA permanece inibida por muito mais tempo. A razão para tal fenômeno se dá pelo aumento da quantidade de proteínas desnaturadas no núcleo após o estímulo hipertérmico, o que dificulta tanto a síntese quanto os mecanismos de reparo do material genético, uma vez que as proteínas desnaturadas tendem a ficar agregadas. Mediante a ação de chaperonas chamadas de proteínas de choque térmico (*Heat Shock Proteins* - HSP), essa agregação protéica pode ser prevenida. As HSPs se ligam aos sítios hidrofóbicos das proteínas e previnem uma possível interação irreversível entre elas, inibindo sua perda de função. A síntese dessas chaperonas pode ser estimulada rapidamente mediante o estímulo

hipertérmico, representando um dos principais fatores envolvidos na proteção celular frente a aumentos de temperatura (HILDEBRANDT, 2002).

Sabe-se que a expressão aumentada de HSPs favorece um aumento na resistência celular à hipertermia. No entanto, mesmo que as células adquiram maior resistência ao calor, elas acabam ficando mais suscetíveis à ação do sistema imune do paciente. Isso se dá devido ao fato de as proteínas de choque térmico se complexarem com peptídeos específicos do tumor, complexo este o qual é frequentemente apresentado a células do sistema imunológico. Mesmo sem estarem complexadas, algumas HSPs podem ser levadas à superfície celular e, por si só, estimular o sistema imunológico (HILDEBRANDT, 2002).

Pode haver sinergismo entre os tratamentos antitumorais clássicos, como quimioterapia e radioterapia, e a hipertermia. A ação sinérgica entre radiação e hipertermia depende de vários fatores, tais como a temperatura atingida, o intervalo de tempo entre o tratamento hipertérmico e a radioterapia, e de qual dos dois tratamentos foi realizado em primeiro lugar. Já o sinergismo entre hipertermia e quimioterapia pode ocorrer de maneira diversa, dependendo da classe de quimioterápico utilizada: os agentes alquilantes (como ciclofosfamida) aumentam sua atividade de maneira linear mediante o aumento da temperatura corporal acima de 40,5°C; outros quimioterápicos clássicos, como a doxorrubicina, apresentam um limite para esse aumento de eficácia decorrente do aumento de temperatura; por fim, a maioria dos agentes antimetabólicos (como 5-fluorouracil e diversos taxóis) são sabidamente independentes da hipertermia (MANG, 1990; YANASE et al., 2009).

2.7. TERAPIA HIPERTÉRMICA COM NANOBASTÕES

As técnicas de síntese de nanopartículas evoluíram nas últimas quatro décadas e, em virtude dos mais recentes avanços no rendimento da síntese, no controle do tamanho das nanopartículas e na eficiência das possíveis bioconjugações, o interesse na utilização desses dispositivos nanométricos vem crescendo, principalmente utilizando ouro (AFSHAR, 2007).

Uma das conformações mais promissoras para a utilização em terapia hipertérmica, as nanobarras metálicas, ou nanobastões metálicos, são estruturas que crescem de maneira unidimensional e que apresentam propriedades ópticas dependentes de seu tamanho. Apresentam a propriedade de aumentar o espalhamento Raman e os sinais de fluorescência de

possíveis anexos, mas suas propriedades térmicas decorrentes de ressonância plasmônica de superfície são as que mais chamam a atenção dos pesquisadores (WANG et al., 2015a; WEI; MIESZAWSKA; ZAMBORINI, 2004). Esse crescente interesse por tal conformação de nanopartículas pode ser explicado pelo fato de que os nanobastões são facilmente sintetizados em laboratório e por apresentarem pequenas variações de tamanho, além de que possuem maior coeficiente de absorção comparadas a *nanoshells*, e podendo chegar a ser mais de 100 vezes maior do que o coeficiente de absorção de fluoróforos tradicionais (VON MALTZAHN et al., 2009).

Enquanto que as propriedades ópticas de nanopartículas esféricas, como nanoesferas simples e *nanoshells*, são moduladas de acordo com a espessura da camada metálica ou mesmo do diâmetro da partícula em si e do núcleo dielétrico, as propriedades ópticas dos nanobastões, incluindo as bandas de ressonância plasmônica de superfície, são determinadas por sua razão de proporção, ou seja, a razão entre seu comprimento e seu diâmetro (WEI; MIESZAWSKA; ZAMBORINI, 2004). Enquanto que as nanopartículas esféricas apresentam apenas uma banda de absorção na região do visível ou infravermelho próximo correspondente à ressonância plasmônica de superfície, os nanobastões metálicos apresentam duas bandas, uma correspondente à absorção por plasmons de superfície no sentido do diâmetro (a banda de comprimento de onda mais curto) e a outra correspondente à absorção por plasmons de superfície no sentido do comprimento (banda com comprimento de onda maior) (SAU; MURPHY, 2004). Quanto maior a razão de proporção das nanopartículas, maior será o deslocamento da banda de maior comprimento de onda em direção ao infravermelho próximo, como mostra a figura 7 (OLSON et al., 2015; PARK et al., 2007).

Diversas metodologias são empregadas na síntese de nanobastões, permitindo um controle mais ou menos preciso do rendimento de síntese e da razão de proporção das nanopartículas. As mais comumente utilizadas são a síntese eletroquímica, a deposição eletroquímica, a síntese fotoquímica e a síntese mediada por sementes (*seeds*).

A síntese eletroquímica é baseada em uma reação simples de óxido-redução eletroquímica em um sistema que contém dois eletrodos imersos em uma solução eletrolítica. Esta solução nada mais é do que um surfactante catiônico, tal como o brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB), que é responsável por controlar o crescimento unidirecional dos nanobastões. Apesar de seu papel no crescimento dos nanobastões não estar completamente elucidado, é necessário que se utilize acetona na solução eletrolítica. Estudos indicam, porém, que a acetona facilita a entrada de um co-surfactante no sistema micelar formado pelo CTAB

(YU et al., 1997). Dentre as metodologias mais utilizadas, esta é a mais complexa, em virtude dos materiais utilizados e dos processos de síntese aplicados.

Figura 7: Coloração e bandas de ressonância de nanobastões com razões de proporção variando de 2,12 até 5,56.

Fonte: (ROZANOVA; ZHANG, 2009) (adaptado).

A deposição eletroquímica utiliza membranas porosas de policarbonato, e é baseada na deposição do material metálico no interior de poros cilíndricos monodispersos dessa membrana. Inicialmente, um catalisador é aderido a toda superfície da membrana, o qual garante a redução dos íons de Au e sua deposição nas paredes dos poros da membrana por um processo de galvanização. A seguir, a membrana tratada é mergulhada em uma solução contendo íons Au^+ ou Au^{++} . A princípio, como o ouro vai sendo depositado nas paredes dos poros, formam-se nanotubos de ouro, porém o diâmetro da luz desses tubos vai diminuindo conforme o processo de galvanização continua, até que sejam obtidos nanofios ou nanobastões de ouro com grande razão de proporção (WIRTZ; MARTIN, 2003). Esta metodologia não é recomendada para a obtenção de nanobastões com menor razão de proporção.

Já a síntese fotoquímica baseia-se na geração de espécies reativas (principalmente radicais livres) a partir de moléculas precursoras, após irradiação com um comprimento de onda específico. São essas espécies reativas que vão reduzir os íons de ouro ao seu estado metálico. Exemplos de compostos precursores de espécies reativas são as cetonas e as benzoínas, e a luz ultravioleta é a mais utilizada pois possui a energia necessária para a geração de radicais livres a partir de tais compostos. As dimensões e a forma dos nanobastões é controlada pela adição de um surfactante, como o CTAB, ao meio de síntese. O único inconveniente desta metodologia é a baixa velocidade com que ela ocorre. Apesar de garantir um ótimo controle de tamanho e forma das nanopartículas, o processo de síntese pode chegar a 50 horas de irradiação (KIM; SONG; YANG, 2002; SCAIANO et al., 2009).

Uma das metodologias mais simples é a mediada por *seeds*, sendo atraente pela facilidade da síntese e por permitir um bom controle do tamanho e da forma dos nanobastões conforme se alteram as condições do meio (tais como pH e presença de íons de prata). Essa metodologia é baseada na redução química de íons Au^+ (provenientes do sal cloreto áurico, AuCl_4) por um agente redutor fraco, como ácido ascórbico ou citrato, em presença de um surfactante catiônico tal como CTAB. A redução e deposição do ouro ocorre sobre a superfície de nanoesferas de ouro de pré-formadas chamadas de *seeds* (sementes), e a forma em bastão é garantida pela bicamada formada pelo CTAB em formato de tubo e adsorvida sobre a superfície dessas *seeds*. Estudos indicam que o CTAB forma uma estrutura em tubo no interior da qual o ouro vai sendo depositado de maneira unidimensional, e por fim esse detergente permanece recobrindo as nanopartículas (MURPHY et al., 2005). A figura 8 mostra a estrutura do detergente catiônico CTAB, e a figura 9 mostra o sentido de crescimento da nanobastão devido à bicamada de CTAB.

Figura 8: Fórmula estrutural condensada linear do brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB)

Fonte: Próprio autor.

A razão de proporção dos nanobastões obtidos pela síntese mediada por *seeds* depende da razão entre íons Au^+ disponíveis e a quantidade de *seeds* no meio. O rendimento desta metodologia é considerado baixo, em torno de 4 a 20%, e a polidispersão de tamanhos e formas é grande, porém a adição de íons prata garante um maior rendimento e controle das dimensões. A purificação por centrifugação também auxilia na seleção do tamanho das nanopartículas. O rendimento após a adição de íons prata e centrifugação pós-síntese pode chegar a 90% (WEI; MIESZAWSKA; ZAMBORINI, 2004).

Figura 9. CTAB formando uma bicamada em torno de uma nanobastão de ouro.

Fonte: (PARK et al., 2007) (adaptado).

A ação dos íons prata ainda não está completamente elucidada, porém alguns estudos indicam que a prata se complexa com o brometo, gerando brometo de prata que é capaz de se aderir, quando em excesso, à superfície longitudinal da partícula que está sendo formada, impedindo um posterior crescimento nessa área (MURPHY et al., 2005).

O surfactante comumente utilizado, CTAB, é conhecido por degradar membranas e degradar peptídeos, sendo, portanto, altamente citotóxico. Apesar de estar presente em grande quantidade no meio de síntese além do que foi aderido às nanopartículas, o CTAB livre no meio pode ser facilmente removido mediante sucessivas centrifugações e ressuspensão em água purificada. Após este processo, somente o CTAB aderido nas nanopartículas como uma bicamada permanece e, segundo os resultados de testes *in vitro*, este

CTAB aderido não exerce citotoxicidade significativa, ao contrário de quando se encontrava livre no meio (DE FREITAS et al., 2013). Altas concentrações de nanopartículas, no entanto, podem ser citotóxicas em algumas linhagens celulares (PISSUWAN; VALENZUELA; CORTIE, 2008).

Muitas vezes os pesquisadores optam por modificarem o recobrimento das nanopartículas por um polímero mais biocompatível e que previna a agregação das partículas, tais como polietilenoglicol (PEG) e quitosana, ao invés de trabalharem com as nanopartículas recobertas por CTAB. Após a modificação do recobrimento, há uma evidente diminuição na citotoxicidade das partículas no escuro e grande diminuição na agregação, ainda que isso represente um tempo maior na síntese, pois é uma etapa a mais ao processo (HUFF et al., 2007; KELLY et al., 2003; LI et al., 2015; SUGUNAN et al., 2005).

Além de representar um tempo maior de síntese, as partículas recobertas por outros polímeros, apesar de serem menos citotóxicas, não são endocitadas pelas células alvo. Enquanto as nanopartículas recobertas por CTAB são prontamente endocitadas por células em cultura, concentrando-se na área perinuclear em até cinco horas após a administração de partículas, as nanopartículas com modificações no recobrimento não são endocitadas e acumulam-se na membrana plasmática e no parênquima tumoral. A endocitose, nesse caso, só é evidente após várias horas da administração de nanopartículas. Consequentemente, o mecanismo de ação das nanopartículas é diferente conforme o recobrimento, uma vez que as recobertas por CTAB podem agir na desnaturação de biomoléculas do interior celular e podem causar dano diretamente ao DNA e às membranas celulares, ao passo que os nanobastões recobertos por outros polímeros danificam a membrana plasmática e estruturas do parênquima, como vasos sanguíneos e componentes da matriz extracelular (HUFF et al., 2007).

Nanobastões recobertos por CTAB, ao atingirem a corrente sanguínea após administração, podem permanecer em sua forma livre ou complexadas com a proteína albumina. Uma vez que o CTAB se encontra em sua forma ionizada catiônica no plasma, confere carga positiva à superfície dos nanobastões e, consequentemente, diminui a tendência destas a agregação, enquanto as nanopartículas recobertas por PEG tendem a sofrer agregação por não possuírem carga superficial (WANG et al., 2010).

Uma vez na corrente sanguínea, a absorção dos nanobastões ocorre de forma rápida, tendo uma meia vida de aproximadamente 15 minutos em ratos. Os principais órgãos responsáveis por sua internalização são o fígado, os pulmões e o baço, os quais mantêm as nanopartículas em seu interior por longo tempo. Os demais órgãos têm a concentração de

nanopartículas aumentada nos primeiros 30 minutos, mas depois essa concentração decresce aos níveis basais. Como o *clearance* renal para os nanobastões de ouro é irrisório, elas são eliminadas nas fezes ou tendem a acumular-se nos lisossomos de células fagocíticas, como células de Kupfer no fígado e macrófagos alveolares nos pulmões, além dos linfócitos. Mesmo no interior dos lisossomos, onde o pH é ácido, as nanopartículas não são degradadas oxidativamente, e mantêm-se estáveis e íntegras por vários dias (WANG et al., 2010).

2.8. TERAPIA FOTODINÂMICA

Terapia fotodinâmica (PDT) é outro exemplo de modalidade terapêutica baseada em luz, tendo por característica ser minimamente invasiva e sendo considerada uma alternativa promissora para tratamentos clássicos contra câncer como a remoção cirúrgica, radioterapia e quimioterapia (BAZYLIŃSKA et al., 2012). A PDT baseia-se na internalização de compostos sensíveis à luz, chamados de fotossensibilizadores, pelas células cancerosas alvo, sobre as quais vão exercer uma fototoxicidade seletiva após a iluminação local com luz visível ou na região do infra-vermelho próximo. A iluminação local e o acúmulo seletivo dos fotossensibilizadores no tumor garante a baixa invasividade e a alta seletividade desta terapia (SONG et al., 2014).

O processo fotodinâmico, que culmina com danos oxidativos às biomoléculas, depende de três elementos básicos:

- O composto fotossensibilizador, ou seja, uma molécula que vai sensibilizar o tecido afetado para que interaja com uma dose não-letal de luz (geralmente um corante). Estes compostos não podem causar fototoxicidade aos tecidos saudáveis ou qualquer citotoxicidade no escuro, além de ser necessário um acúmulo seletivo nos tecidos malignos por várias horas;
- Luz em comprimento de onda adequado, de acordo com o fotossensibilizador utilizado, e em dose adequada para excitar o fotossensibilizador acumulado no tumor;
- Oxigênio molecular em quantidade suficiente para gerar espécies reativas (NOWAK-STĘPNIOWSKA et al., 2011).

A combinação de um fotossensibilizador com a irradiação de luz visível em dose inócua é capaz de excitar esse composto a um estado tripleto, o qual propiciará a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) citotóxicas na presença de oxigênio molecular. Se uma reação fotodinâmica de tipo I acontece, radicais livres como radical hidroxil ($\text{HO}\cdot$) e superóxido ($\text{O}_2\cdot^-$) são gerados, enquanto que o oxigênio singleto ($^1\text{O}_2$) é gerado quando ocorre uma reação fotodinâmica do tipo II. A razão entre estes dois tipos de reação depende do fotossensibilizador utilizado e do microambiente no qual o composto está imerso (HUANG et al., 2012).

A PDT é mais indicada para tumores superficiais, localizados até a região da derme, mesmo que sejam primários ou metastáticos provenientes de outros locais. Isto porque o sucesso da terapia depende da penetração da luz nos tecidos, a qual fica extremamente comprometida após 1 cm de profundidade. Fotossensibilizadores como Photofrin e protoporfirina IX (PpIX) são ativados por luz em torno de 630 nm, ao passo que Foscan (da classe das porfirinas) é ativado por luz em torno de 660 nm e Lutex (uma texafirina) pode ser ativado com luz no infravermelho próximo (em torno de 730 nm) (ALLISON et al., 2006). A incorporação da PDT no rol de terapias consagradas para câncer ainda é limitada em virtude da dor e da ulceração que ocorrem muito frequentemente nos tecidos tratados, o que requer um cuidado mais acurado das feridas e, por vezes, intervenções subsequentes. No entanto, resultados promissores foram observados, tais como taxas de respostas clínicas de até 89% (MORRISON et al., 2014).

Como consequências da PDT em células de mamíferos, podemos citar algumas modificações na atividade de alguns genes. O estresse oxidativo decorrente da PDT pode aumentar a atividade de genes como *c-fos*, *c-jun*, *c-myc*, *egr-I*, de genes que codificam proteínas de choque térmico (HSP), genes para proteínas relacionadas à glicose e para a hemeoxigenase. Os quatro primeiros genes são denominados genes de resposta imediata, e funcionam como fatores de transcrição, agindo por meio da regulação da expressão de vários outros genes (COGNO et al., 2011).

Algumas vias de morte celular são ativadas pelo processo fotodinâmico, sejam elas dependentes ou não de caspases. No entanto, há casos nos quais a sobrevivência das células é aumentada em razão da PDT. Neste contexto, o aumento de expressão das proteínas de choque térmico (por exemplo, as HSP70, HSP47 e HSP60) está relacionado a um mau prognóstico em leucemia mielóide ou em síndromes mielodisplásicas. A PDT pode, também, induzir uma super-expressão e a fosforilação da survivina, membro da família dos inibidores

de proteína apoptótica (IAP), e este fato está geralmente associado à resistência dos tumores a drogas quimioterápicas, taxas de sobrevida baixas e prognóstico ruim (VITTAR et al., 2010).

Vittar et al. demonstraram que as caspases 8, 9 e 3 não participam da resposta apoptótica em resposta à PDT no câncer de mama. É possível que este processo envolva a permeabilização de membrana de lisossomos que culmina em morte celular pela indução de disfunção mitocondrial e subsequente liberação de proteínas apoptogênicas. Esta ação pode incluir a atividade de proteína pró-apoptótica Bid e de protease semelhante a calpaina, levando à conclusão de que a mitocôndria exerce um papel importante na transmissão de sinal letal que foi inicialmente percebido em nível lisossomal (VITTAR et al., 2010).

A terapia fotodinâmica é conhecida por eliminar tumores por meio da ativação de apoptose, por necrose e por indução de inflamação aguda, porém há evidências demonstrando que a PDT também pode induzir a expressão de fatores de crescimento, de metaloproteinases de matriz, de citocinas e prostaglandinas que estão relacionadas à sobrevivência celular, o que poderia contribuir para possíveis recorrências tumorais (COGNO et al., 2011).

Além de levar as células à apoptose, a PDT também é capaz de induzir a autofagia, como demonstrado em tumores linfoides e em tumores sólidos, assim como em fibroblastos de embriões murinos. O papel da autofagia na resposta das células à PDT ainda permanece incerto (XUE; CHIU; OLEINICK, 2010).

A necrose ocorre após a exposição de uma célula a condições fisiológicas extremas e persistentes (como hipóxia, estresse oxidativo ou altas temperaturas), ou mesmo a patógenos. A disfunção eletrolítica decorrente da ação fotodinâmica induz nas organelas e, posteriormente, na célula como um todo, um inchaço que culmina no rompimento da célula em questão (lise celular) (NOWAK-STEPNIEWSKA et al., 2011).

Foi demonstrada citotoxicidade por parte da PDT sobre células que apresentam multi-resistência a drogas. Algumas vezes, no entanto, essa terapia não foi capaz de gerar bons resultados, possivelmente devido à exclusão do fotossensibilizador pelas proteínas de efluxo do tipo P-gp, ou devido a outros mecanismos que não estão relacionados ao aumento da expressão de P-gp. A multi-resistência a drogas está geralmente associada ao aumento de expressão de certas proteínas transmembrana, tais como P-glicoproteína (P-gp) e proteínas associadas à multi-resistência de drogas (MRP), e é considerada um dos principais obstáculos para os bons resultados obtidos após o tratamento quimioterápico de tumores (TSAI et al., 2004).

2.9. FOTOSSENSIBILIZADORES

Fotossensibilizadores são moléculas que utilizam a energia proveniente de radiação em comprimento de onda específico para gerar espécies reativas de oxigênio, as quais podem danificar estruturas celulares, resultando em morte celular.

Porfirinas e seus derivados são considerados como fotossensibilizadores de primeira geração, e foram desenvolvidos principalmente durante as décadas de 70 e 80. Com relação ao seu espectro de absorção de luz, tais compostos apresentam uma banda intensa na região de 370 nm, denominada de banda de Soret, e quatro bandas com menor coeficiente de extinção molar em maiores comprimentos de onda, denominadas de bandas Q (BREWIS et al., 2001; PELISSON et al., 2006). Estes compostos geralmente apresentam desvantagens como toxicidade no escuro, fotossensibilização cutânea (o acúmulo de fotossensibilizador na pele como um todo, o que pode gerar incômodo e dor ao contato com a luz, e que pode durar de algumas horas até vários dias) e o fato de não absorverem em comprimentos de onda maiores. Essas desvantagens levaram ao desenvolvimento de fotossensibilizadores de segunda geração, como ftalocianinas, clorinas e benzoporfirinas (BAZYLIŃSKA et al., 2012). O Canadá foi o primeiro país a aprovar o uso de Photofrin® (uma formulação de porfirinas disponível comercialmente) em 1993, e logo após isso esse composto foi aprovado pelo órgão norte-americano FDA (*Food and Drug Administration*) (USUDA et al., 2010).

As porfirinas podem acumular nos tecidos neoplásicos com considerável seletividade, mas a maior parte dos compostos não é capaz de penetrar nas membranas celulares devido à sua hidrofobicidade. Por isso, o principal mecanismo de morte celular ativado após a PDT mediada por porfirinas é baseado no dano externo à membrana plasmática. O núcleo era considerado um dos locais mais desejados para a ocorrência de danos oxidativos em virtude de conter o DNA genômico, porém os danos ao núcleo após a PDT são raros e, em alguns casos, podem levar a uma ablação tumoral incompleta e a recorrências tumorais (SADLER et al., 2011; SWAMY et al., 2006).

Receptores nucleares têm por característica uma alta afinidade de ligação com seus ligantes, e são comumente utilizados em terapias que utilizam liberação controlada de drogas que mimetizam tais ligantes. O receptor de estrógeno (ER) é um exemplo de tais receptores, e se encontra super-expresso em grande parte dos casos de tumores, se comparado às células saudáveis. No entanto, os conjugados droga-estrógeno frequentemente demonstram uma baixa afinidade de ligação ao receptor de estrógeno, principalmente devido a algumas modificações

ocorridas na molécula original de estradiol. De fato, foi demonstrado que a clorina e-6 (Ce6) conjugada a um sinal de localização nuclear reduziu em mais de 2000 vezes a Concentração Efetiva 50 (EC50, concentração necessária para obtenção de 50% do efeito máximo da droga) em comparação com a Ce6 não conjugada, aumentando a atividade fotossensibilizadora deste corante (SWAMY et al., 2006). Uma alternativa para obter localização nuclear de um fotossensibilizador foi realizada também com a clorina e-6, mas desta vez conjugando-a com um sinal de localização nuclear para ligação ao receptor de insulina. Este procedimento aumentou, novamente, mais de 2000 vezes a citotoxicidade média da Ce6 (SADLER et al., 2011).

Fotossensibilizadores de segunda geração são excitados por luz em comprimentos de onda acima de 650 nm, geralmente, o que implica em maior penetração da radiação nos tecidos. Além disso, são mais rapidamente eliminados pelos tecidos normais, diminuindo a fotossensibilidade cutânea nos pacientes (BAZYLIŃSKA et al., 2012). Nas últimas décadas as ftalocianinas ganharam espaço enquanto agentes fotossensibilizadores na terapia fotodinâmica, juntamente com outros compostos como as naftalocianinas e as clorinas. Em sua forma natural, as ftalocianinas são hidrofóbicas, o que prejudica sua biodistribuição, porém podem se tornar mais hidrofílicas mediante modificações como carbonilação ou sulfonação de seus anéis benzênicos. Tais modificações, no entanto, acabam por diminuir o rendimento quântico da reação fotodinâmica desses fotossensibilizadores, problema que pode ser contornado pela sua ligação a nanopartículas (LI et al., 2010).

As ftalocianinas contêm um átomo central que determina o comportamento da molécula, por exemplo o rendimento quântico no estado triplete e a maior duração do composto no estado excitado (TYNGA; HOURELD; ABRAHAMSE, 2013). Apresentam uma absorção eficiente e intensa na região do vermelho e infravermelho próximo do espectro de luz. Estudos demonstram que a eficácia das ftalocianinas pode ser aumentada se elas são complexadas à superfície de nanopartículas de ouro, uma vez que o rendimento quântico na geração de oxigênio singlete é aumentado na presença de, ou em associação a, reagentes de transferência de fase, como o brometo de cetiltrimetilamônio, o qual estabiliza a forma monomérica ativa do fotossensibilizador (STUCHINSKAYA et al., 2011).

Alguns autores já começam a se referir a uma terceira geração de fotossensibilizadores, os quais consistem nos fotossensibilizadores de segunda geração com algumas modificações, tais como conjugação biológica (com anticorpos, por exemplo) e inserção em carreadores (nanocarreadores poliméricos e lipossomas, por exemplo). Tais modificações podem aumentar significativamente a liberação específica dos

fotossensibilizadores nas células tumorais, preservando os tecidos saudáveis (BAZYLIŃSKA et al., 2012).

Muitos fotossensibilizadores já foram aprovados pelo órgão americano FDA (*Food and Drug Administration*) para ensaios clínicos e para tratamento de algumas doenças. Photofrin®, alguns fotossensibilizadores de segunda geração e o ácido 5-aminolevulínico (ALA) são exemplos de fotossensibilizadores aprovados. A administração de ALA pode ser por via tópica ou sistêmica, acumulando-se preferencialmente em células tumorais devido ao relativo aumento de atividade de deaminases e à atividade reduzida da enzima ferroquelatase (responsável pela conversão da protoporfirina IX em HEME). Isso porque a PDT mediada por ALA envolve a geração de protoporfirina IX (PpIX) endógena (COGNO et al., 2011).

ALA pode ser utilizado tanto para diagnóstico como para tratamento de neoplasias. Como pode ser inferido pelo parágrafo anterior, este composto não é um fotossensibilizador em si, mas é um precursor na via biossintética do HEME, e o verdadeiro fotossensibilizador é a PpIX. Há dois principais agentes limitantes nesta via biossintética: a produção de ALA a partir de glicina e succinil CoA (reação regulada pelo HEME por meio de um mecanismo de *feedback* negativo); e a conversão de PpIX em HEME (processo controlado pela enzima ferroquelatase, a qual adiciona um ferro ferroso à molécula de protoporfirina IX). Quando o ALA é administrado, o primeiro passo da síntese torna-se intensificado, levando ao acúmulo de PpIX no tecido.

A dose de luz e o tipo de fotossensibilizador são muito importantes para o resultado da terapia, uma vez que já foi demonstrado que uma alta concentração de fotossensibilizador e/ou alta dose de luz são capazes de aumentar a morbidade em decorrência do tratamento (dor, necrose, fibrose, formação de cicatrizes e hiperpigmentação das regiões iluminadas) (MANG, 1990).

Muitos estudos indicam que a hipertermia realizada imediatamente após a terapia fotodinâmica aumenta os resultados terapêuticos de ambos tratamentos de maneira sinérgica, levando a maiores taxas de cura e maior profundidade de necrose. A combinação entre terapia fotodinâmica e hipertermia mostra-se capaz de minimizar os efeitos colaterais decorrentes, principalmente, da primeira. Há estudos onde se observa um efeito sinérgico entre as duas terapias, principalmente se a hipertermia acontece imediatamente após a terapia fotodinâmica. Os autores sugerem que isso ocorra, provavelmente, porque a PDT inibe o sistema de reparo celular responsável pela termoinativação, ou porque a hipertermia inibe o sistema de reparo responsável pela resposta celular à PDT (WALDOW et al., 1987). Além disso, os efeitos mitocondriais decorrentes em grande parte pelo fotossensibilizador ativado, bem como os

danos nucleares e de membrana após a hipertermia, se somam, danificando as estruturas das células tumorais de modo generalizado e facilitando a morte das mesmas (MANG, 1990; YANASE et al., 2009).

Uma vantagem do acoplamento de fotossensibilizadores a nanopartículas metálicas é a possibilidade de combinação de terapia hipertérmica (por parte das nanopartículas) e da terapia fotodinâmica (por parte dos fotossensibilizadores), simultaneamente. Quando nanopartículas metálicas são utilizadas, a energia térmica gerada acelera a geração de espécies reativas de oxigênio, especialmente oxigênio singlete (ROZANOVA; ZHANG, 2009).

Kuo e colaboradores, em 2010, sintetizaram nanobastões de ouro capazes de gerar calor por ressonância plasmônica de superfície, conjugadas com Indocianina Green, um agente fotossensibilizador, e observaram que a quantidade de oxigênio singlete gerada pelo efeito fotodinâmico nessas nanopartículas é maior quando comparada à produzida pelo fotossensibilizador sozinho. Uma possível explicação seria o aumento tanto de cruzamentos intersistema quanto do rendimento para o estado triplete. Observou-se também que, mesmo após o efeito fotodinâmico e o aquecimento a 46°C da terapia hipertérmica, as moléculas de fotossensibilizador não foram degradadas. Essa estabilidade confere às nanobastões conjugados com fotossensibilizador mais uma vantagem em sua utilização (KUO et al., 2010).

Tendo em vista o exposto, estudos visando a elucidação dos mecanismos de ação sinérgica das terapias supracitadas, bem como avaliando sua eficácia e viabilidade, são necessários para que haja uma alternativa confiável às terapias antitumorais convencionais, as quais são caracterizadas por desencadearem efeitos deletérios sérios que prejudicam a qualidade de vida dos pacientes. A terapia hipertérmica aplicada juntamente com a terapia fotodinâmica é uma maneira de diminuir efeitos deletérios causados pelas intervenções terapêuticas convencionais e de combater tumores sem a necessidade de métodos invasivos.

2.10. MORTE CELULAR POR APOPTOSE OU NECROSE

A apoptose é um mecanismo de morte celular controlado genética ou epigeneticamente, e decorre da interação entre uma célula e os sinais presentes no meio extracelular. A apoptose se torna evidente mediante o aparecimento de alterações morfológicas na microscopia de luz, tais como condensação e fragmentação cromatínica e

formação de protuberâncias na superfície celular. O processo apoptótico requer a participação ativa das células afetadas e destinadas à morte, e ao final do processo pode-se observar evidente desintegração nuclear, degradação do DNA por ação das endonucleases, e formação dos corpos apoptóticos (GALLUZZI et al., 2015). Os macrófagos são as células responsáveis por endocitarem os corpos apoptóticos do local, e o fazem mediante o reconhecimento da fosfatidilserina que foi translocada do lado interno para o lado externo da membrana plasmática como forma de sinalização pró-apoptótica (COMPTON, 1992).

A ativação de proteínas da classe das cisteino-proteases, chamadas de caspases, é um dos indicadores clássicos da ocorrência de apoptose (COHEN, 1997; MINKO; KOPEČKOVÁ; KOPEČEK, 2001). Elas podem ser ativadas por duas vias principais de direcionamento das células à apoptose. A primeira é a via iniciada por intermédio dos receptores de morte (como Faz, CD95 e TNF-R1), os quais sinalizam a agregação e a formação de um complexo indutor de morte após o reconhecimento de seus ligantes. Esse complexo indutor de morte recruta pró-caspases por meio de proteínas de domínio de morte associado ao receptor. A segunda via refere-se à via mitocondrial, cuja ativação se dá em resposta a danos genéticos, e envolve a ativação de um membro pró-apoptótico da família Bcl-2. Os membros pró- e anti-apoptóticos da família Bcl-2 são responsáveis por regular a liberação de citocromo c a partir da membrana interna da mitocôndria. O citocromo c, por sua vez, se associa com Apaf-1, dATP e pró-caspase 9 para formar o apoptossomo. Subsequentemente, outras caspases são ativadas em um processo que culmina com a clivagem de substratos específicos e na morte celular por apoptose (DEBATIN, 2000; EISCHEN et al., 1997).

Um dos fatores que influenciam na inibição ou na promoção de apoptose é o estresse oxidativo, dependendo da intensidade do estímulo oxidativo (FERNANDES; COTTER, 1994). Quando a quantidade de espécies reativas na célula aumenta significativamente, a ponto de não conseguirem ser neutralizadas de maneira eficiente pelos antioxidantes intracelulares, são gerados danos a biomoléculas importantes para a manutenção das funções celulares, tais como DNA, RNA, proteínas e fosfolípidos. A esse fenômeno dá-se o nome de estresse oxidativo. Em geral, os danos oxidativos constituem estímulos pró-apoptóticos (ALLEN; TRESINI, 2000), os quais são combatidos pelas defesas antioxidantes das células, compostas por antioxidantes enzimáticos (catalase, superóxido dismutase, glutathione peroxidase, entre outros) ou não enzimáticos (glutathione reduzida, tioredoxina e vitamina E, por exemplo). De fato, há evidências de que o nível intracelular de glutathione reduzida está relacionado às taxas de indução de apoptose (FERNANDES; COTTER, 1994).

A necrose, por sua vez, não é um processo de morte em si, uma vez que as células já morreram muito antes de qualquer alteração histológica indicativa de necrose ter aparecido. As alterações morfológicas observadas ao microscópico após a morte das células são, principalmente, referentes ao núcleo da célula: cariólise (a qual consiste na perda de coloração nuclear em decorrência de extensa fragmentação cromatínica); picnose (condensação cromatínica extrema no núcleo, com exagerada pigmentação) e cariorrexe (perda dos limites nucleares observáveis, com aglomerações esporádicas de cromatina na carioteca). Alterações fora do núcleo consistem de eosinofilia (em decorrência da acidificação do interior da célula), tumefação (inchaço da célula que culmina na ruptura da membrana plasmática) ou mesmo a completa fragmentação celular (FINK; COOKSON, 2005).

A morte celular seguida de necrose ocorre em decorrência, principalmente, de fatores externos, tais como mudanças no microambiente no qual as células em questão se encontram, ação de patógenos como toxinas bacterianas, choque térmico ou mesmo um aumento exagerado de temperatura, em geral acima de 48°C. Ainda, a perda de integridade celular, o sistema complemento e a ação de células *Natural Killer* também podem desencadear o processo necrótico. Um exemplo clássico de fenômeno que culmina no processo necrótico é a lesão isquêmica, em virtude do quadro de anóxia que se instala e que incita a geração de uma grande quantidade de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, acabando por comprometer significativamente a integridade celular. As células necróticas sofrem lise e liberam o conteúdo intracelular para o meio extracelular, o que contribui para a instalação de um quadro inflamatório, fenômeno que não ocorre no processo apoptótico (DUNN et al., 2004; PROSKURYAKOV; KONOPLYANNIKOV; GABAI, 2003).

As proteínas de choque térmico (HSP) podem proteger a célula contra os danos causados pelo aumento de temperatura, principalmente se o estímulo hipertérmico for de menor intensidade e permanecer por longo tempo. Ainda, as HSP podem proteger as células contra os danos causados pelo estresse oxidativo e pela lesão por isquemia e reperfusão (PROSKURYAKOV; KONOPLYANNIKOV; GABAI, 2003).

Tanto a apoptose quanto a necrose podem ser ativadas após estímulo hipertérmico, porém qual a razão de um mecanismo ser ativado em detrimento de outro em uma célula ainda não está bem estabelecido. São necessários mais estudos que investiguem qual o mecanismo de ativação da apoptose ou da necrose em decorrência da hipertermia, e a pesquisa com nanopartículas metálicas para ablação tumoral fototérmica pode auxiliar nesse sentido. Este é um bom modelo para investigar tanto a eficácia da terapia hipertérmica como o mecanismo de ação ablativa da mesma. Comparada às técnicas clássicas de elevação da

temperatura, as quais não discriminam o tecido tumoral dos tecidos saudáveis adjacentes, a hipertermia desencadeada com o auxílio de nanopartículas logram mais êxito quanto à especificidade do tratamento. Isso se dá pois as nanopartículas metálicas, as quais podem chegar a absorver comprimentos de onda na faixa do infravermelho próximo (região com maior penetração nos tecidos) apresentam moderada seletividade às células tumorais em razão da grande quantidade de capilares fenestrados no tecido tumoral e da grande demanda metabólica dos tumores.

3. JUSTIFICATIVA

Além dos efeitos colaterais inerentes aos fotossensibilizadores, a maioria desses compostos são ativados por luz em comprimentos de onda que comprometem a penetração dela nos tecidos, limitando a área do tratamento às regiões superficiais. Dependendo do comprimento de onda utilizado na terapia fotodinâmica, a atenuação da radiação pelos tecidos resulta em maiores taxas de morte celular na superfície, em detrimento das regiões mais profundas. Trabalhos na literatura demonstram que a hipertermia é mais eficaz nas regiões mais profundas dos tumores. Assim, PDT e terapia hipertérmica parecem se complementar ao induzirem danos celulares a regiões distintas e sobrepostas na massa tumoral (WALDOW et al., 1987). Além disso, aliando as duas terapias, a concentração de fotossensibilizador utilizada pode ser diminuída, suprimindo os efeitos colaterais da terapia fotodinâmica.

O possível efeito sinérgico de ambas as terapias necessita ser mais bem elucidado. Há dados na literatura que demonstram este sinergismo quando as terapias são feitas separadamente, porém pouco se sabe acerca da realização das duas intervenções terapêuticas simultaneamente. Este trabalho se propõe a preencher esta lacuna, bem como a elucidar quais os mecanismos por trás deste efeito em conjunto.

4. OBJETIVOS

O objetivo deste estudo foi investigar o efeito sinérgico e a eficácia das terapias fotodinâmica e hipertérmica utilizando nanobastões de ouro em modelos tumorais murinos, bem como a viabilidade da confecção e da utilização *in vivo* de nanobastões de ouro recobertos por porfirinas ou ftalocianinas.*

4.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Sintetizar nanobastões de ouro que absorvam luz em comprimento de onda próximo de 800 ou 630 nm;
- Acoplar à superfície dos nanobastões fotossensibilizador que absorva luz em comprimento de onda na região do vermelho (porfirinas ou ftalocianinas);
- Caracterizar as nanopartículas híbridas para posterior utilização em tratamentos *in vitro* e *in vivo*.
- Verificar a ação hipertérmica e fotodinâmica das nanobarras e dos fotossensibilizadores (conjugados ou não) *in vitro* e *in vivo* em modelo de tumores de pele (células de carcinoma de Ehrlich ou melanoma).
- Verificar a eficiência na geração de oxigênio singlete dos fotossensibilizadores, acoplados ou não a nanobarras de ouro;
- Verificar a eficiência na geração de radical hidroxil dos fotossensibilizadores, acoplados ou não a nanobarras de ouro;

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. Métodos para porfirina comercial (Photogen®) e porfirina tetrassulfonada

Esta etapa foi realizada na primeira metade do período de doutoramento, no Instituto de Química de São Carlos e no Instituto de Física de São Carlos. Nesta primeira parte do trabalho utilizamos porfirinas como fotossensibilizadores, porém os resultados esperados não foram obtidos de maneira satisfatória, como será descrito na seção de resultados.

5.1.1. Síntese dos nanobastões

- Síntese das sementes

Para a síntese das sementes, 5 mL de uma solução $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ de brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) foram adicionados a 5 mL de uma solução $5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de cloreto áurico, sendo a solução resultante rapidamente homogeneizada. Por fim, 600 μL de uma solução $1 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ de boroidreto de sódio foram adicionados à solução. A mistura foi homogeneizada vigorosamente por dois minutos e, após isso, foi deixada em repouso por 6 horas a 25°C e ao abrigo da luz. Após a síntese, as sementes foram armazenadas em frasco âmbar até que fossem utilizadas. Todo o procedimento experimental foi realizado a 25°C (DE FREITAS et al., 2013; MURPHY; JANA, 2002).

- Síntese dos nanobastões

Para a síntese dos nanobastões, 200 μL de uma solução $0,004 \text{ mol L}^{-1}$ de nitrato de prata foram adicionados a 5 mL de CTAB $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ juntamente com 5 mL de cloreto áurico $0,001 \text{ mol L}^{-1}$. A solução foi levemente agitada e acrescida de 70 μL de ácido ascórbico $0,0788 \text{ mol L}^{-1}$. A solução que antes apresentava coloração amarela se tornou incolor devido à redução do ouro. Por fim, 12 μL da solução de sementes foram adicionados à mistura, sendo esta deixada em repouso ao abrigo da luz por 15 minutos. A cor da solução muda de acordo

com a formação das nanopartículas, podendo ir de azul até vermelho, dependendo da razão de proporção. Todos os procedimentos experimentais foram realizados a 37°C, sendo a temperatura mantida pela utilização de banho-maria ao abrigo da luz. Após a síntese, a suspensão de nanobastões foi centrifugada a 10000 rpm em uma centrífuga (Hitachi, modelo CR-20B2), com temperatura interna mantida a 25°C, de modo a separar as partículas do CTAB livre, o qual é altamente citotóxico. O sobrenadante contendo CTAB foi descartado e o precipitado foi lavado com água deionizada. Esse procedimento de lavagem e centrifugação foi repetido por três vezes. Ao final, as partículas foram suspensas em 1 mL de água desionizada e estocadas ao abrigo da luz até sua utilização (MURPHY; JANA, 2002).

- Caracterização dos nanobastões

Os nanobastões sintetizados foram caracterizados por espectrofotometria, fazendo uma varredura de 200 a 900 nm. Além disso, a suspensão de nanobastões foi testada mediante irradiação de luz (808 nm) para verificar se a ressonância plasmônica de superfície estava realmente ocorrendo, e o fizemos verificando o aumento de temperatura do tubo de ensaio onde se encontrava a suspensão.

5.1.2. Fotossensibilizadores

Nesta primeira parte do estudo, foram utilizados dois fotossensibilizadores: a porfirina disponível comercialmente Photogem® (gentilmente cedido pela professora Cristina Kurachi e equipe), e posteriormente (após a verificação da ineficácia da porfirina comercial Photogem® no recobrimento dos nanobastões), utilizou-se uma porfirina tetrassulfonada de zinco (meso-tetrakis-(4-sulfonatofenil)porfirina, ou simplesmente TPPS₄ (Mid Century Chemicals), gentilmente cedida pela professora Janice Rodrigues Perussi. As figuras 10 e 11 mostram as estruturas da porfirina e da ftalocianina, respectivamente.

Figura 10. Estrutura química da porfirina como encontrada no produto Photogem®.

Fonte: Próprio autor.

Figura 11. Estrutura química de uma molécula de TPPS₄, a porfirina tetrassulfonada. No caso deste trabalho, o átomo central foi Zinco.

Fonte: Próprio autor.

5.1.3. Animais experimentais

Nesta etapa foram utilizados camundongos (*Mus musculus*) machos criados no biotério do Programa de Pós Graduação Interunidades Bioengenharia, na Escola de Engenharia de São Carlos, pesando entre 30 e 40 gramas. O biotério utiliza ciclo de

claro/escuro (12/12h) com livre acesso a água e ração, além de controle de temperatura. O projeto seguiu as normas da Comissão de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), onde foi aprovado. O parecer encontra-se anexo ao final desta tese.

Os camundongos foram divididos em três grupos experimentais, sendo todos os animais portadores de tumor de Ehrlich:

1. GRUPO CONTROLE: composto por 16 animais que não receberam qualquer tipo de tratamento;
2. GRUPO PDT: composto por 12 animais tratados somente com terapia fotodinâmica utilizando fotossensibilizador (Photogem® ou porfirina tetrassulfonada) e luz em 532 nm (Quantum Tech, São Carlos, SP, Brasil) para Photogem®, ou 630 nm para a porfirina tetrassulfonada;
3. GRUPO HIPERTERMIA: composto por 10 animais tratados hipertermicamente por meio de ativação ótica (luz em 630 nm) de nanobastões de ouro.

Além dos animais citados, foram utilizados 10 animais para a manutenção das células tumorais e mais 20 para a verificação da cinética de acúmulo e eliminação de porfirina.

5.1.4. Manutenção das Células Tumorais

As células do carcinoma de Ehrlich foram gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Rubens Cecchini, do Laboratório de Fisiopatologia de Radicais Livres, Departamento de Ciências Patológicas, da Universidade Estadual de Londrina. O líquido ascítico proveniente de um animal portador de carcinoma de Ehrlich há 10 dias foi coletado e 100 µL desse líquido foram inoculados intraperitonealmente em outro camundongo. Este mesmo procedimento foi repetido a cada 10 dias (DAGLI; GUERRA; SALDIVA, 1992; SAAD-HOSSNE; SAAD-HOSSNE; PRADO, 2004).

5.1.5. Inoculação do Tumor de Ehrlich

Uma solução contendo $2,0 \times 10^6$ células tumorais foi inoculada no tecido subcutâneo da região inguinal esquerda dos camundongos (KURODA et al., 1976). O tratamento com nanobastões foi realizado quando o tumor atingiu um diâmetro de aproximadamente 10 mm, devido ao poder de penetração do laser.

5.1.6. Tratamento Hipertérmico

Vinte camundongos (n=20) foram divididos em 2 grupos experimentais, a saber: Controle (não receberam nanobastões e não foram irradiados, n=10); e grupo Hipertermia (receberam nanobastões e foram irradiados, n=10). Após o tratamento, os animais foram acompanhados por análise de sobrevivência durante 60 dias depois da irradiação.

Quando o tumor sólido atingiu o diâmetro de 10 mm, 100 μL de uma solução contendo nanopartículas a uma densidade óptica de 0,5 foram injetados via veia caudal nos animais do grupo Hipertermia. Os animais controle receberam 100 μL de solução salina estéril. De acordo com o protocolo de O'Neal et al (O'NEAL et al., 2004), 72 horas depois da administração de nanobastões ou de salina estéril os animais (exceto controle) foram submetidos ao tratamento com laser na região do infravermelho próximo (808 nm) em intensidade de 720 mW cm^{-2} (dose de 216 J cm^{-2}) por 5 minutos, sendo que a área irradiada foi de $2,5 \text{ cm}^2$. A temperatura da superfície e da base do tumor foram medidas por um termômetro digital. O procedimento está ilustrado na figura 12.

Para os tratamentos, todos os camundongos foram anestesiados com xilazina a 10 mg kg^{-1} de peso corpóreo, e quetamina a 100 mg kg^{-1} , sendo a região do tumor previamente tricotomizada. A anestesia tem um período hábil de 60 a 100 minutos.

Figura 12: Procedimento do tratamento hipertérmico. Irradiação de camundongo portador de tumor de Ehrlich por luz em comprimento de onda de 808 nm (dose de luz de 216 J cm^{-2}). Um Termistor digital foi utilizado para medir a temperatura da superfície e da base do tumor.

Fonte: Próprio autor.

5.1.7. Cinética de Acúmulo de Porfirina no Tumor

A cinética de acumulação da porfirina foi investigada de modo a esclarecer qual o melhor tempo de espera entre a administração de fotossensibilizador e a irradiação com laser para o tratamento fotodinâmico. Para isso, utilizamos cinco camundongos, administrando-lhes uma solução contendo $1,0 \text{ mg kg}^{-1}$ de Photogem®, ou $1,0 \text{ mg kg}^{-1}$ de TPPS₄ e analisamos sua farmacocinética por espectroscopia de fluorescência, sendo a fonte de excitação um laser Nd:YAG em 532 nm, com potência calibrada a 10 mW (Melo et al., 2004). Os resultados foram utilizados para a administração de fotossensibilizador nos outros animais experimentais.

5.1.8. Tratamento Fotodinâmico

18 animais foram divididos em 3 grupos experimentais: Controle (não receberam fotossensibilizador e não foram irradiados com laser, n=6), Grupo PDT 10' (receberam 1,5 mg kg⁻¹ de Photogem® e foram irradiados com laser a 630 nm, 150 mW cm⁻² durante 10 minutos, n=6) e Grupo PDT 20' (receberam 1,5 mg kg⁻¹ de Photogem® e foram irradiados com laser a 630 nm, 150 mW cm⁻² durante 20 minutos, n=6). Após a terapia fotodinâmica, o crescimento tumoral foi acompanhado por 30 dias, e depois eutanasiados em câmara de CO₂.

5.1.9. Análise de Sobrevivência

Após o tratamento hipertérmico ser realizado, os 10 animais foram observados por até 90 dias, levando em consideração o grau de eliminação do tumor, ocorrência de recidivas e a sobrevida. Já os animais tratados fotodinamicamente foram acompanhados por 30 dias, também levando em conta os mesmos parâmetros. Os animais que sobreviveram após o período de observação foram eutanasiados em câmara de CO₂.

5.1.10. Observação do Volume Tumoral

Os animais do grupo PDT foram acompanhados quanto ao crescimento de seus tumores após o tratamento hipertérmico. Para isso, o volume tumoral foi medido diariamente, aplicando-se a fórmula $V = a \times b^2 / 2$, onde V é o volume tumoral, a é o maior diâmetro do tumor e b é o menor diâmetro tumoral (CARLSON et al., 1983).

5.1.11. Síntese de Nanobastões acoplados a Fotossensibilizador

Após a síntese de nanobastões pelo método de *seeding* e após os tratamentos hipertérmico e fotodinâmico serem realizados separadamente, verificou-se a viabilidade de se

recobrirem nanobastões de ouro com Photogem® ou com TPPS₄. Para isso, à solução de nanobastões foram adicionadas soluções de concentrações variadas de porfirina (0,5 mg mL⁻¹, 1 mg mL⁻¹, 2 mg mL⁻¹ e 4 mg mL⁻¹) ou porfirina tetrassulfonada de zinco (2 mg mL⁻¹), sendo que a mistura foi deixada em agitação por 12 horas, seguida de centrifugação e redispersão em água desionizada. Os espectros de absorção UV-VIS foram analisados para avaliar o possível recobrimento das nanopartículas.

5.1.12. Fotodegradação de porfirina tetrassulfonada

Como foi observado que o recobrimento por Photogem® não logrou êxito, ao passo que o recobrimento por porfirina tetrassulfonada de zinco obteve moderado sucesso, avaliou-se a fotodegradação do fotossensibilizador TPPS₄ de zinco. O intuito deste teste era verificar o grau de agregação das nanopartículas com fotossensibilizador, visto que a atividade do mesmo mostrava-se diminuída nos testes de fluorescência. Com os resultados deste teste de fotodegradação pode-se inferir o nível de agregação de uma amostra de fotossensibilizador.

A solução mãe constava do fotossensibilizador a 1,5 mg mL⁻¹. A partir dela foram preparadas soluções aquosas (com 0,2% de surfactante Tween 80), nas concentrações de 1x10⁻⁶gmL⁻¹ e de 2x10⁻⁶gmL⁻¹. As amostras foram iluminadas com um laser de diodo em 635nm (Quantum Tech, São Carlos, SP, Brasil). O laser foi ajustado para a irradiância de 50 mW cm⁻². A potência de emissão do laser foi de 33,3 mW medidas com um potenciômetro 3ASH (Ophir, Israel). A medida da fotodegradação foi avaliada mediante a coleta de fluorescência da amostra enquanto era irradiada. Foi utilizado um espectrofotômetro USB-2000 (OceanOptics, EUA) conectado a uma fibra ótica de 400 µm de diâmetro (OceanOptics, EUA). Antes do espectrofotômetro, foi posicionado um filtro FEL 650 nm (Thorlabs, EUA) a fim de cortar o sinal de excitação do laser. O sistema de coleta foi ajustado para registros dos espectros de 2 em 2 minutos durante 60 minutos. Todos os espectros foram salvos e processados com um software matemático (OriginPro 9.1, OriginLab). O máximo de emissão de fluorescência em 693 nm foi usado como ponto de investigação da variação da intensidade durante o procedimento de iluminação.

5.2. Métodos para ftalocianina tetracarboxilada de zinco e ftalocianina tetracarboxilada metilglucaminada de zinco.

Esta segunda parte do trabalho foi desenvolvida no Wellman Center for Photomedicine, na Faculdade de Medicina de Harvard, sob supervisão do professor Dr. Michael Hamblin. O estágio em pesquisa no exterior teve duração de 10 meses (de maio de 2014 a março de 2015) e visou a obtenção de sucesso no recobrimento das nanopartículas com diferentes fotossensibilizadores, visto que os compostos utilizados na primeira parte do trabalho não levaram a um sucesso satisfatório neste intento.

A síntese das nanopartículas (inicialmente das *seeds* e depois dos nanobastões em si) foi idêntica à descrita no item 5.1.1 deste trabalho e, portanto, não será repetida aqui. A metodologia a partir daí será descrita abaixo.

5.2.1. Fotossensibilizadores utilizados

Nesta segunda parte do trabalho, foram utilizadas ftalocianinas tetracarboxiladas de zinco, com ou sem radicais metilglucamina em sua estrutura (para aumentar a solubilidade). As duas ftalocianinas foram sintetizadas e gentilmente cedidas pelo professor Dr. Anderson Ribeiro da Universidade Federal do ABC. A figura 13 ilustra a estrutura química dos compostos. Se a ftalocianina não foi acrescida de metilglucamina, seus quatro radicais são grupamentos carboxila. Na ftalocianina glucaminada, dois radicais em lados opostos são substituições da hidroxila do grupamento carboxila por radicais metilglucamina.

Figura 13. Estrutura química da ftalocianina tetracarboxilada. Neste trabalho, o metal central é o zinco, e no caso da ftalocianina tetracarboxilada com metilglucamina, dois dos radicais - R são hidroxilas, e os outros dois são metilglucamina. Na ausência de metilglucamina, os quatro radicais - R são hidroxilas (OH).

Fonte: Próprio autor.

5.2.2. Recobrimento dos nanobastões por ftalocianinas

Duas ftalocianinas de zinco foram utilizadas neste estudo: uma ftalocianina de zinco tetracarboxilada (aqui chamada de ZnRcPc, ou simplesmente Z) e uma ftalocianina de zinco tetracarboxilada com grupamentos metil-glucamina (aqui chamada de ZnTcPc-G, ou simplesmente G).

Uma solução 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de ftalocianinas tetracarboxiladas de zinco foi adicionada à suspensão de nanobastões de ouro previamente sintetizados. O CTAB, o qual apresenta cargas positivas, forma um complexo iônico com a ftalocianina, a qual possui cargas negativas. O coeficiente de absorção molar dos nanobastões de ouro recobertos por CTAB e por ftalocianinas foi utilizado para calcular a quantidade de fotossensibilizador complexado com as nanopartículas (JANG et al., 2011).

Como uma caracterização final, a morfologia das partículas foi analisada por microscopia eletrônica de transmissão utilizando equipamento do próprio Wellman Center for Photomedicine. O preparo das amostras não requereu recobrimento metálico, já que os

nanobastões são compostos de ouro. Aumentos de 18.000X e 46.000X foram utilizados para a captura das imagens.

5.2.3. Análise da geração de oxigênio singlete

A geração de oxigênio singlete foi analisada utilizando-se um kit contendo agente para detecção desta espécie reativa disponível comercialmente (*Singlet Oxygen Sensor Green, Molecular Probes*), o qual foi misturado à solução de nanobastões e ftalocianinas ($4 \mu\text{mol L}^{-1}$). Durante a irradiação destas soluções com luz em 635 nm (dose de luz de 1 J cm^{-2}), o rendimento da produção de oxigênio singlete por parte dos nanobastões complexados com ftalocianinas foi comparado ao rendimento das ftalocianinas não complexadas. O ensaio foi realizado em placa de 96 poços e a fluorescência foi lida em leitor de microplacas (comprimento de onda de excitação em 504 nm e comprimento de onda de emissão em 525 nm).

5.2.4. Análise da geração radical hidroxil

A geração de radical hidroxil foi analisada utilizando-se um kit contendo agente para detecção desta espécie reativa disponível comercialmente (3'-(p-hidroxifenil) fluoresceína (HPF), *Molecular Probes*), o qual foi misturado à solução de nanobastões e ftalocianinas ($4 \mu\text{mol L}^{-1}$). Durante a irradiação destas soluções com luz em 635 nm (dose de luz de 1 J cm^{-2}), o rendimento da produção de radical hidroxil por parte dos nanobastões complexados com ftalocianinas foi comparado ao rendimento das ftalocianinas não complexadas. O ensaio foi realizado em placa de 96 poços e a fluorescência foi lida em leitor de microplacas (comprimento de onda de excitação em 490 nm e comprimento de onda de emissão em 515 nm).

5.2.5. Verificação da fototoxicidade *in vitro*

A eficácia dos complexos de nanobastões de ouro-ftalocianinas na eliminação de tumores foi avaliada *in vitro* em células de melanoma melanótico da linhagem B16F10, e em linhagem não melanótica B16G4F. As células foram semeadas em placas de 96 poços (9000 células por poço) contendo meio de cultura DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino. Após 24 horas em incubação em incubadora com atmosfera controlada a 5% de CO₂ e a 37°C, o meio de cultura foi substituído por meio DMEM fresco (sem suplementação com soro fetal bovino) e contendo: 1 - suspensão de nanobastões de ouro complexados com ftalocianinas; 2 - somente solução de ftalocianinas; 3 - somente suspensão de nanobastões recobertos por CTAB. As células controles foram tratadas com meio de cultura contendo PBS. Após 5 horas de incubação, os poços foram irradiados com luz em 635 nm (dose de luz: 5 J cm⁻²). As células irradiadas foram, então, novamente incubadas por 24 horas com meio de cultura DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino, e após este período a viabilidade celular foi avaliada pelo teste do Azul de Presto, fazendo-se uma comparação entre os grupos.

5.2.6. Avaliação da citotoxicidade *in vivo*

O melanoma foi induzido no flanco direito dos animais (camundongos C57BL6) por uma injeção subcutânea de 2×10^6 células da linhagem B16F10. Após 10 dias, as nanopartículas de ouro, as porfirinas tetrassulfonadas de zinco ou os complexos nanobastões-ftalocianinas foram administrados aos animais (os animais controles receberam mesmo volume de solução de PBS) por via intravenosa (veia caudal). 24 horas depois, os animais foram irradiados com luz a 635 nm (3.82 W cm⁻², 229 J cm⁻²), de acordo com protocolo já seguido no laboratório para PDT com ftalocianinas. Os animais foram eutanasiados em câmara de CO₂ 15 dias após o tratamento, e os tumores foram coletados para análise histológica.

5.2.7. Análise histológica

Após 5 dias do tratamento hipertérmico e/ou fotodinâmico, alguns dos animais foram eutanasiados para que os tumores fossem coletados e embebidos em formalina tamponada 10%. Posteriormente, os tumores foram incluídos em parafina e seccionados com um micrótomo, gerando cortes de 5 μ m, as quais foram fixadas permanentemente em lâminas para microscópio e coradas com Hematoxilina-eosina para análise de microscopia. Cada tumor teve coletadas seis secções de diferentes profundidades. O dano observado foi comparado entre os diferentes grupos.

5.2.8. Análise estatística

A análise de variância Two-way ANOVA foi utilizada, e os intervalos de confiança das médias dos grupos foram comparados de maneira a verificar a significância dos resultados.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1. Experimentos para recobrimento com porfirinas (primeira etapa do trabalho)

6.1.1. Caracterização das nanopartículas sem fotossensibilizador

Após sintetizar as nanopartículas recobertas por CTAB, destinadas ao tratamento hipertérmico do grupo HIPERTERMIA, analisou-se seu espectro de absorção em espectrofotômetro. A figura 14 corresponde à representação gráfica da análise espectrofotométrica, onde podemos observar os duas bandas de absorção características de uma nanopartícula na forma de bastão (cada pico corresponde à ressonância plasmônica de superfície no sentido transversal e longitudinal, respectivamente), porém a intensidade da banda com máximo em 540 nm é indicativa da presença de nanoesferas na suspensão. Além da banda em 540 nm, as nanobarras sintetizadas neste primeiro momento apresentaram outra banda com máximo em 715 nm.

Figura 14. Espectro de absorção UV/VIS dos nanobastões de ouro logo após o procedimento de síntese.

Após o procedimento de centrifugação e lavagem com água esta banda tem sua intensidade diminuída, e os novos espectros de absorção podem ser observados na figura 20. Inicialmente pudemos observar que a síntese de nanobastões foi bem sucedida, obtendo nanobastões com dimensões homogêneas graças à adição de prata no meio de síntese.

6.1.2. Terapia hipertérmica em camundongos portadores de tumor de Ehrlich

Os nanobastões foram utilizados para tratamento de 10 animais do grupo HIPERtermia e observou-se a sobrevida dos animais por 90 dias após a irradiação, comparando-os com animais controle (n=10), os quais receberam solução fisiológica em lugar da solução de nanobastões e foram irradiados nas mesmas condições dos animais experimentais. O aumento médio de temperatura obtido durante o tratamento foi de $7 \pm 0,7^{\circ}\text{C}$. Pôde-se constatar uma maior taxa de sobrevida nos animais tratados hipertermicamente, já que 30% deles sobreviveram até o final do período de observação e dois dos dez animais não apresentaram recrescimento tumoral. A figura 15 mostra os resultados de sobrevida obtidos.

Figura 15. Curva de sobrevida de camundongos portadores de tumor de Ehrlich após tratamento hipertérmico. Cada ponto das curvas representa o número de animais vivos (de acordo com o eixo Y) nos dias que se seguiram após o tratamento (de acordo com o eixo X). Em preto, os animais controle; em vermelho os animais tratados hipertermicamente.

Estes nanobastões foram utilizados para terapia hipertérmica em camundongos *Mus musculus* e, como visto na figura 15, 30% dos camundongos apresentaram remissão completa do tumor após 30 dias de observação. Quando aplicadas *in vitro*, a terapia hipertérmica foi capaz de eliminar 43% das células de melanoma não melanótico, e 49% das células de melanoma melanótico. Camundongos C57BL6 foram tratados hipertermicamente na segunda fase deste trabalho e, apesar de não ter sido observada remissão completa dos melanomas, observou-se, de fato, um retardo no recrescimento tumoral.

6.1.3. Cinética de acúmulo de Photogem® no tumor

Como a ideia inicial a de utilizar um derivado de porfirina para o tratamento fotodinâmico e para recobrimento dos nanobastões, decidiu-se verificar sua cinética de acúmulo no tumor medindo sua fluorescência. Passadas seis horas a partir da administração intraperitoneal de Photogem®, observou-se um aumento na intensidade de fluorescência a partir de 620 nm, e este aumento é ainda mais intenso em 24 horas (Figura 16).

Figura 16. Cinética de acúmulo de Photogem® ($1,0 \text{ mg kg}^{-1}$) no foco tumoral após administração por via intraperitoneal. Em preto, a autofluorescência do tumor, e em vermelho a fluorescência do tumor após a administração de Photogem®.

Se a via de administração é peritumoral, o tumor já evidencia acúmulo significativo de fotossensibilizador em seis horas, sendo esse acúmulo mais acentuado ainda 24 horas após a administração de Photogem®, mais intenso do que o observado por via intraperitoneal, como ilustra a Figura 17. A banda cuja intensidade aumenta em função do tempo corresponde à fluorescência da porfirina acumulada no tumor.

Figura 17. Cinética de acúmulo de Photogem® ($1,0 \text{ mg kg}^{-1}$) no foco tumoral após administração por via peritumoral. Em preto, a autofluorescência do tumor, e em vermelho a fluorescência do tumor após a administração de Photogem®.

6.1.4. Terapia fotodinâmica em camundongos portadores de tumor de Ehrlich

Uma solução de Photogem® foi utilizada para tratamento fotodinâmico de 12 camundongos portando tumor de Ehrlich no dorso. Para isso, foram administrados $1,5 \text{ mg kg}^{-1}$ de fotossensibilizador por via peritumoral e, seis horas depois, irradiou-se o foco tumoral com laser em 630 nm, 150 mW cm^{-1} , por 10 ou por 20 minutos (doses de 90 e 180 J cm^{-1} , respectivamente). Após o tratamento, os animais foram acompanhados por 30 dias para a

verificação do crescimento tumoral. Segundo a figura 18, os animais tratados por 20 minutos apresentaram menor taxa de recrescimento tumoral. É importante ressaltar que três dos seis animais tratados fotodinamicamente por 20 minutos apresentaram completa regressão do tumor. Com base nestes dados, conclui-se que a dose de 180 J cm^{-1} é a mais adequada para a PDT neste modelo.

Figura 18. Crescimento dos tumores após tratamento fotodinâmico utilizando Photogem® ($1,5 \text{ mg kg}^{-1}$, luz em 630 nm e doses de 90 J cm^{-1} para animais tratados por 10 minutos, e de 180 J cm^{-1} para animais tratados por 20 minutos).

6.1.5. Cinética de acúmulo de porfirina tetrassulfonada (TPPS₄) no tumor

Pelas dificuldades em recobrir os nanobastões de ouro com a porfirina sem carga em sua estrutura, decidiu-se utilizar uma porfirina tetrassulfonada de zinco para este fim, já que este composto apresenta cargas negativas em sua estrutura que poderiam se complexar ionicamente com o amônio quaternário do brometo de cetiltrimetilamônio. Inicialmente foi investigado seu acúmulo no sítio tumoral, assim como com a porfirina, porém a via de administração nos animais foi endovenosa, segundo os protocolos de terapia fotodinâmica realizados no Laboratório de Biofotônica do Instituto de Física de São Carlos. Após cinco

horas da administração de fotossensibilizador, foi constatado o aparecimento de um pico de fluorescência em 647 nm, que perdura até 24 horas (figura 19).

Figura 19. Cinética de acúmulo de porfirina tetrassulfonada ($1,0 \text{ mg kg}^{-1}$) no foco tumoral após administração por via endovenosa. Em preto, a autofluorescência do tumor, e em vermelho a fluorescência do tumor após a administração de TPPS4.

6.1.6. Recobrimento dos nanobastões por porfirinas

Quando o espectro de absorção da solução aquosa de porfirina entre 200 e 900 nm é analisado, observa-se a banda de Soret (pico que revela absorção mais intensa no espectro de luz) em torno de 417 nm, e mais outras bandas de absorção de menor intensidade, denominadas de bandas Q, em 514, 551, 578 e 633 nm, como pode ser visto na figura 19. Quando a porfirina é adicionada à solução de nanobastões de ouro, vê-se a contribuição das bandas Q para o espectro de absorção das nanopartículas na região entre 500 e 600 nm, bem como o aparecimento de um pico em 417 nm correspondente à banda de Soret. Porém, se as

nanopartículas contendo porfirina são centrifugadas, as evidências da presença do fotossensibilizador desaparecem, principalmente a banda de Soret (região apontada pela seta verde na figura 20), levando à conclusão de que as porfirinas não continuam aderidas após a centrifugação em 9000 rpm.

Figura 20. Espectro de absorção de solução aquosa de TPPS₄ e solução aquosa de nanobastões com porfirina. A seta verde indica onde a contribuição da banda de Soret da ftalocianina deixa de aparecer no espectro das nanobarras.

Para confirmar a ausência de porfirina nos nanobastões, foi verificada a fluorescência da solução aquosa de fotossensibilizador, da solução de nanobastões não centrifugada e da solução de nanobastões centrifugada. A figura 21 mostra que os picos de fluorescência característicos da TPPS₄ em 647 e 710 nm desaparecem após a centrifugação dos nanobastões.

Figura 21. Espectros de fluorescência de solução aquosa de TPPS₄ e de soluções de nanobastões conjugados com porfirina (excitação de 360 a 1050 nm).

6.1.7. Taxa de fotodegradação de porfirina tetrassulfonada de zinco

Para descartar a hipótese de que o recobrimento estava sendo comprometido em razão de uma possível agregação excessiva do fotossensibilizador em meio aquoso, decidiu-se realizar o teste de fotodegradação da porfirina TPPS₄. Foram utilizadas duas concentrações de porfirina tetrassulfonada, uma vez que se espera que em uma concentração maior haja maior agregação, caso ela realmente aconteça. A taxa de fotodegradação foi avaliada durante uma hora nas concentrações de 1 ou 2 x 10⁻⁶ µg mL⁻¹. Os valores encontrados para a taxa de fotodegradação, a partir dos coeficientes de regressão linear dos pontos obtidos, foram C₁ = 5,45 x 10⁻⁹ com R² = 0,99874 (para a menor concentração) e C₂ = 6,07 x 10⁻⁹ com R² = 0,99814 (figura 22).

Como a cinética de degradação (representada pelos valores de C₁ e C₂) e os coeficientes encontrados foram muito parecidos, depreende-se que não havia agregação significativa do fotossensibilizador, mesmo na concentração mais alta. Desta forma, a agregação não foi a responsável pelo insucesso do recobrimento das nanobarras por porfirina.

Figura 22: Taxa de fotodegradação de porfirina tetrassulfonada de zinco em solução aquosa com 0,2% de surfactante Tween 80, concentrações de 1,0 e 2,0 x 10⁻⁶ µg mL⁻¹.

Visto que não se obteve êxito na síntese de nanobastões recobertos por porfirinas, decidiu-se por investigar o recobrimento deles por ftalocianinas tetracarboxiladas. Os resultados estão descritos a seguir.

6.2. Recobrimento com ftalocianinas tetracarboxiladas de zinco

6.2.1. Recobrimento dos nanobastões por ZnTcPc e ZnTcPc-G

O espectro de absorção dos nanobastões de ouro e das ftalocianinas foram analisados imediatamente após o procedimento de formação dos complexos, e após a centrifugação para remover o excesso de fotossensibilizadores não aderidos. As absorbâncias em 686 nm (a banda mais alta no espectro de absorção dos fotossensibilizadores ZnTcPc e ZnTcPc-G) foram analisadas também no sobrenadante após a centrifugação, e foram comparadas com a absorbância das soluções de ftalocianinas para a obtenção da porcentagem de formação de complexos nanobastões-ftalocianinas. De acordo com as absorbâncias normalizadas e os coeficientes de extinção de cada composto em 686 nm, pôde-se chegar a uma estimativa da porcentagem de ftalocianinas que se aderiram às nanobarras.

O recobrimento da superfície dos nanobastões por ftalocianinas foi mais efetivo para ZnTcPC (80% das moléculas recobriram os nanobastões) em comparação a ZnTcPc-G (20% de recobrimento). Isso ocorreu, provavelmente, em virtude da presença de grupamentos aniônicos (carboxilas) nas moléculas de ftalocianinas, os quais formam complexos iônicos com os grupamentos catiônicos recobrimo a superfície dos nanobastões (o nitrogênio quaternário do brometo de cetiltrimetilamônio, ou CTAB), enquanto que os grupamentos catiônicos da metilglucamina presente na ftalocianina ZnTcPc-G não interagem de maneira eficiente com o CTAB. As figuras 23 e 24 ilustram os espectros de absorção obtidos e as absorbâncias em 686 nm. Em 686 nm, a absorbância medida no sobrenadante dos nanobastões recobertos por ZnTcPc-G foi de 0,516. Ela pode ser comparada a medidas feitas com concentrações conhecidas do fotossensibilizador. Por exemplo, em 686 nm, a absorbância medida para $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ de ZnTcPc-G foi de 0,650.

Em 686 nm, a absorbância medida no sobrenadante dos nanobastões recobertos por ZnTcPc foi de 0,124. Ela pode ser comparada a medidas feitas com concentrações conhecidas deste fotossensibilizador. Por exemplo, em 686 nm, a absorbância medida para $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ foi de 0,650. A tabela 1 sintetiza os dados para mais fácil observação.

Tabela 1. Valores de absorbância em 686 nm encontrados para os fotossensibilizadores em concentração conhecida ($10 \mu\text{mol L}^{-1}$) e para os sobrenadantes das nanobarras recobertas por fotossensibilizador.

Amostra	Absorbância (686 nm)
Ftalocianina tetracarboxilada de zinco (Z) $10 \mu\text{mol L}^{-1}$	0,650
Ftalocianina tetracarboxilada metilglucaminada de zinco (G) $10 \mu\text{mol L}^{-1}$	0,650
Sobrenadante dos nanobastões com Z	0,124
Sobrenadante dos nanobastões com G	0,516

Figura 23. Espectro de absorção dos nanobastões de ouro, ftalocianina tetracarboxilada metilglucaminada de zinco (ZnTcPc-G) e dos complexos nanobastões-ftalocianinas (antes e depois da centrifugação), bem como dos sobrenadantes. ● ZnTcPc-G; ● Nanobastões recobertos por ZnTcPc-G não centrifugados; ● Nanobastões recobertos por ZnTcPc-G centrifugados; ● Sobrenadante da suspensão de nanobastões + ZnTcPc-G; ● Nanobastões

Figura 24. Espectro de absorção dos nanobastões de ouro, ftalocianina tetracarboxilada de zinco (ZnTcPc) e dos complexos nanobastões-ftalocianinas (antes e depois da centrifugação), bem como dos sobrenadantes. ● ZnTcPc; ● Nanobastões recobertos por ZnTcPc não centrifugados; ● Nanobastões recobertos por ZnTcPc centrifugados; ● Sobrenadante da suspensão de nanobastões + ZnTcPc; ● Nanobastões

A morfologia dos nanobastões não foi alterada após o processo de recobrimento com ftalocianinas. Com o auxílio do Software Image J pudemos analisar as dimensões das nanopartículas. O tamanho médio dos nanobastões foi de $51 \pm 9,4$ nm de comprimento e $6 \pm 0,8$ nm de diâmetro, ao passo que os nanobastões recobertos por ftalocianina tetracarboxilada metilglucaminada de zinco foi de $56,4 \pm 10,6$ nm de comprimento e $6 \pm 1,6$ nm de diâmetro. Por fim, os nanobastões recobertos por ftalocianina tetracarboxilada de zinco apresentaram em média $57,5 \pm 6,0$ nm de comprimento e $5 \pm 1,5$ nm de diâmetro. As imagens de 25 a 30 são eletromicrografias de transmissão dos nanobastões com ou sem recobrimento por ftalocianinas.

3666-NR2-18000x-2.tif
3666-NR2-18000x-2
Cal: 0.73046 nm/pix
3:13:41 p 02/24/15

100 nm
HV=80.0kV
Direct Mag: 18000x
AMT Camera System

Figura 25. Imagem de microscopia eletrônica de transmissão (TEM) de nanobastões de ouro sem recobrimento por fotossensibilizador. A barra preta representa 100 nm. Aumento de 18.000 X. HV = 80,0 kV

3666-G-18000x-3.tif
3666-G-18000x-3
Cal: 0.73046 nm/pix
2:43:13 p 02/24/15

100 nm
HV=80.0kV
Direct Mag: 18000x
AMT Camera System

Figura 26. Imagem de microscopia eletrônica de transmissão (MET) de nanobastões de ouro recobertas por ZnTcPc-G. A barra preta representa 100 nm. Aumento de 18.000 X. HV = 80,0 kV

3666-Z-18000x-1B.tif
3666-Z-18000x-1B
Cal: 0.73046 nm/pix
2:50:30 p 02/24/15

100 nm
HV=80.0kV
Direct Mag: 18000x
AMT Camera System

Figura 27. Imagem de microscopia eletrônica de transmissão (MET) de nanobastões de ouro recobertos por ZnTcPc. A barra preta representa 100 nm. Aumento de 18.000 X. HV = 80,0 kV

3666-NR2-46000x-2.tif
3666-NR2-46000x-2
Cal: 0.285878 nm/pix
3:14:50 p 02/24/15

100 nm
HV=80.0kV
Direct Mag: 46000x
AMT Camera System

Figura 28. Imagem de microscopia eletrônica de transmissão (MET) de nanobastões de ouro sem recobrimento por fotossensibilizador. A barra preta representa 100 nm. Aumento de 46.000 X. HV = 80,0 kV

3666-G-46000x-3.tif
3666-G-46000x-3
Cal: 0.285878 nm/pix
2:44:19 p 02/24/15
100 nm
HV=80.0kV
Direct Mag: 46000x
AMT Camera System

Figura 29. Imagem de microscopia eletrônica de transmissão (MET) de nanobastões de ouro recobertos por ZnTcPc-G. A barra preta representa 100 nm. Aumento de 46.000 X. HV = 80,0 kV

3666-Z-46000x-1.tif
3666-Z-46000x-1
Cal: 0.285878 nm/pix
2:51:49 p 02/24/15
100 nm
HV=80.0kV
Direct Mag: 46000x
AMT Camera System

Figura 30. Imagem de microscopia eletrônica de transmissão (MET) de nanobastões de ouro recobertos por ZnTcPc. A barra preta representa 100 nm. Aumento de 46.000 X. HV = 80,0 kV.

6.2.2. Geração de oxigênio singlete por ZnTcPc e ZnTcPc-G acopladas ou não a nanobastões

O teste para a detecção de oxigênio singlete com o kit comercial (Molecular Probes) revelou que a geração dessa espécie reativa pelas ftalocianinas em solução é baixa, porém semelhante entre os dois fotossensibilizadores. Porém, ao serem acopladas aos nanobastões, essa geração é aumentada em torno de três vezes. Assim sendo, tanto ZnTcPc quanto ZnTcPc-G passam a agir mais intensamente por um mecanismo do tipo 1. Como esperado, não houve geração de oxigênio singlete pelos nanobastões que não foram recobertos por ftalocianinas. A figura 31 mostra os resultados do teste usando a sonda molecular SOSG para detecção de oxigênio singlete.

Figura 31. Comparação entre a geração de oxigênio singlete dos nanobastões de ouro recobertos somente por CTAB, somente os fotossensibilizadores ZnTcPc e ZnTcPc-G, além dos complexos nanobastões-ftalocianinas. A dose de luz utilizada foi de 1 J cm^{-2} .

6.2.3. Geração de radical hidroxil por ZnTcPc e ZnTcPc-G acopladas ou não a nanobastões

O teste para a detecção de radical hidroxil com o kit comercial (Molecular Probes) revelou que a geração desse radical livre pelas ftalocianinas em solução é intensa, porém o fotossensibilizador ZnTcPc-G livre apresenta apenas metade da eficiência em comparação a ZnTcPc. Há uma diminuição na geração de radical hidroxil por parte de ZnTcPc quando esta ftalocianina é acoplada às nanobarras. O oposto ocorre com a ftalocianina glucaminada (ZnTcPc-G), de modo que a geração de radical hidroxil por ambas ftalocianinas conjugadas aos nanobastões por mecanismo do tipo I apresenta a mesma eficiência. Como esperado, não houve geração de radical livre pelos nanobastões que não foram recobertos por fotossensibilizador. A figura 32 mostra os dados do teste utilizando a sonda molecular HPF para a detecção de radicais hidroxil e peroxil.

Figura 32. Comparação entre a geração de radicais hidroxil dos nanobastões recobertos somente por CTAB, dos fotossensibilizadores ZnTcPc e ZnTcPc-G, e dos complexos nanobastões-ftalocianinas. A dose de luz utilizada foi de 1 J cm^{-2} .

O complexo com ZnTcPc gerou cerca de 30% menos radicais hidroxil do que o fotossensibilizador sozinho, enquanto que o complexo com ZnTcPc-G gerou 34% mais radicais do que o fotossensibilizador sozinho.

No que se refere à ação fotodinâmica dos fotossensibilizadores utilizados, aparentemente, o mecanismo de ação é parcialmente modificado, partindo de um mecanismo do tipo I (geração de radicais hidroxil, peroxinitrito e superóxido através de transferência de elétrons do fotossensibilizador excitado para o oxigênio molecular ou para outras biomoléculas) para um mecanismo do tipo II (geração de oxigênio singlete através de transferência de energia do fotossensibilizador excitado para o oxigênio molecular). Isso ocorre mais evidentemente com a ftalocianina que não possui grupamentos metilglucamina (ZnTcPc). Esta, em seu estado livre, age de maneira marcante por mecanismo do tipo I, mas esta ação é diminuída após a adesão à superfície dos nanobastões de ouro, enquanto que a geração de oxigênio singlete pelo mecanismo do tipo II é significativamente aumentada. Com relação à ftalocianina metilglucaminada (ZnTcPc-G) não apresenta um forte mecanismo de ação do tipo I como ZnTcPc, porém este mecanismo é aumentado, tanto quanto a ação por mecanismo do tipo II, após a adesão à superfície dos nanobastões de ouro.

6.2.4. Terapias fotodinâmica e hipertérmica *in vitro*

Os resultados da PDT *in vitro* foram similares nas duas linhagens celulares utilizadas. Foi observada certa toxicidade no escuro com os nanobastões de ouro (com ou sem ftalocianinas aderidas), provavelmente por haver algum resquício de CTAB livre no meio. Os nanobastões por si só foram capazes de eliminar 43% das células de melanoma não melanótico (B16G4F) e 49% das células de melanoma melanótico (B16F10) após irradiação com 20 J com luz em comprimento de onda de 635 nm (houve um aumento de 6°C na temperatura do meio de cultura durante a irradiação).

Quando os fotossensibilizadores foram aderidos aos nanobastões, a viabilidade celular decresceu para 9% na linhagem B16G4F, e para 5% na linhagem B16F10, em comparação com os controles. É evidente que os complexos de nanobastões de ouro com ftalocianinas são mais eficientes do que os nanobastões sozinhos.

Um resultado intrigante foi a maior vulnerabilidade das células melanóticas ao tratamento hipertérmico, mesmo a despeito de apresentarem grande quantidade de melanina, a qual poderia absorver boa parte da radiação e interferir no sucesso da terapia. As figuras 33 e 34 mostram os resultados obtidos com a viabilidade celular usando Azul de Presto após a PDT.

Figura 33. Resultados do teste de viabilidade celular por Azul de Presto para células da linhagem B16G4F, 12 horas após a PDT utilizando luz em 635 nm, 20 J cm⁻². Todos os grupos apresentam diferença estatística em relação aos controles.

Figura 34. Resultados do teste de viabilidade celular por Azul de Presto para células da linhagem B16F10, 12 horas após a PDT utilizando luz em 635 nm, 20 J cm⁻². Todos os grupos apresentam diferença estatística em relação aos controles.

6.2.5. Terapias fotodinâmica e hipertérmica *in vivo*

O aumento da eficácia da PDT depende também da sequência em que a hipertermia é aplicada. Em outras palavras, se aplicada imediatamente após a PDT, a hipertermia age sinergicamente com este tratamento, levando a maior taxa de morte celular. Além disso, o tempo de exposição ao tratamento também é importante. Quando um intervalo a 37°C é introduzido entre os dois tratamentos, essa ação sinérgica tende a desaparecer, enquanto que a citotoxicidade máxima é atingida quando não há nenhum intervalo entre os tratamentos (BAKER et al., 2001; ROZANOVA; ZHANG, 2009).

Com nosso tratamento em animais, conseguiu-se remissão completa nos tumores de dois dos cinco camundongos tratados com nanopartículas de ouro complexadas com ZnTcPc-G, enquanto que os outros três camundongos deste grupo tiveram a crescimento desacelerado.

Só foi possível tratarmos dois camundongos com os complexos nanobastões-ZnTcPc, em virtude de os outros 3 camundongos administrados com a suspensão destes complexos morreram minutos após a injeção pela veia caudal. Foi notada uma certa dificuldade de respiração nestes animais, o que indica que os complexos podem estar se agregando facilmente e acumulando nos capilares alveolares, propiciando um quadro de embolia pulmonar, como já foi observado em experimentos anteriores em nosso laboratório.

Um dos camundongos tratados com o complexo nanobastões-ZnTcPc teve seu tumor completamente eliminado durante os 15 dias de observação, após o procedimento das terapias hipertérmica e fotodinâmica. O outro animal teve o crescimento tumoral significativamente retardado.

O resultado obtido com os camundongos tratados com os fotossensibilizadores por si, ou com os nanobastões sem recobrimento por ftalocianinas, não foi tão bom quanto o observado para os complexos. Não houve eliminação total dos tumores, apesar de que o crescimento tumoral foi retardado na maioria das vezes em comparação aos controles. As próximas figuras ilustram exemplos dos camundongos antes e após os tratamentos (figuras 35 a 43).

Figura 35. Tumor melanótico de um animal antes dos tratamentos fotodinâmico e hipertérmico.

Figura 36. Tumor melanótico de um animal controle 15 dias após a irradiação dos grupos experimentais. O tumor apresenta grande volume e mostra áreas de necrose e ulceração no centro.

Figura 37. Tumor melanótico de um animal tratado com PDT utilizando ZnTcPc, quinze dias após o tratamento. O tumor apresenta volume menor em comparação com os animais controle, mas ainda está crescendo.

Figura 38. Tumor melanótico de um animal tratado com PDT utilizando ZnTcPc-G, quinze dias após o tratamento. O tumor apresenta volume menor em relação aos controles, mas ainda está crescendo.

Figura 39. Tumor melanótico de um camundongo tratado hipertermicamente com nanobastões, quinze dias após o tratamento. O tumor apresenta volume menor em comparação aos animais controles, mas ainda está crescendo.

Figura 40. Região onde foi implantado o tumor melanótico em um animal tratado com nanobastões de ouro recobertas por ZnTcPc, quinze dias após a irradiação. Não houve volume tumoral mensurável neste tempo.

Figura 41. Outro ângulo de visão do camundongo mostrado na figura anterior: região onde foi implantado o melanoma melanótico em um animal tratado com nanobastões recobertos por ZnTcPc, quinze dias após o tratamento. Não houve volume tumoral mensurável neste tempo.

Figura 42. Região onde foi implantado melanoma melanótico em um animal tratado com nanobastões de ouro recobertos por ZnTcPc-G, quinze dias após a irradiação. Não houve volume tumoral mensurável neste tempo.

Figura 43. Outro ângulo de visão do camundongo mostrado na figura anterior: área onde foi implantado melanoma melanótico em camundongo tratado com nanobastões recobertos por ZnTcPc-G, quinze dias após a irradiação. Não houve volume tumoral mensurável neste tempo.

O aspecto do melanoma melanótico (linhagem B16F10) ao microscópio óptico é caracterizado por grande quantidade de células de caráter mais basofílico e algumas áreas de necrose de aspecto eosinofílico. Grânulos de melanina podem ser vistos ao redor do núcleo das células, e certa atipia celular pode ser vista ao longo das lâminas. A figura 44 mostra uma fotomicrografia de um tumor controle (não recebeu nanobastões ou fotossensibilizador, mas foi irradiado com luz em 635 nm, 3.82 W cm^{-2} , 229 J cm^{-2}) aumentado 100 vezes, enquanto a figura 45 mostra o mesmo tumor, porém em aumento de 400 vezes.

Quando os tumores são tratados fotodinamicamente utilizando a ftalocianina tetracarboxilada de zinco (ZnTcPc), o dano ocorre nas regiões mais superficiais, sendo mais profundo na região onde o centro do feixe incide e mais superficial nas regiões mais periféricas, uma vez que o centro do feixe de luz apresenta maior energia do que as laterais.

O mesmo perfil pode ser observado para os tumores tratados fotodinamicamente utilizando a ftalocianina com metil-glucamina (ZnTcPc-G). Apesar de ocorrerem danos, são insuficientes para a completa remissão dos tumores induzidos nos camundongos. As figuras 46 e 47 mostram as fotomicrografias de tumores após a PDT utilizando ZnTcPc, e as figuras 48 e 49 mostram as fotomicrografias de tumores após a PDT utilizando ZnTcPc-G.

Figura 44. Fotomicrografia de um tumor de animal controle com aumento de 100 vezes, mostrando uma área necrótica eosinofílica ao centro (N) e grande quantidade de células de melanoma basofílicas ao redor (M).

Figura 45. Fotomicrografia de um tumor de animal controle com aumento de 400 vezes, mostrando uma área necrótica eosinofílica à direita (N) e grande quantidade de células de melanoma basofílicas à esquerda (M).

Figura 46. Fotomicrografia de região central de um tumor de animal tratado com PDT utilizando ZnTcPc com aumento de 100 vezes, mostrando uma extensa área necrótica eosinofílica formada após 5 dias da terapia.

Figura 47. Fotomicrografia de um tumor de animal tratado com PDT utilizando ZnTcPc com aumento de 400 vezes, mostrando uma extensa área necrótica eosinofílica formada após 5 dias da terapia.

Figura 48. Fotomicrografia de um tumor de animal tratado com PDT utilizando ZnTcPc-G com aumento de 100 vezes, mostrando uma extensa área necrótica eosinofílica formada após 5 dias da terapia.

Figura 49. Fotomicrografia de um tumor de animal tratado com PDT utilizando ZnTcPc-G com aumento de 400 vezes, mostrando uma área necrótica eosinofílica formada após 5 dias da terapia.

Quando os tumores foram tratados hipertermicamente com auxílio de nanobastões de ouro, os danos observados na histologia são mais profundos do que os observados para a terapia fotodinâmica. Ao que parece, o aumento de 5°C foi propagado a regiões mais profundas do tumor e foi suficiente para causar danos em maior intensidade do que a PDT. No entanto, os tumores voltaram a crescer após a hipertermia, apesar de o crescimento ter sido mais lento. As figuras 50 e 51 mostram exemplos fotomicrografias de um tumor de camundongo tratado hipertermicamente.

Nos animais tratados com ambas terapias com auxílio das nanopartículas de ouro complexadas com fotossensibilizadores e cujos tumores foram analisados histologicamente, os danos observados foram maiores e mais profundos do que os observados para os nanobastões sozinhos. Alguns dos tumores analisados mostraram somente necrose na lâmina, o que indica ablação completa, ou praticamente completa, após a terapia conjunta. Se células viáveis eram encontradas ao analisar as lâminas, essas estavam ao redor de vasos sanguíneos. Os resultados foram semelhantes tanto para nanobastões recobertos por ZnTcPc quanto por ZnTcPc-G, como pode ser visto nas figuras 52 a 55.

Figura 50. Fotomicrografia de um tumor de animal tratado hipertermicamente utilizando anobarras, com aumento de 100 vezes, mostrando uma extensa área necrótica eosinofílica formada após 5 dias da terapia.

Figura 51. Fotomicrografia de um tumor de animal tratado hipertermicamente utilizando nanobastões de ouro, com aumento de 400 vezes, mostrando uma área necrótica eosinofílica e algumas áreas de congestão sanguínea formadas após 5 dias da terapia.

Nossos resultados estão de acordo com dados disponíveis na literatura, onde autores utilizaram o fotossensibilizador Indocianina *Green* (ICG) aderido a nanobastões de ouro (partículas já caracterizadas como agentes fototérmicos), e investigaram sua ação fotodinâmica. Os resultados mostram que os nanobastões conjugados com ICG produzem maior quantidade de oxigênio singlete que o fotossensibilizador sozinho, mostrando que são mais eficazes. Isso ocorre possivelmente pelo aumento de cruzamentos intersistema e do rendimento para o estado triplete do fotossensibilizador (o que lhe garante maior fotoestabilidade). A temperatura das células tumorais chegou a 46°C durante o tratamento, uma temperatura ótima para induzir morte celular por hipertermia. Como não houve degradação aparente do fotossensibilizador, os nanobastões conjugados com ICG mostram-se como partículas eficazes e estáveis para serem utilizadas em tratamentos *in vivo* (KUO et al., 2010). O mesmo mecanismo de ação proposto pelos autores pode ser o responsável pelos resultados observados em nossos experimentos.

Há evidências na literatura que também indicam um aumento da produção de oxigênio singlete após adesão em superfícies metálicas. Os estudos indicam que a fotodegradação do

fotossensibilizador (a auto-oxidação do fotossensibilizador pelas espécies reativas que ele próprio gerou) é diminuída quando o fotossensibilizador está aderido ao substrato. Além disso, os plasmons de superfície dos nanobastões de ouro podem, de alguma maneira, contribuir para a doação de energia ou de elétrons para os fotossensibilizadores, levando a uma geração de espécies reativas mais eficiente (KAH et al., 2008).

O sinergismo decorrente da interação das duas intervenções terapêuticas pode ser explicado, por exemplo, porque os tratamentos individuais tendem a ser insuficientes para desencadear a morte das células tumorais de forma significativa, mas se realizados em conjunto, aumentam o dano celular e podem levar a intensa morte celular. Além disso, a energia térmica gerada pelas nanopartículas irradiadas é capaz de acelerar a geração de espécies reativas de oxigênio, principalmente o oxigênio singlete (KAH et al., 2008).

Figura 52. Fotomicrografia de um tumor de animal tratado com hipertermia e PDT utilizando nanobastões recobertos por ZnTcPc-G com aumento de 100 vezes, mostrando uma extensa área necrótica eosinofílica formada após 5 dias da terapia.

Figura 53. Fotomicrografia de um tumor de animal tratado com hipertermia e PDT utilizando nanobastões recobertos por ZnTcPc-G com aumento de 400 vezes, mostrando uma extensa área necrótica eosinofílica formada após 5 dias da terapia.

Figura 54. Fotomicrografia de um tumor de animal tratado com hipertermia e PDT utilizando nanobastões recobertos por ZnTcPc (aumento de 100 vezes), mostrando uma extensa área necrótica eosinofílica formada após 5 dias da terapia.

Figura 55. Fotomicrografia de um tumor de animal tratado com hipertermia e PDT utilizando nanobastões recobertos por ZnTcPc com aumento de 400 vezes, mostrando uma extensa área necrótica eosinofílica formada após 5 dias da terapia.

Vários estudos demonstram que a hipertermia imediatamente após a terapia fotodinâmica (PDT) aumenta a eficácia deste tratamento. Isso acontece, provavelmente, porque a PDT inibe o sistema de reparo celular para a termoinativação e/ou a hipertermia inibe o sistema de reparo celular em resposta à PDT. Assim, há um efeito sinérgico, já que a PDT induz danos mitocondriais enquanto que a hipertermia danifica organelas como o núcleo e a membrana celular, que não são danificadas pelo oxigênio singlete produzido pela mitocôndria (MANG, 1990; YANASE et al., 2009).

Estudos revelam que os tratamentos agem de forma sinérgica quando a hipertermia é aplicada após doses curativas de radiação durante o tratamento hipertérmico. Porém, não há interação entre os tratamentos quando as doses de radiação e de calor são ambas subcurativas. Ainda, os resultados indicam que um tratamento hipertérmico mais suave pode potencializar os efeitos de uma dose alta de radiação usada na terapia fotodinâmica. O aumento da dose de radiação na PDT pode ser compensado pela diminuição na concentração de fotossensibilizador utilizada, diminuindo os efeitos deletérios da terapia. Estes resultados, juntamente com o fato de que maiores taxas de cura e maior profundidade de necrose são alcançadas pela combinação de PDT e terapia hipertérmica, sem prejuízo para os tecidos normais adjacentes, indicam o potencial clínico dessa modalidade de tratamento (WALDOW et al., 1987).

Utilizamos Photogem® para tratamento fotodinâmico de camundongos portadores de tumor de Ehrlich, e após 20 minutos de irradiação, os danos nos tumores foram significativos, de modo que o recrescimento tumoral só foi evidente após vários dias. Quando utilizamos ftalocianinas para PDT *in vitro*, a morte celular foi irrisória para ambos fotossensibilizadores testados (ZnTcPc e ZnTcPc-G), indicando uma baixa eficácia destes compostos neste modelo, principalmente o fotossensibilizador mais hidrofílico (ZnTcPc-G, em virtude dos grupamentos metil-glucamina). Quanto ao tratamento *in vivo*, um dano superficial pôde ser observado nos melanomas coletados de camundongos 5 dias após o tratamento, e o dano foi análogo para ambos os compostos.

8. CONCLUSÃO

Neste trabalho, investigamos a aplicação simultânea da terapia hipertérmica e da terapia fotodinâmica. Testamos o recobrimento por porfirinas, porém não logramos êxito neste intento. O recobrimento somente foi satisfatório quando utilizamos ftalocianinas carregadas negativamente (uma ftalocianina tetracarboxilada e sem grupamentos adicionais, e outra ftalocianina tetracarboxilada e com grupamentos metil-glucamina para aumentar a solubilidade). A ftalocianina sem grupamentos adicionais teve maior sucesso no recobrimento dos nanobastões, provavelmente pela maior quantidade de cargas negativas disponíveis para interagirem com as cargas positivas da bicamada de brometo de cetiltrimetilamônio recobrindo as nanopartículas.

Quando utilizadas tanto *in vitro* quanto *in vivo*, os resultados foram muito satisfatórios. De fato, houve efeito sinérgico em comparação com os tratamentos hipertérmico e fotodinâmico separados. A linhagem tumoral não melanótica, B16G4F, mostrou-se mais resistente aos tratamentos, porém a despeito disso teve sua viabilidade diminuída para apenas 9% nos testes *in vitro*, enquanto que as células da linhagem B16F10 tiveram sua viabilidade diminuída para apenas 5%, apesar de serem melanóticas. Os tumores *in vivo* foram intensamente danificados pelo tratamento simultâneo, chegando a atingir remissão completa em alguns casos apesar da baixa dose de luz e da baixa concentração de fotossensibilizadores.

Ainda, pudemos observar uma mudança nos mecanismos de ação dos fotossensibilizadores quando são acoplados à superfície das nanopartículas. Aparentemente, o mecanismo de ação dos fotossensibilizadores é parcialmente modificado, partindo de um mecanismo do tipo I (geração de radicais hidroxil, peroxinitrito e superóxido através de transferência de elétrons do fotossensibilizador excitado para o oxigênio molecular ou para outras biomoléculas) para um mecanismo do tipo II (geração de oxigênio singlete através de transferência de energia do fotossensibilizador excitado para o oxigênio molecular). Isso ocorre mais evidentemente com a ftalocianina que não possui grupamentos metilglucamina (ZnTcPc). Esta, em seu estado livre, age de maneira marcante por mecanismo do tipo I, mas esta ação é diminuída após a adesão à superfície dos nanobastões de ouro, enquanto que a geração de oxigênio singlete pelo mecanismo do tipo II é significativamente aumentada. Com relação à ftalocianina metilglucaminada (ZnTcPc-G) não apresenta um forte mecanismo de

ação do tipo I como ZnTcPc, porém este mecanismo é aumentado, tanto quanto a ação por mecanismo do tipo II, após a adesão à superfície dos nanobastões de ouro.

9. CONTINUIDADE DO TRABALHO

Quanto à continuidade deste trabalho, a solubilidade plasmática dos complexos nanobastões-ftalocianinas deve ser melhorada. Isso pode ser feito por encapsulamento em lipossomas, por exemplo, e estes podem ter anticorpos específicos aderidos à superfície para aumentar a especificidade do tratamento. Outros fotossensibilizadores mais eficazes podem ser testados para a adesão às nanobastões, de modo a aumentar ainda mais a eficiência da terapia conjunta. Por fim, mais repetições *in vivo* devem ser feitas, com mais linhagens tumorais, para ver a abrangência destes tratamentos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AFSHAR, R. Gold nanorods□: Synthesis and self assembly. 2007.

ALLEN, R. G.; TRESINI, M. Oxidative stress and gene regulation. **Free radical biology & medicine**, v. 28, n. 3, p. 463–99, 1 fev. 2000.

ALLISON, R. et al. Photodynamic therapy of the intact breast. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 3, n. 3, p. 139–146, 2006.

AMENDOLA, V. Surface plasmon resonance of silver and gold nanoparticles in the proximity of graphene studied using the discrete dipole approximation method. **Phys. Chem. Chem. Phys.**, v. 18, n. 3, p. 2230–2241, 2016.

BAKER, J. R. et al. The Synthesis and Testing of Anti-Cancer Therapeutic Nanodevices. **Biomedical Microdevices**, v. 3, n. 1, p. 61–69, 2001.

BAZYLIŃSKA, U. et al. Nanoemulsion-templated multilayer nanocapsules for cyanine-type photosensitizer delivery to human breast carcinoma cells. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 47, n. 2, p. 406–420, 2012.

BERGAMI-SANTOS, P. C.; MARIANO, M.; BARBUTO, J. A. M. Dual role of polymorphonuclear neutrophils on the growth of Ehrlich ascites tumor (EAT) in mice. **Life sciences**, v. 75, n. 2, p. 245–55, 28 maio 2004.

BREWIS, M. et al. Phthalocyanine-centred aryl ether dendrimers with oligo(ethyleneoxy) surface groups. **Tetrahedron Letters**, v. 42, n. 5, p. 813–816, jan. 2001.

BROWN, J.; BROWN, S.; VERNON, D. Photodynamic therapy: new light on cancer treatment. **Journal of the Society of Dyers and ...**, v. 115, n. c, p. 249–253, 1999.

BULLIVANT, J. P. Stable Superparamagnetic Ferrofluids for the Treatment of Secondary Liver Cancer By Hyperthermia. 2008.

CARLSON, J. A. et al. Mixed mesodermal sarcoma of the ovary. Treatment with combination radiation therapy and chemotherapy. **Cancer**, v. 52, n. 8, p. 1473–7, 15 out. 1983.

COGNO, I. S. et al. Optimization of photodynamic therapy response by survivin gene knockdown in human metastatic breast cancer T47D cells. **Journal of photochemistry and photobiology. B, Biology**, v. 104, n. 3, p. 434–43, 2011.

COHEN, G. M. Caspases: the executioners of apoptosis. **The Biochemical journal**, v. 326 (Pt 1, p. 1–16, 15 ago. 1997.

COMPTON, M. M. A biochemical hallmark of apoptosis: internucleosomal degradation of the genome. **Cancer metastasis reviews**, v. 11, n. 2, p. 105–19, set. 1992.

DAGLI, M. L. Z. D.; GUERRA, J. L.; SALDIVA, P. H. N. S. An experimental study on the lymphatic dissemination of the solid ehrlich tumor in mice. **Brazilian Journal of Veterinary**

Research and Animal Science, p. 97–102, 1992.

DE FREITAS, L. F. et al. *In vivo* photothermal tumour ablation using gold nanorods. **Laser Physics**, v. 23, n. 6, p. 066003, 2013.

DEBATIN, K. Activation of apoptosis pathways by anticancer treatment. **Toxicology letters**, v. 112-113, p. 41–8, 15 mar. 2000.

DUNN, S. R. et al. Heat stress induces different forms of cell death in sea anemones and their endosymbiotic algae depending on temperature and duration. **Cell Death and Differentiation**, v. 11, n. 11, p. 1213–1222, 30 nov. 2004.

EDÉN, E. et al. Glucose flux in relation to energy expenditure in malnourished patients with and without cancer during periods of fasting and feeding. **Cancer research**, v. 44, n. 4, p. 1718–24, abr. 1984.

EISCHEN, C. M. et al. Comparison of apoptosis in wild-type and Fas-resistant cells: chemotherapy-induced apoptosis is not dependent on Fas/Fas ligand interactions. **Blood**, v. 90, n. 3, p. 935–43, 1 ago. 1997.

FALCONER, H. et al. Ovarian Cancer Risk After Salpingectomy: A Nationwide Population-Based Study. **JNCI Journal of the National Cancer Institute**, v. 107, n. 2, p. dju410–dju410, 27 jan. 2015.

FERNANDES, R. S.; COTTER, T. G. Apoptosis or necrosis: intracellular levels of glutathione influence mode of cell death. **Biochemical pharmacology**, v. 48, n. 4, p. 675–81, 17 ago. 1994.

FERRARI, M. Cancer nanotechnology: opportunities and challenges. **Nature Reviews Cancer**, v. 5, n. 3, p. 161–171, 2005.

FINK, S. L.; COOKSON, B. T. Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells. **Infection and immunity**, v. 73, n. 4, p. 1907–16, abr. 2005.

GALLUZZI, L. et al. Essential versus accessory aspects of cell death: recommendations of the NCCD 2015. **Cell Death and Differentiation**, v. 22, n. 1, p. 58–73, 19 jan. 2015.

GIUSTI, J. S. M. et al. Antimicrobial photodynamic action on dentin using a light-emitting diode light source. **Photomedicine and laser surgery**, v. 26, n. 4, p. 281–7, ago. 2008.

GROSVENOR, M.; BULCAVAGE, L.; CHLEBOWSKI, R. T. Symptoms potentially influencing weight loss in a cancer population. Correlations with primary site, nutritional status, and chemotherapy administration. **Cancer**, v. 63, n. 2, p. 330–4, 15 jan. 1989.

HENDERSON, B. W. et al. Interaction of Photodynamic Therapy and Hyperthermia□: Tumor Response and Cell Survival Studies after Treatment of Mice in Vivo Interaction of Photodynamic Therapy and Hyperthermia□: Tumor Response and Cell Survival Studies after Treatment of Mice in V / . v. 45, n. December, p. 6071–6077, 1985.

Referências Bibliográficas

HILDEBRANDT, B. The cellular and molecular basis of hyperthermia. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 43, n. 1, p. 33–56, 2002.

HILDEBRANDT, B. et al. Whole-body hyperthermia in the scope of von Ardenne's systemic cancer multistep therapy (sCMT) combined with chemotherapy in patients with metastatic colorectal cancer: a phase I/II study. **International Journal of Hyperthermia**, v. 20, n. 3, p. 317–333, jan. 2004.

HIRSCH, L. R. et al. Metal nanoshells. **Annals of biomedical engineering**, v. 34, n. 1, p. 15–22, 2006.

HU, M. et al. Gold nanostructures: engineering their plasmonic properties for biomedical applications. **Chemical Society reviews**, v. 35, n. 11, p. 1084–1094, 2006.

HUANG, L. et al. Type I and Type II mechanisms of antimicrobial photodynamic therapy: An in vitro study on gram-negative and gram-positive bacteria. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 44, n. 6, p. 490–499, 2012.

HUFF, T. B. et al. Controlling the cellular uptake of gold nanorods. **Langmuir**, v. 23, n. 4, p. 1596–1599, 2007.

HWANG, A. A. et al. Functional Nanovalves on Protein-Coated Nanoparticles for In vitro and In vivo Controlled Drug Delivery. **Small**, v. 11, n. 3, p. 319–328, jan. 2015.

JAIN, K. K. Nanomedicine: Application of Nanobiotechnology in Medical Practice. **Medical Principles and Practice**, v. 17, n. 2, p. 89–101, 2008.

JANG, B. et al. Gold Nanorod - Photosensitizer. n. 2, p. 1086–1094, 2011.

KAH, J. C. Y. et al. Combinatorial treatment of photothermal therapy using gold nanoshells with conventional photodynamic therapy to improve treatment efficacy: An in vitro study. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 40, n. 8, p. 584–589, out. 2008.

KAWASAKI, E. S.; PLAYER, A. Nanotechnology, nanomedicine, and the development of new, effective therapies for cancer. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 1, n. 2, p. 101–109, 2005.

KELLY, K. L. et al. The Optical Properties of Metal Nanoparticles: The Influence of Size, Shape, and Dielectric Environment. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 107, n. 3, p. 668–677, 2003.

KIM, F.; SONG, J. H.; YANG, P. Photochemical synthesis of gold nanorods. **Journal of the American Chemical Society**, v. 124, n. 48, p. 14316–14317, 2002.

KUO, W.-S. et al. Gold Nanorods in Photodynamic Therapy, as Hyperthermia Agents, and in Near-Infrared Optical Imaging. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 49, n. 15, p. 2711–2715, 1 abr. 2010.

KURODA, K. et al. Inhibitory Effect of Capsella bursa-pastoris Extract on Growth of Ehrlich Solid Tumor in Mice Inhibitory Effect of Capsella bursa-pastoris Extract on Growth of

Referências Bibliográficas

- Ehrlich Solid Tumor in Mice1. **Cancer Research**, v. 36, n. June, p. 1900–1903, 1976.
- LAPOTKO, D. et al. Method of laser activated nano-thermolysis for elimination of tumor cells. **Cancer Letters**, v. 239, p. 36–45, 2006.
- LI, C. et al. Self-assembly of PEGylated gold nanorods and its optical limiting property. **Materials Letters**, v. 140, p. 184–186, fev. 2015.
- LI, L. et al. Photodynamic Detection and Therapy of Cancers. **Imaging**, p. 17194–17200, 2010.
- LI, M. et al. Loss of intracisternal A-type retroviral particles in BL6 melanoma cells transfected with MHC class I genes. **The Journal of general virology**, v. 77 (Pt 11, p. 2757–65, 1996.
- LOO, C. et al. Immunotargeted nanoshells for integrated cancer imaging and therapy. **Nano Letters**, v. 5, n. 4, p. 709–11, 2005.
- MANG, T. S. Combination studies of hyperthermia induced by the neodymium: yttrium-aluminum-garnet (Nd:YAG) laser as an adjuvant to photodynamic therapy. **Lasers in surgery and medicine**, v. 10, n. 2, p. 173–8, 1990.
- MINKO, T.; KOPEČKOVÁ, P.; KOPEČEK, J. Mechanisms of anticancer action of HPMa copolymer-bound doxorubicin. **Macromolecular Symposia**, v. 172, n. 1, p. 35–48, jul. 2001.
- MORRISON, S. A. et al. Efficacy and safety of continuous low-irradiance photodynamic therapy in the treatment of chest wall progression of breast cancer. **Journal of Surgical Research**, v. 192, n. 2, p. 235–241, 2014.
- MURPHY, C. J. et al. Anisotropic Metal Nanoparticles: Synthesis, Assembly, and Optical Applications. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 109, n. 29, p. 13857–13870, jul. 2005.
- MURPHY, C. J.; JANA, N. R. Controlling the aspect ratio of inorganic nanorods and nanowires. **Advanced Materials**, v. 14, n. 1, p. 80–82, 2002.
- NOWAK-STEPNIEWSKA, A. et al. Inhibition of cell growth induced by photosensitizer PP(Arg)2-mediated photodynamic therapy in human breast and prostate cell lines. Part I. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 8, n. 1, p. 39–48, 2011.
- O'NEAL, D. P. et al. Photo-thermal tumor ablation in mice using near infrared-absorbing nanoparticles. **Cancer Letters**, v. 209, n. 2, p. 171–176, 2004.
- OHSIE, S. J. et al. Immunohistochemical characteristics of melanoma. **Journal of Cutaneous Pathology**, v. 35, n. 5, p. 433–444, 2008.
- OLSON, J. et al. Optical characterization of single plasmonic nanoparticles. **Chem. Soc. Rev.**, v. 44, n. 1, p. 40–57, 2015.
- ONOSHIMA, D.; YUKAWA, H.; BABA, Y. Multifunctional quantum dots-based cancer

Referências Bibliográficas

- diagnostics and stem cell therapeutics for regenerative medicine. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 95, p. 2–14, dez. 2015.
- PARK, S. et al. Ultrafast resonant dynamics of surface plasmons in gold nanorods. **Journal of Physical Chemistry C**, v. 111, n. 1, p. 116–123, 2007.
- PELISSON, M. M. M. et al. Synthesis and Photochemical Properties of a bis(n - Hexanoyl)silicon Tribenzonaphthoporphyrinate. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 24, n. 5, p. 581–587, out. 2006.
- PISSUWAN, D.; VALENZUELA, S.; CORTIE, M. B. Prospects for gold nanorod particles in diagnostic and therapeutic applications. **Biotechnology & genetic engineering reviews**, v. 25, p. 93–112, 2008.
- PROSKURYAKOV, S. Y.; KONOPLYANNIKOV, A. G.; GABAI, V. L. Necrosis: a specific form of programmed cell death? **Experimental cell research**, v. 283, n. 1, p. 1–16, 1 fev. 2003.
- RATTO, F. et al. Plasmonic Particles that Hit Hypoxic Cells. **Advanced Functional Materials**, v. 25, n. 2, p. 316–323, jan. 2015.
- ROZANOVA, N.; ZHANG, J. Photothermal ablation therapy for cancer based on metal nanostructures. **Science In China Series B Chemistry**, v. 52, n. 10, p. 1559–1575, 2009.
- SAAD-HOSSNE, R.; SAAD-HOSSNE, W.; PRADO, R. G. Efeito da solução aquosa de fenol, ácido acético e glicerina sobre o tumor ascítico de Ehrlich: estudo experimental in vitro. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 19, n. 1, p. 54–58, jan. 2004.
- SADLER, S. et al. Internalization of a C17 α -alkynylestradiol-porphyrin conjugate into estrogen receptor positive MCF-7 breast cancer cells. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 21, n. 15, p. 4638–41, 2011.
- SALOMAO, G. H. A. et al. Chlorophyllin-M: A new substance for photodynamic therapy in the retina and choroid. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 47, n. 5, p. 421–425, jul. 2015.
- SAU, T. K.; MURPHY, C. J. Seeded high yield synthesis of short Au nanorods in aqueous solution. **Langmuir**, v. 20, n. 15, p. 6414–6420, 2004.
- SCAIANO, J. C. et al. Photochemical routes to silver and gold nanoparticles. **Pure and Applied Chemistry**, v. 81, n. 4, p. 635–647, 2009.
- SCHUMACHER, T. N.; SCHREIBER, R. D. Neoantigens in cancer immunotherapy. **Science**, v. 348, n. 6230, p. 69–74, 3 abr. 2015.
- SINGH, M. et al. Noncovalently Functionalized Monolayer Graphene for Sensitivity Enhancement of Surface Plasmon Resonance Immunosensors. **Journal of the American Chemical Society**, v. 137, n. 8, p. 2800–2803, 4 mar. 2015.
- SONG, J. et al. Cyclooxygenase 2-mediated apoptotic and inflammatory responses in photodynamic therapy treated breast adenocarcinoma cells and xenografts. **Journal of**

photochemistry and photobiology. B, Biology, v. 134, p. 27–36, 2014.

STUCHINSKAYA, T. et al. Targeted photodynamic therapy of breast cancer cells using antibody-phthalocyanine-gold nanoparticle conjugates. **Photochemical & photobiological sciences** □: **Official journal of the European Photochemistry Association and the European Society for Photobiology**, v. 10, n. 5, p. 822–831, 2011.

SUGUNAN, A. et al. Heavy-metal ion sensors using chitosan-capped gold nanoparticles. **Science and Technology of Advanced Materials**, v. 6, n. 3-4 SPEC. ISS., p. 335–340, 2005.

SWAMY, N. et al. Nuclear estrogen receptor targeted photodynamic therapy: Selective uptake and killing of MCF-7 breast cancer cells by a C17??- alkynylestradiol-porphyrin conjugate. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 99, p. 966–977, 2006.

TANNOCK, I. F. A Comparison of Cell Proliferation Parameters in Solid and Ascites Ehrlich Tumors A Comparison of Cell Proliferation Parameters in Solid and Ascites Ehrlich Tumors. **Chart**, n. AUGUST, p. 1527–1534, 1969.

TRIMMER, C. et al. CAV1 inhibits metastatic potential in melanomas through suppression of the integrin/Src/FAK signaling pathway. **Cancer Research**, v. 70, n. 19, p. 7489–7499, 2010.

TSAI, T. et al. Effect of 5-aminolevulinic acid-mediated photodynamic therapy on MCF-7 and MCF-7/ADR cells. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 34, n. 1, p. 62–72, 2004.

TYNGA, I. M.; HOURELD, N. N.; ABRAHAMSE, H. The primary subcellular localization of Zinc phthalocyanine and its cellular impact on viability, proliferation and structure of breast cancer cells (MCF-7). **Journal of photochemistry and photobiology. B, Biology**, v. 120, p. 171–6, 2013.

USUDA, J. et al. Breast cancer resistant protein (BCRP) is a molecular determinant of the outcome of photodynamic therapy (PDT) for centrally located early lung cancer. **Lung Cancer**, v. 67, n. 2, p. 198–204, 2010.

VITTAR, N. B. R. et al. Caspase-independent apoptosis, in human MCF-7c3 breast cancer cells, following photodynamic therapy, with a novel water-soluble phthalocyanine. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 42, n. 7, p. 1123–1131, 2010.

VOLLET-FILHO, J. D. et al. Possibility for a full optical determination of photodynamic therapy outcome. **Journal of Applied Physics**, v. 105, n. 10, p. 102038, 2009.

VON MALTZAHN, G. et al. Computationally Guided Photothermal Tumor Therapy Using Long-Circulating Gold Nanorod Antennas. **Cancer Research**, v. 69, n. 9, p. 3892–3900, 2009.

WALDOW, S. M. et al. Photodynamic therapy for treatment of malignant cutaneous lesions. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 7, n. 6, p. 451–456, 1987.

WANG, H. et al. Facile preparation of gold nanocages and hollow gold nanospheres via solvent thermal treatment and their surface plasmon resonance and photothermal properties. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 440, p. 236–244, fev. 2015a.

WANG, L. et al. Characterization of gold nanorods in vivo by integrated analytical techniques: their uptake, retention, and chemical forms. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 396, n. 3, p. 1105–14, fev. 2010.

WANG, T. et al. Potential application of functional porous TiO₂ nanoparticles in light-controlled drug release and targeted drug delivery. **Acta Biomaterialia**, v. 13, p. 354–363, fev. 2015b.

WEI, Z.; MIESZAWSKA, A. J.; ZAMBORINI, F. P. Synthesis and manipulation of high aspect ratio gold nanorods grown directly on surfaces. **Langmuir**, v. 20, n. 11, p. 4322–4326, 2004.

WIRTZ, M.; MARTIN, C. R. Template-Fabricated Gold Nanowires and Nanotubes. **Advanced Materials**, v. 15, n. 5, p. 455–458, 4 mar. 2003.

XUE, L.-Y.; CHIU, S.-M.; OLEINICK, N. L. Atg7 deficiency increases resistance of MCF-7 human breast cancer cells to photodynamic therapy. **Autophagy**, v. 6, n. 2, p. 248–55, 2010.

YANASE, S. et al. Synergistic increase in osteosarcoma cell sensitivity to photodynamic therapy with aminolevulinic acid hexyl ester in the presence of hyperthermia. **Photomedicine and laser surgery**, v. 27, n. 5, p. 791–7, out. 2009.

YU et al. Gold Nanorods: Electrochemical Synthesis and Optical Properties. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 101, n. 34, p. 6661–6664, ago. 1997.

ZHAO, J. et al. Gold Nanoparticles in Cancer Therapy: Efficacy, Biodistribution, and Toxicity. **Current pharmaceutical design**, v. 21, n. 29, p. 4240–51, 2015.

ANEXO 1 - PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA - Brasil

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA
Comissão de Ética no Uso de Animais
Via Washington Luís, km. 235 - Caixa Postal 676
Fones: (016) 3351.8025 / 3351.9679
Fax: (016) 3351.8025
CEP 13560-970 - São Carlos - SP - Brasil
ceua@ufscar.br - www.propq.ufscar.br

Parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais
nº 033/2012

Protocolo nº. 029/2012

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de São Carlos - CEUA/UFSCar **APROVOU** o projeto de pesquisa intitulado "*Ação sinérgica entre Terapia Fotodinâmica e Terapia Hipertérmica em diferentes condições de aplicação terapêutica*", submetido pelo pesquisador *Lucas Freitas de Freitas*.

São Carlos, 14 de setembro de 2012.

Profa. Dra. Luciana Thie Seki Dias

Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais

ANEXO 1 - PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA - Estados Unidos

The amendment referenced below has been reviewed and approved by the IACUC - OLAW Assurance A3596-01. Please note- the amendment does not extend the expiration date of the protocol. Any IACUC member having a conflict of interest with regard to the review of this protocol left the room during the discussion and vote.

Details:

Protocol Title : Photodynamic Therapy and Anti-tumor Immunity in Mouse Models

Protocol Number : 2004N000001

Principal Investigator : Hamblin, Michael

Submission Type : AME37

Submitter : Brissette, Andrea

Project End Date : 01/16/2015

Changes made: **Added: De Freitas, Lucas- Other**

As a reminder, you are responsible for the following:

1. Compliance with IACUC Policies governing the care and use of animals.
2. Submission of changes to this project for IACUC review and approval prior to initiation of the change.

3. Submission of annual progress reports to the IACUC for review and approval.
4. Adherence to safety requirements if using any hazardous agents.

The IACUC can and will terminate projects that are not in compliance with these requirements.

A formal copy of the approval notice letter has been posted in Insight and can be found under the Review Notes column on the protocol details tab for this submission. If there are questions, contact the IACUC at IACUC@mgh.harvard.edu

Thank you,

--Administrator