

Universidade de Brasília

Instituto de Ciências Biológicas

Pós – Graduação em Biologia Animal

**EFICÁCIA DO ALUMÍNIO-CLORO FTALOCIANINA ASSOCIADO A
NANOPARTÍCULAS DE POLI(VINIL METIL ÉTER-CO-ANIDRIDO MALEICO)
NA TERAPIA FOTODINÂMICA CONTRA CÉLULAS TUMORAIS *IN VITRO***

Beatriz Chiyin Ma

Brasília – DF

2012

Beatriz Chiyin Ma

**EFICÁCIA DO ALUMÍNIO-CLORO FTALOCIANINA ASSOCIADO A
NANOPARTÍCULAS DE POLI(VINIL METIL ÉTER-CO-ANIDRIDO MALEICO)
NA TERAPIA FOTODINÂMICA CONTRA CÉLULAS TUMORAIS *IN VITRO***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília como parte integrante dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Biologia Animal.

Orientadora: Prof^ª. Dra. Maria de Fátima Menezes Almeida Santos

Brasília – DF

2012

Ma, Beatriz Chiyin

Eficácia do Alumínio-Cloro Ftalocianina associado a nanopartículas de poli(vinil metil éter-co-anidrido maleico) na Terapia Fotodinâmica contra células tumorais *in vitro* / Beatriz Chiyin Ma. – 2012

82 f. Dissertação de Mestrado

Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, 2012.

1. Terapia Fotodinâmica 2. Câncer de Mama 3. Nanotecnologia
I. Santos, Maria de Fátima Menezes Almeida Santos.

*Dedico esta dissertação a
todos aqueles que um dia já foram
tocados direta ou indiretamente pelo câncer,
e que cada pequeno descobrimento seja fonte de
inspiração para prosseguir na busca
pela chave da cura.*

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Marcos e Ijo, fontes dos meus conceitos de moral e exemplos de dedicação, trabalho, cuidado e amor à família. Ao meu irmão Edson e à minha cunhada Júlia por todo apoio, incentivo, torcida e alegria que trouxeram ao meu dia-a-dia.

Ao meu querido e amado Otávio por todo apoio, paciência, carinho e por simplesmente existir, completar e trazer luz à minha vida.

À minha orientadora, Professora Dra. Maria de Fátima Menezes Almeida Santos, pelos ensinamentos, pela sabedoria e pela oportunidade para a concretização deste trabalho. Muito obrigada por confiar em minha capacidade e por acreditar em meu potencial.

Ao Professor Dr. Ricardo Bentes de Azevedo pelo acolhimento, pela oportunidade de trabalhar em seu laboratório e por acreditar em meu potencial.

Ao meu amigo e colega Dr. Luis Alexandre Muehlmann por fornecer a nanopartícula utilizada neste trabalho. E também por solucionar minhas dúvidas, pela amizade e pelas brincadeiras.

Aos Professores Dr. Sebastião, Dr. Bergmann Morais e Dr. Márcio Poças pelo auxílio, pelo suporte e por abrirem as portas de seus laboratórios para a realização de etapas deste estudo.

Aos Professores Dr. Luciano Paulino e Dra. Monica Garcia pelas contribuições para o enriquecimento deste trabalho.

Aos meus amigos e colegas cientistas Ludmilla, Victoria, João Paulo, Samuel, Khéllida, Larissa, Maitê, Juli, Patrícia, Jaqueline, Renatinha, Vanessa, Juliana, Camila, Diego, Taynan, Grazi, Luciana Pereira, Raphael, Lívia, Sebastian, Maria Luisa, Mariana, Luciana Carneiro, Prof. Wilson e Karen pela amizade, pela ajuda, pelos conselhos, pelo carinho e pelos momentos agradáveis passados no laboratório.

À Dona Zélia por todo o auxílio e por tornar tudo mais organizado, simples e agradável para trabalhar no laboratório.

A todos os meus familiares e amigos, em particular à Poly, Luisa, André, Lucianna e Carol, pela força e pela torcida para o sucesso deste trabalho.

A todos os que fazem parte da equipe do Laboratório de Nanobiotecnologia, da pós-graduação em Biologia Animal e do Departamento de Genética e Morfologia por todo o auxílio prestado no trabalho.

À Universidade de Brasília pelo fornecimento da estrutura para a realização deste estudo.

À CAPES, ao CNPq e ao INCT de Nanobiotecnologia pelo apoio financeiro.

E a todos que, de alguma forma, auxiliaram na realização desta dissertação.

RESUMO

O câncer de mama é o tipo de câncer mais comum entre as mulheres e apresenta taxas crescentes de incidência e de mortalidade no mundo. Os tratamentos convencionais para esta doença consistem em técnicas não-específicas, que oferecem riscos de dano a tecidos saudáveis ou erradicação incompleta das células malignas. É nesse sentido que a terapia fotodinâmica, TFD, modalidade terapêutica que utiliza um fotossensibilizante, FS, sensível a luz de comprimento de onda específico capaz de induzir efeitos tóxicos a células e tecidos-alvo, tem se destacado como uma promissora abordagem tecnológica a ser utilizada no tratamento de diversos tipos de câncer. Um grande número de FS tem sido testado para aplicação na TFD, dentre eles destaca-se o Alumínio-Cloro Ftalocianina, AICIPc, mas sua elevada hidrofobicidade gera entraves que comprometem a eficácia de sua atuação. Diante disso, estratégias para contornar esse problema conduziram ao desenvolvimento de uma formulação constituída por AICIPc associado ao copolímero poli(vinil metil éter-co-anidrido maleico) – PVM/MA, AICIPc-NP, com potencial para ser utilizado como FS na TFD. Nesse contexto, o presente trabalho teve como foco a avaliação da eficácia do Alumínio-Cloro Ftalocianina associado ao PVM/MA como fotossensibilizante a ser utilizado na terapia fotodinâmica, em um estudo *in vitro*. Para tal, utilizou-se como modelo células das linhagens murinas tumoral (4T1) e não-tumoral (NIH/3T3), e também linhagens celulares humanas tumoral (MCF-7) e não-tumoral (MCF-10A). Os resultados mostraram que células de todas essas linhagens incorporam o AICIPc-NP, e os efeitos do tratamento com o fármaco mostraram que o copolímero PVM/MA, não associado ao AICIPc, não é citotóxico para as quatro linhagens celulares estudadas. O AICIPc-NP não submetido à irradiação luminosa não se mostrou citotóxico em concentrações menores ou iguais a 2,0 μM , mas ao ser irradiado, induziu citotoxicidade em todas as linhagens celulares, sendo essa toxicidade menos pronunciada sob irradiação luminosa de baixas densidades de energia e em células não-tumorais. Além disso, as análises do perfil de morte celular mostraram que a TFD mediada pelo AICIPc-NP induz morte celular por apoptose sob irradiação luminosa de baixa densidade de energia, enquanto que em alta densidade de energia induz morte celular por necrose, sendo esses resultados corroborados pelas análises de fragmentação do DNA. Os efeitos citostáticos e citotóxicos observados no tratamento da TFD mediada pelo AICIPc-NP sobre células tumorais oferecem excelentes perspectivas do potencial desse fármaco como fotossensibilizante para utilização na terapia fotodinâmica.

Palavras-chave: terapia fotodinâmica; PVM/MA; alumínio-cloro ftalocianina; câncer de mama; fotossensibilizante.

ABSTRACT

Breast cancer is the most common type of cancer among women, with increasing incidence and mortality rates worldwide. Ordinary treatments for this disease consist of non-specific techniques which offer risks of damaging healthy tissues or incomplete eradication of malignant cells. Therefore, photodynamic therapy, PDT, a therapeutic modality which uses a photosensitizer (PS) sensitive to light of specific wavelength capable of inducing toxic effects to target tissues and cells, has emerged as a promising technological approach to be used in the treatment of several types of cancer. A large number of PS has been tested for use in PDT, with emphasis to Chloroaluminum Phthalocyanine (AlClPc), however, its high hydrophobicity creates obstacles that undermine the effectiveness of its performance. For this reason, strategies to circumvent this problem led to the development of a formulation consisting of AlClPc associated with the copolymer poly(vinyl methyl ether-co-maleic anhydride), PVM/MA, (AlClPc-NP) with potential to be used as a PS in PDT. In this context, this study focused on evaluating the effectiveness of Chloroaluminum Phthalocyanine associated with PVM/MA as a photosensitizer to be used in photodynamic therapy, *in vitro* study. For this, murine tumor cell line (4T1) and non-tumor cell line (NIH/3T3) were used as models, as well as human tumor cell line (MCF-7) and non-tumor cell line (MCF-10A). The results showed that cells of all lineages take up the AlClPc-NP, and the effects of drug treatment showed that PVM/MA, not associated with the AlClPc, is not cytotoxic to all four cell lines studied. AlClPc-NP without light irradiation no induce cytotoxic effects in concentrations less than or equal to 2,0 μM . However, with light irradiation, was able to induce cytotoxicity in all cell lines: this toxicity was less intense in light irradiations with low energy densities in non-tumor cells. Furthermore, PDT mediated by AlClPc-NP induce cell death by apoptosis in light irradiation with low energy density, while in high energy density induce cell death by necrosis, these results were confirmed with analysis of DNA fragmentation, i.e. PDT with low energy density did not induce DNA fragmentation. Thus, the cytostatic and cytotoxic effects observed in treatment with PDT mediated by AlClPc-NP in tumor cells offer great prospects for the potential of this drug as a photosensitizer for use in photodynamic therapy.

Keywords: photodynamic therapy; PVM/MA; chloroaluminum phthalocyanine, breast cancer, photosensitizer.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1.** Mecanismos fotoquímicos e fotofísicos da Terapia Fotodinâmica. Dados: Adaptado de Robertson *et al.*, 2009 7
- Figura 2.** Janela óptica para Terapia Fotodinâmica. Faixa do espectro de absorção adequado para a Terapia Fotodinâmica entre 650-1200 nm. Dados: Adaptado de Plaetzer *et al.*, 2009. 10
- Figura 3.** Fotomicrografia de células da linhagem MCF-7 coradas com alaranjado de acridina/brometo de etídio e analisadas em microscópio de fluorescência com filtro de 540 nm. (A) Células viáveis; (B) células em apoptose; (C) célula em necrose; e (setas) corpos apoptóticos.28
- Figura 4.** Perfil de incorporação de Alumínio-Cloro Ftalocianina, AlClPc, por células das linhagens 4T1, NIH/3T3, MCF-7 e MCF-10A expostas ao AlClPc associado a nanopartículas de PVM/MA em diferentes tempos. Os resultados estão expressos como intensidade de fluorescência normalizada (λ de excitação de 350 nm e λ de emissão de 690 nm) em função do tempo de incubação com AlClPc-NP. Os dados estão apresentados como média \pm E.P.M. para quintuplicata. 31
- Figura 5.** Citotoxicidade em células tumorais (4T1, MCF-7) e não tumorais (NIH/3T3, MCF-10A) submetidas a irradiação luminosa (670 nm), na ausência do fármaco AlClPc-NP, sob as densidades de energia: 3,82 J/cm²; 11,46 J/cm²; 22,93 J/cm² e 34,39 J/cm². Não houve correlação estatisticamente significativa entre as variáveis em relação ao grupo controle, $p < 0,05$. Os dados estão apresentados como média \pm E.P.M. para quintuplicata. 32
- Figura 6.** Citotoxicidade em células tumorais (4T1, MCF-7) e não tumorais (NIH/3T3, MCF-10A) expostas por 15 minutos ao copolímero PVM/MA nas concentrações: 0,80 μ M; 1,60 μ M; 3,19 μ M; 6,39 μ M; 12,78 μ M; 25,55 μ M; e 38,33 μ M. Não houve correlação estatisticamente significativa entre as variáveis em relação ao grupo controle, $p < 0,05$. Os dados estão apresentados como média \pm E.P.M. para quintuplicata. 33
- Figura 7.** Citotoxicidade em células das linhagens 4T1 e NIH/3T3 expostas por 15 minutos ao AlClPc-NP não irradiadas nas concentrações: 0,25 μ M; 0,5 μ M; 1,0 μ M; 2,0 μ M; 4,0 μ M; 8,0 μ M e 12 μ M. Letras distintas indicam correlação estatisticamente significativa entre as variáveis entre si e em relação ao grupo controle, $p < 0,05$. Os dados estão apresentados como média \pm E.P.M. para quintuplicata. 34

- Figura 8.** Citotoxicidade em células das linhagens MCF-7 e MCF-10A expostas por 15 minutos ao AICIPc-NP não irradiadas nas concentrações: 0,25 μM ; 0,5 μM ; 1,0 μM ; 2,0 μM ; 4,0 μM ; 8,0 μM e 12 μM . Subscritos (*) indicam correlação estatisticamente significativa entre as variáveis em relação ao grupo controle, $p < 0,05$. Os dados estão apresentados como média \pm E.P.M. para quintuplicata. **34**
- Figura 9.** Citotoxicidade em células da linhagem 4T1 expostas por 15 minutos ao AICIPc-NP nas concentrações: 0,25 μM ; 0,5 μM ; 1,0 μM ; 2,0 μM e irradiadas sob as densidades de energia de 0,48 J/cm^2 , 1,38 J/cm^2 e 3,82 J/cm^2 . Letras distintas denotam correlação estatisticamente significativa, $p < 0,05$. Os dados estão apresentados como média \pm E.P.M. para quintuplicata **35**
- Figura 10.** Citotoxicidade em células da linhagem NIH/3T3 expostas por 15 minutos ao AICIPc-NP nas concentrações: 0,25 μM ; 0,5 μM ; 1,0 μM ; 2,0 μM e irradiadas sob as densidades de energia de 0,48 J/cm^2 , 1,38 J/cm^2 e 3,82 J/cm^2 . Letras distintas denotam correlação estatisticamente significativa, $p < 0,05$. Os dados estão apresentados como média \pm E.P.M. para quintuplicata **36**
- Figura 11.** Citotoxicidade em células da linhagem MCF-7 expostas por 15 minutos ao AICIPc-NP nas concentrações: 0,25 μM ; 0,5 μM ; 1,0 μM ; 2,0 μM e irradiadas sob as densidades de energias: 0,48 J/cm^2 , 1,38 J/cm^2 e 3,82 J/cm^2 . Letras distintas denotam correlação estatisticamente significativa, $p < 0,05$. Os dados estão apresentados como média \pm E.P.M. para quintuplicata **37**
- Figura 12.** Citotoxicidade em células da linhagem MCF-10A expostas por 15 minutos ao AICIPc-NP nas concentrações: 0,25 μM ; 0,5 μM ; 1,0 μM ; 2,0 μM e irradiadas sob as densidades de energias: 0,48 J/cm^2 , 1,38 J/cm^2 e 3,82 J/cm^2 . Letras distintas denotam correlação estatisticamente significativa, $p < 0,05$. Os dados estão apresentados como média \pm E.P.M. para quintuplicata **38**
- Figura 13.** Citotoxicidade em células da linhagem MCF-10A expostas por 30 minutos ao AICIPc-NP nas concentrações: 0,25 μM ; 0,5 μM ; 1,0 μM ; 2,0 μM e irradiadas sob as densidades de energias: 0,48 J/cm^2 e 1,38 J/cm^2 . Letras distintas denotam correlação estatisticamente significativa, $p < 0,05$. Os dados estão apresentados como média \pm E.P.M. para quintuplicata **39**
- Figura 14.** Teste colorimétrico por Alaranjado de Acridina/Brometo de Etídio. Frequência de morte celular por apoptose (preto) e necrose (branco) em células das linhagens 4T1, NIH/3T3 e MCF-7, expostas por 15 minutos ao AICIPc-NP, e sobre células da linhagem MCF-10A, após exposição por 30 minutos ao AICIPc-NP, nas concentrações: 0,31 μM ; 0,63 μM ; 1,80 μM e 0,46 μM e irradiadas sob as densidades de energias: 0,48 J/cm^2 e 1,38 J/cm^2 . Subscritos (*) indicam correlação estatisticamente significativa entre as variáveis e o grupo controle, e

os subgrupos entre si, $p < 0,05$. Os dados estão apresentados como média \pm E.P.M. para triplicata. **40**

Figura 15. Frequência de fragmentação do DNA em células das linhagens 4T1, NIH/3T3 e MCF-7, expostas por 15 minutos ao AlClPc-NP, e sobre células da linhagem MCF-10A, após exposição por 30 minutos ao AlClPc-NP, nas concentrações: 0,31 μM ; 0,63 μM ; 1,80 μM e 0,46 μM e irradiadas sob as densidades de energias: 0,48 J/cm^2 e 1,38 J/cm^2 . Letras distintas indicam correlação estatisticamente significativa, $p < 0,05$. Os dados estão apresentados como média \pm E.P.M. para triplicata. **41**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Lista de Equipamentos	17
Tabela 2.	Lista de Materiais	18
Tabela 3.	Lista de Reagentes	19
Tabela 4.	Linhagens celulares utilizadas no presente estudo.	20
Tabela 5.	Concentrações de AIClPc-NP relativas à IC ₅₀ sob irradiação luminosa com densidade de energia igual a 0.48 J/cm ² para cada linhagem celular	27

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Abreviatura/Sigla	Significado
AICIPc	Alumínio-Cloro Ftalocianina
AICIPc-NP	Alumínio-Cloro Ftalocianina associado a nanopartículas de poli(vinil metil éter-co-anidrido maleico)
ANOVA	Análise de variância
AO/EB	Alaranjado de acridina/brometo de etídio
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetilsulfóxido
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
E.P.M	Erro padrão da média
EGF	Fator de crescimento epidermal
ERO	Espécies reativas de oxigênio
FS	Fotossensibilizante
MTT	Brometo de 3(4,5 dimetiltiazol-2il)-2,5-difenil-tetrazólio
PBS	Tampão fosfato salino
PLA	poli(ácido lático)
PLGA	poli(ácido lático-co-glicólico)
PGA	poli(ácido glicólico)
PVM/MA	poli(vinil metil éter-co-anidrido maleico)
TFD	Terapia Fotodinâmica

SUMÁRIO

1. Introdução	1
1.1. Câncer.....	1
1.2. Câncer de Mama.....	2
1.2.1. Aspectos Gerais	2
1.2.2. Tratamentos	2
1.3. Nanotecnologia, Nanobiotecnologia e Aplicações.....	4
1.4. Terapia Fotodinâmica	5
1.4.1. Conceitos e Aplicações.....	5
1.4.2. Fenômenos Fotoquímicos e Fotofísicos	6
1.4.3. Fotossensibilizantes	8
1.4.3.1. Fotossensibilizantes de primeira geração	10
1.4.3.2. Fotossensibilizantes de segunda geração.....	11
1.4.3.3. Fotossensibilizantes de terceira geração.....	11
1.4.4. Alumínio Cloro Ftalocianina	11
1.4.5. Nanopartículas poliméricas	13
1.4.5.1. Nanopartículas não-biodegradáveis.....	13
1.4.5.2. Nanopartículas biodegradáveis.....	14
2. Objetivos	16
3. Materiais e Métodos	17
3.1. Equipamentos, Materiais e Reagentes	17
3.2. Solução Nanopolimérica de Alumínio-Cloro Ftalocianina	20
3.3. Linhagens Celulares	20
3.3.1. Manutenção das células	21
3.3.2. Estabelecimento de subculturas	21
3.4. Perfil de Incorporação do fotossensibilizante Alumínio-Cloro Ftalocianina associado ao copolímero poli(vinil metil éter-co-anidrido maleico) por células <i>in vitro</i>	22
3.5. Fonte de <i>laser</i>	23
3.6. Determinação da viabilidade celular	23
3.6.1. Efeito do <i>laser</i> na viabilidade celular	24
3.6.2. Determinação da toxicidade do copolímero poli(vinil metil éter-co-anidrido maleico)	24
3.6.3. Determinação da toxicidade do Alumínio-Cloro Ftalocianina associado ao copolímero poli(vinil metil éter-co-anidrido maleico)	25

3.6.4. Terapia Fotodinâmica mediada pelo Alumínio-Cloro Ftalocianina associado ao copolímero poli(vinil metil éter-co-anidrido maleico)	25
3.7. Avaliação do perfil de morte celular por Alaranjado de Acridina/Brometo de Etídio	26
3.7.1. Critérios para a classificação das células em viáveis, em apoptose e em necrose	28
3.8. Teste de fragmentação do DNA	28
3.9. Análises Estatísticas	29
4. Resultados	30
4.1. Perfil de Incorporação do fotossensibilizante Alumínio-Cloro Ftalocianina associado ao copolímero poli(vinil metil éter-co-anidrido maleico) por células <i>in vitro</i>	30
4.2. Efeito do <i>laser</i> na viabilidade celular	31
4.3. Toxicidade do copolímero poli(vinil metil éter-co-anidrido maleico)	32
4.4. Toxicidade do Alumínio-Cloro Ftalocianina associado copolímero poli(vinil metil éter-co-anidrido maleico)	33
4.5. Terapia Fotodinâmica mediada pelo Alumínio-Cloro Ftalocianina associado copolímero poli(vinil metil éter-co-anidrido maleico)	35
4.6. Perfil de morte celular induzido pela Terapia mediada pelo Alumínio-Cloro Ftalocianina associado copolímero poli(vinil metil éter-co-anidrido maleico)	39
4.7. Fragmentação do DNA	41
5. Discussão	42
6. Conclusões	53
7. Referências Bibliográficas	54

Introdução

1. Introdução

1.1. Câncer

O câncer é definido como um conjunto de mais de cem doenças caracterizado por desordens celulares ocasionadas por múltiplas alterações genéticas que conduzem a um desequilíbrio na proliferação e morte celular. A característica mais marcante e comum a todas as formas de câncer é a proliferação celular desenfreada associada à capacidade de invasão e destruição tecidual (Ruddon, 2007; INCA, 2011).

Considerado um dos maiores problemas de saúde mundial, o câncer ocupa o segundo lugar entre as principais causas de mortalidade em sociedades industrializadas, atrás apenas de doenças cardiovasculares (Ruddon, 2007; David & Zimmerman, 2010). Estimativas apontaram para a incidência de cerca de 12,7 milhões de novos casos no mundo em 2008 e de cerca de 7,6 milhões de óbitos causados pela doença naquele ano (IARC, 2009).

No Brasil, estimativas apontam para a ocorrência de 518.510 casos novos de câncer para o ano de 2012, cerca de 257 mil em indivíduos do sexo masculino e cerca de 260 mil em indivíduos do sexo feminino. Os tipos de maior incidência são esperados para o câncer de pele do tipo não melanoma, seguido dos tumores de próstata e de pulmão para o sexo masculino e os tumores de mama e colo do útero para o sexo feminino (INCA, 2011).

O processo da carcinogênese, em geral, ocorre de forma lenta, passando por três estágios: iniciação, promoção e progressão (INCA, 2011). Na iniciação, ocorre a exposição de células saudáveis a agentes carcinogênicos, que podem iniciar processos que levam a alterações genéticas permanentes e cumulativas das células transformadas. No segundo estágio, promoção, as células geneticamente alteradas inicialmente passam por transformação maligna e início da expansão clonal sob a influência de agentes oncogênicos promotores, que podem atuar como mitógenos para a transformação celular. A progressão, terceira e última fase da doença, é caracterizada pelo aumento progressivo da instabilidade genética das células alteradas, levando à proliferação irreversível e descontrolada dessas células, formando uma massa tumoral (Ruddon, 2007; INCA, 2011).

O surgimento do câncer está fortemente relacionado a fatores ambientais, e depende da intensidade e duração da exposição das células aos agentes carcinogênicos. Os hábitos e o estilo de vida podem determinar as causas dos diferentes tipos de câncer (Ruddon, 2007). No caso do carcinoma mamário, como em muitos outros tipos cancerígenos, as causas podem ter origem em uma série de fatores de risco.

1.2. Câncer de Mama

1.2.1. Aspectos Gerais

Cada mama humana consiste em 15 a 20 glândulas túbulo-alveolares compostas, cuja função é secretar o leite (Junqueira & Carneiro, 2004; NIH, 2011). O tipo mais comum de câncer de mama é o carcinoma ductal, tendo como origem as células epiteliais dos ductos mamários. Além desse, o carcinoma lobular, que tem origem no tecido conjuntivo dos lobos ou lóbulos mamários, pode ser encontrado em ambas as mamas (NIH, 2011).

O câncer de mama é um dos tipos de câncer mais frequentes no mundo industrializado e o mais comum entre as mulheres, correspondendo a cerca de 22% de casos novos a cada ano. No Brasil, são esperados cerca de 53 mil novos casos em 2012 (INCA, 2011).

Fatores de risco para o desenvolvimento da doença estão relacionados à exposição a hormônios femininos durante a vida reprodutiva da mulher: menarca precoce, menopausa tardia, nuliparidade, primeira gestação em idade avançada, terapias de reposição hormonal e anticoncepcionais orais. Além desses, também estão relacionados: exposição à radiação ionizante, dieta, baixas taxas de atividade física e características genéticas (Ruddon, 2007; INCA, 2011).

A detecção da doença é considerada um fator-chave para as taxas de sobrevivência. No entanto, apesar de ser considerada uma neoplasia de bom prognóstico, se diagnosticado e tratado devidamente, as taxas de mortalidade pelo câncer de mama continuam elevadas no Brasil, possivelmente devido a diagnósticos e tratamentos tardios da doença (Ruddon, 2007; INCA, 2011).

1.2.2. Tratamentos

Os tratamentos convencionais para o câncer de mama consistem em cirurgia, radioterapia, quimioterapia, terapia hormonal e terapia-alvo. A aplicação de cada um depende do estágio de desenvolvimento e localização do tumor, em muitos casos ocorre a combinação de mais de uma modalidade (NIH, 2009; INCA, 2011).

A cirurgia consiste na retirada do tumor por meio de remoção parcial ou total da mama, o procedimento geralmente é acompanhado de retirada de linfonodos adjacentes para a verificação da presença de células malignas (NIH, 2009). No entanto, efeitos adversos deste tratamento como mutilação do órgão, fraqueza nos músculos do ombro e do braço adjacente, além de alterações estéticas são capazes de comprometer a qualidade de vida do paciente (Ruddon, 2007). Após a cirurgia, outros tratamentos como a quimioterapia e a radioterapia podem ser empregados como terapias adjuvantes (Piroth *et al.*, 2009).

A quimioterapia é um tratamento com o emprego de medicamentos que promovem o retardo ou a destruição de células com elevadas taxas de proliferação, ou seja, tanto células tumorais como células sadias do organismo que apresentam altas taxas de mitose podem ser afetadas (Weinberg, 2008). A aplicação das drogas pode ser realizada por via oral, endovenosa, subcutânea, intramuscular ou tópica, em que a atuação sistêmica ou regional ocasiona efeitos colaterais que variam de acordo com a droga empregada, tais como: perda de apetite, alterações endócrinas e cardíacas, problemas renais, alopecia, impactos ao sistema imunitários, alterações gastrointestinais e infertilidade (Castano *et al.*, 2006; Eckstein, 2011).

A radioterapia envolve a utilização de radiação de alta energia, raios X ou gamma, aplicada interna ou externamente ao organismo e direcionados para o local afetado pelo tumor de forma a promover a destruição ou o retardo de células malignas. No entanto, a irradiação pode também incidir sobre células sadias circunvizinhas, ocasionando efeitos secundários como: alterações cutâneas, fadiga e alterações gastrointestinais (Mavrogenis *et al.*, 2011; INCA, 2011).

A terapia hormonal consiste na redução da produção ou bloqueio da ação de hormônios relacionados ao crescimento tumoral (NIH, 2009). O estrogênio possui papel crítico na promoção tumoral do câncer de mama, em que células malignas apresentam receptores específicos para este hormônio, dessa forma, os principais medicamentos são relacionados à regulação da expressão ou síntese do estrogênio (Weinberg, 2008). No entanto, essa alteração hormonal pode ocasionar efeitos adversos como: irregularidade nos períodos menstruais, ressecamento da vagina, náuseas, vômitos e fadiga, além de resistência adquirida às drogas que inicialmente se mostraram efetivas (Cremoux, 2011).

A terapia-alvo envolve o uso de drogas com o objetivo de identificação e ataque específico de células tumorais sem o comprometimento de células sadias. Os tipos mais empregados de tratamento envolvem o uso de anticorpos monoclonais e inibidores de tirosina-quinase, em que identificam receptores específicos em células malignas e promovem a destruição destas ou o bloqueio de seu crescimento (NIH, 2011). No entanto, efeitos secundários também foram relatados no emprego dos atuais medicamentos utilizados, em que se incluem: náuseas, diarreia, febre, disfunções da tireóide, fadiga e vômito (Hamnvik *et al.*, 2011). Além disso, um dos grandes entraves dessa modalidade terapêutica consiste no desenvolvimento de resistência primária ou adquirida às drogas que inicialmente se mostraram efetivas. Mesmo estratégias de combinação de várias drogas no tratamento são frequentemente contornadas pelas células tumorais, como a aquisição de resistência a múltiplas drogas (Higgins & Baselga, 2011; Tsang & Finn, 2012).

Diante do exposto acima, esses métodos, apesar de apresentarem bons prognósticos ao paciente submetido a estes tipos de tratamento, oferecem riscos de dano a tecidos saudáveis ou erradicação incompleta das células malignas (Gonzalez-Angulo *et al.*, 2007; Pautler & Brenner, 2010). Junto a isso, as terapias convencionais por serem muitas vezes debilitantes e mutilantes conduzem à procura por novas formas de tratamento para o câncer. É nesse sentido que a nanotecnologia é oferecida como proposta de inovação tecnológica com fins de suplantar as dificuldades atuais.

1.3. Nanotecnologia, Nanobiotecnologia e Aplicações

A nanotecnologia, ramo científico que se ocupa da caracterização e da produção de materiais em escala nanométrica, tem se desenvolvido significativamente nos últimos anos (L'azou *et al.*, 2008), tornando possível a produção, caracterização, manipulação e utilização de materiais com novas propriedades e funções (Gupta & Gupta, 2005). Essa tecnologia tem sido aplicada em diversas áreas, em que se incluem: eletrônica, magnetismo, óptica, engenharia de materiais, tecnologia da informação e biotecnologia (NCI, 2011).

A nanobiotecnologia é definida como um ramo da nanociência que aplica técnicas, princípios biológicos e nanotecnológicos que permitem melhorar a compreensão dos biosistemas, e assim, transformá-los, conduzindo a progressos no campo da biologia, biotecnologia e saúde (Roco, 2003).

O estudo da interface entre materiais nanoestruturados e sistemas biológicos oferece uma ampla plataforma tecnológica para o desenvolvimento de aplicações de interesse para a indústria farmacêutica, sendo empregada na produção de novos fármacos mais efetivos no diagnóstico e tratamento de doenças (Willems & Wildenberg, 2004).

Avanços da nanobiotecnologia em vários setores do campo da saúde levaram ao desenvolvimento da nanomedicina como um campo promissor da nanociência na pesquisa de novas ferramentas biomédicas com aplicações em terapias-alvo, cirurgias em nanoescala e no diagnóstico, tratamento e monitoramento de doenças (Liu *et al.*, 2010; Pautler & Brenner, 2010).

O emprego de materiais nanoparticulados como veículos de sistemas de entrega de drogas em terapias-alvo representa uma das aplicações mais promissoras da nanomedicina (Wang & Thanou, 2010). Os nanoveículos aplicados à terapêutica são formados primordialmente por agentes terapêuticos encapsulados ou conjugados a nanocarreadores. A principal vantagem desse método consiste na alta seletividade, proporcionada pelo carregamento de drogas para sítios específicos, o que permite direcionar o tratamento a células-alvo e diminuir os efeitos

secundários associados a altas doses de fármacos utilizadas em tratamentos convencionais (Surendiran *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2010).

A técnica de vetorização de fármacos com base em métodos nanotecnológicos tem impulsionado fortes pesquisas na área de terapia contra o câncer. A ação não-específica de quimioterápicos em tratamentos convencionais implica em certo grau de toxicidade para tecidos saudáveis sob condições ótimas. Dessa forma, a utilização de nanovetores no tratamento direciona o agente terapêutico para o local-alvo evitando o contato com tecidos saudáveis (Surendiran *et al.*, 2009), o que permite uma redução da dose de medicamento administrada e a maximização de seu efeito, além de reduzir os efeitos tóxicos secundários advindos da distribuição sistêmica (Langer, 2001; Ferrari, 2005).

Atualmente existe uma série de modalidades tecnológicas empregadas na nanovetorização de agentes na terapia contra o câncer, em que se incluem: lipossomos, micelas, dendrímeros, nanopartículas poliméricas, nanocápsulas de ouro, nanotubos de carbono e nanopartículas superparamagnéticas (Ferrari, 2005; Liu *et al.*, 2010).

1.4. Terapia Fotodinâmica

1.4.1. Conceito e Aplicações

A Terapia Fotodinâmica, TFD, é uma modalidade terapêutica que envolve a combinação de dois componentes atóxicos: fotossensibilizante e luz em comprimento de onda específico. Juntos, estes dois elementos induzem efeitos tóxicos aos tecidos e células-alvo com base em espécies reativas moleculares dependentes de oxigênio (Dolmans *et al.*, 2003; Robertson *et al.*, 2009).

O emprego da luz na medicina tem suas origens há mais de 3000 anos, em que civilizações do Antigo Egito, da Grécia, da Índia e da China utilizavam a luz do sol no tratamento de várias doenças, como a psoríase, o vitiligo e o raquitismo. Da antiguidade para o mundo moderno, a fototerapia foi redescoberta apenas no início do século XX (Dolmans *et al.*, 2003).

Em 1900, Oscar Raab realizou as primeiras publicações a respeito dos resultados da combinação de luz e de agentes químicos, em que observou os efeitos citotóxicos do corante acridina em culturas de espécies do protozoário *Paramecium* ao serem irradiados com luz (Ackroyd *et al.*, 2001; Dolmans *et al.*, 2003). Considerado o pai da fotomedicina moderna, Niels Finsen foi agraciado com o prêmio Nobel de Medicina em 1903 pelos seus trabalhos ao utilizar a luz ultravioleta no tratamento de lesões cutâneas, atraindo as atenções do mundo moderno para o potencial da utilização da luz na medicina (Phillips, 2010). No entanto, o

termo “fotodinâmico” foi introduzido pela primeira vez apenas em 1907, quando Herman von Tappeiner e A. Jesionek trataram tumores de pele com uma aplicação tópica de eosina irradiada sob luz branca. Juntos, eles descreveram o fenômeno observado como “ação fotodinâmica” (Ackroyd *et al.*, 2001; Dolmans *et al.*, 2003).

Nos dias de hoje, a TFD tem sido utilizada como estratégia terapêutica em doenças infecciosas e em vários outros campos da medicina, em que se incluem: a oftalmologia, no tratamento da degeneração macular relacionada à idade (Dolmans *et al.*, 2003; Phillips, 2010); a dermatologia, em doenças como a psoríase e o escleroderma; a cardiologia, ao tratar hiperplasia em artérias e a reumatologia, no tratamento de artrite (Dolmans *et al.*, 2003).

A aplicação da TFD na oncologia passou por vários estágios de desenvolvimento desde os primeiros experimentos de Tappeiner e Jesionek, e atualmente, tem sido aprovada clinicamente como forma de tratamento e de alívio de sintomas em vários tipos de neoplasias, tais como: câncer esofágico, pulmonar, cervical, gástrico, de cabeça e pescoço, papilar da bexiga e endobronquial (Dolmans *et al.*, 2003; NCI, 2011).

O uso da TFD como tratamento contra o câncer tem atraído um grande número de pesquisas devido à especificidade e à seletividade de seu tratamento (Robertson *et al.*, 2009), o que leva à preservação funcional dos tecidos sadios adjacentes, e tem sido alvo de intensas investigações como possível modalidade de tratamento para várias outras formas de tumores malignos, em que se inclui o câncer mamário (Vittar *et al.*, 2010).

A eficácia da TFD depende de alguns fatores-chave determinantes para sua atuação localizada, entre eles: fenômenos fotoquímicos e fotofísicos, sistema de exposição à luz, propriedades e localização dos fotossensibilizantes (Dolmans *et al.*, 2003; Robertson *et al.*, 2009).

1.4.2. Fenômenos Fotoquímicos e Fotofísicos

Na TFD, a interação da luz com os tecidos e as moléculas, bem como os processos fotoquímicos e fotofísicos que conduzem à produção de espécies citotóxicas, são aspectos de fundamental importância para a eficácia de seu mecanismo de ação (Plaetzer *et al.*, 2009). Nesse sentido, dois importantes fatores se destacam: a absorção de luz e a transferência de energia (Figura 1).

O estado de um fotossensibilizante, FS, caracterizado por apresentar elétrons pareados formando um *spin* total equivalente a zero é denominado de estado singleto, e a configuração em que todos os elétrons estão possivelmente no orbital de menor energia é chamado de estado fundamental (Plaetzer *et al.*, 2009). No mecanismo de ação da TFD, a irradiação

luminosa de comprimento de onda específico leva à absorção de energia na forma de fótons pelos elétrons do FS, promovendo o salto quântico dos elétrons excitados para órbitas de maior energia e conduzindo o FS do estado singleto fundamental para um estado singleto excitado de curta duração. Nesta fase, a energia adquirida pode ser dispersa na forma de luz fluorescente ou emissão de calor. No entanto, o estado singleto excitado pode passar também por um processo conhecido como *intersystem crossing*, em que os elétrons excitados são conduzidos para um estado eletronicamente excitado mais estável de longa duração, o estado tripleto (Figura 1) (Dolmans *et al.*, 2003; Plaetzer *et al.*, 2009; Robertson *et al.*, 2009).

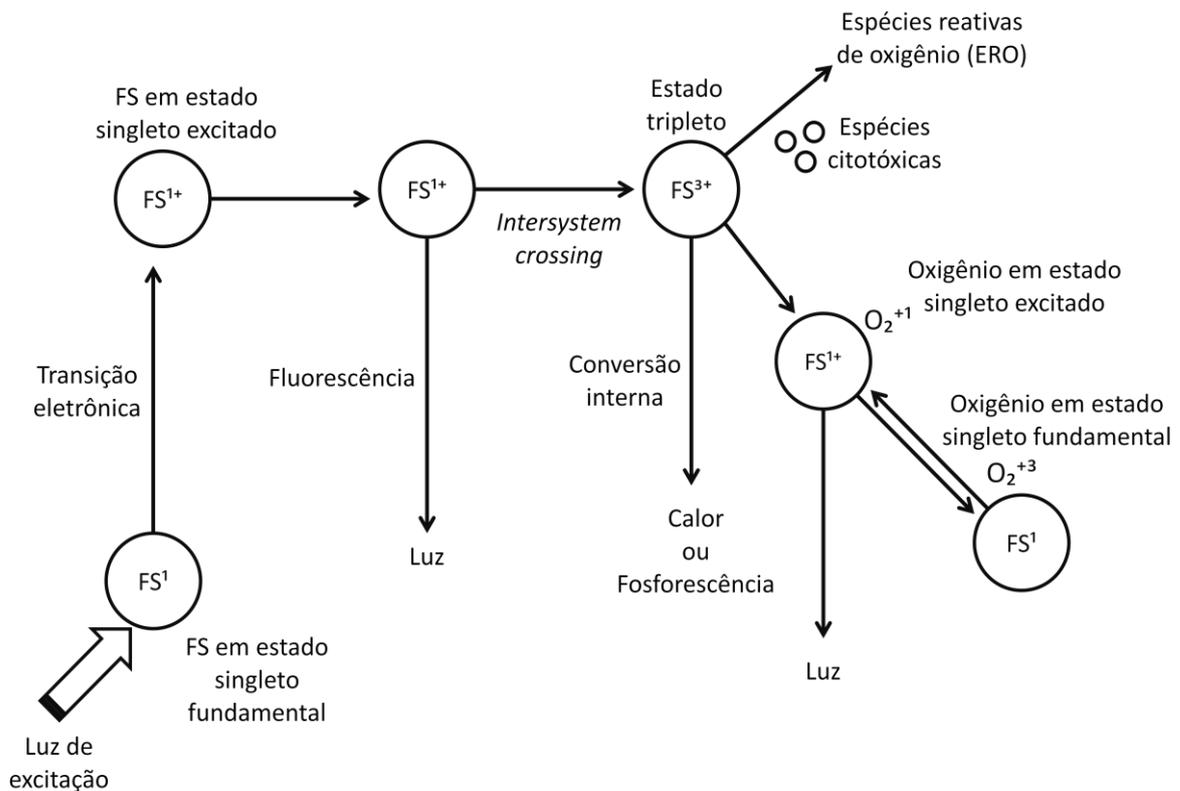


Figura 1. Mecanismos fotoquímicos e fotofísicos da Terapia Fotodinâmica. Dados: Adaptado de Robertson *et al.*, 2009.

A energia do estado tripleto excitado pode ser dissipada na forma de luz fosforescente ou emissão de calor. No entanto, ela também é capaz de induzir importantes transformações químicas a partir de dois caminhos, denominados de reações fotoquímicas do Tipo I ou do Tipo II (Figura 1) (Plaetzer *et al.*, 2009; Yano *et al.*, 2011). Na reação do Tipo I, a energia do estado tripleto do fotossensibilizador pode ser transferida para reagir diretamente com um substrato, como uma membrana celular ou uma biomolécula, transferindo um próton ou um

elétron para a formação de radicais aniônicos ou catiônicos. Esses radicais são capazes de interagir com o oxigênio do meio gerando íons peróxidos, superóxidos e radicais hidroxilas, espécies reativas de oxigênio, ERO. Na reação do Tipo II, a energia do estado tripleto é transferida diretamente para o oxigênio molecular em estado fundamental, produzindo uma espécie altamente reativa, o oxigênio singleto, O_2^{+1} , (Plaetzer *et al.*, 2009; Robertson *et al.*, 2009), sendo este composto considerado como o principal agente citotóxico na TFD (Yano *et al.*, 2011).

As reações tanto do Tipo I como do Tipo II podem ocorrer simultaneamente, e a frequência de cada processo depende das características do fotossensibilizante utilizado, bem como as concentrações de oxigênio e de substrato biomolecular presentes no meio. O oxigênio singleto e as demais ERO são compostos de alta energia capazes de reagir com um grande conjunto de moléculas biológicas presentes no meio, gerando alterações químicas que podem impedir seus corretos funcionamentos. No entanto, devido a essa alta reatividade e à meia-vida de curta duração, as ERO afetam apenas os biocompostos próximos a sua área de produção (Dolmans *et al.*, 2003; Robertson *et al.*, 2009; Yano *et al.*, 2011).

Além das interações dos fenômenos fotoquímicos e fotofísicos, a extensão da citotoxicidade e do dano ocasionado às biomoléculas são dependentes de vários outros fatores. Dentre eles, as propriedades do fotossensibilizante empregado e a dose de exposição à luz destacam-se como elementos centrais da TFD.

1.4.3. Fotossensibilizantes

Os fotossensibilizantes são componentes atóxicos sensíveis à irradiação luminosa que fazem parte dos elementos-chave da Terapia Fotodinâmica. São eles que fazem a transição da energia fotoelétrica para a energia química, essenciais para a geração das espécies reativas de oxigênio (Dolmans *et al.*, 2003; Plaetzer *et al.*, 2009).

Atualmente, um grande número de FS tem sido testado tendo como foco a sua aplicação na TFD. No entanto, ainda são poucos aqueles que revelaram propriedades apropriadas para esse fim (Robertson *et al.*, 2009). Para serem enquadrados como ideais, é necessário que os FS atendam a alguns pré-requisitos, tais como (Nyman & Hynninen, 2004; Plaetzer *et al.*, 2009; Robertson *et al.*, 2009):

- a) alto grau de pureza, estabilidade química e física;
- b) ser atóxico na ausência de luz e em células saudáveis, alta seletividade para células tumorais;

- c) boas condições de solubilidade em meios fisiológicos e de penetração em tecidos biológicos juntamente com baixa taxa de agregação dentro do organismo;
- d) alto rendimento quântico na produção de espécies reativas de oxigênio;
- e) ativação sob luz de comprimento de onda de baixa absorção tissular;
- f) rápida eliminação do organismo por vias de excreção;
- g) simplicidade no processo de síntese, condições viáveis de custo e efetividade para a produção em larga-escala.

Para o sucesso do tratamento da TFD, além do conhecimento das características físico-químicas dos FS, é fundamental a elucidação do seu perfil de interação luminosa com os tecidos biológicos (Robertson *et al.*, 2009). A propagação da luz no meio tissular implica em processos de refração, reflexão, absorção e difração, fatores que na TFD são essenciais na avaliação da distribuição espacial da luz ao atingir o tecido-alvo. Esses processos são, em grande parte, dependentes do tipo de tecido atingido e da faixa de comprimento de onda da luz utilizada (Plaetzer *et al.*, 2009; Robertson *et al.*, 2009).

A fonte de luz utilizada na TFD deve preferencialmente exibir características espectrais que coincidam com a faixa máxima de comprimento de onda de absorção do fotossensibilizante empregado. Dessa forma, é necessária a garantia de que uma quantidade adequada de luminosidade atinja o tecido tratado sem que ocorra perda em sua intensidade (Plaetzer *et al.*, 2009; Robertson *et al.*, 2009).

A absorção de luz nos tecidos é em grande parte devido à presença de cromóforos tissulares, como hemoglobina, mioglobina, melanina e citocromos. O espectro de absorção dessas moléculas define a janela óptica para a aplicação da luz na TFD. O perfil de absorção dessas substâncias biológicas limita em 650-1200 nm a faixa do espectro de absorção adequada para a TFD (Figura 2), que compreende a região do vermelho visível e a do infravermelho próximo (Plaetzer *et al.*, 2009; Robertson *et al.*, 2009). Dessa forma, o emprego de um FS capaz de ser ativado na faixa de absorção da janela óptica dos tecidos biológicos, aprimora a eficácia do tratamento na medida em que aumenta o índice de penetração luminosa ativando o FS com o mínimo de desvio óptico.

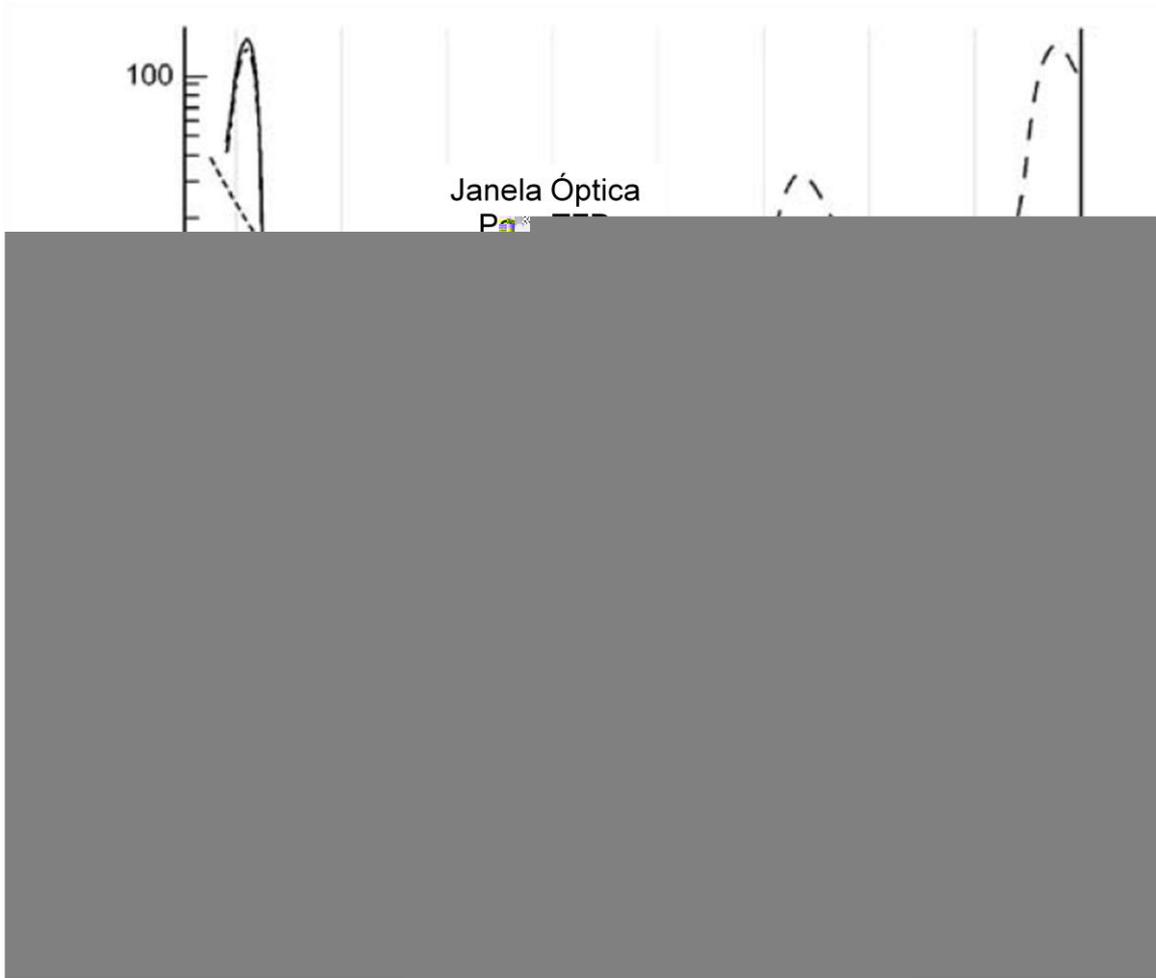


Figura 2. Janela óptica para Terapia Fotodinâmica. Faixa do espectro de absorção adequado para a Terapia Fotodinâmica entre 650-1200 nm. Dados: Adaptado de Plaetzer *et al.*, 2009.

1.4.3.1. Fotossensibilizantes de primeira geração

Os primeiros fotossensibilizantes utilizados na TFD foram as hematoporfirinas e seus derivados, em que Hausmann realizou os primeiros estudos, em 1911, sobre os efeitos biológicos da hematoporfirina ao ser exposta à luz. Em meados de 1960, Lipson e colaboradores demonstraram as propriedades da hematoporfirina na localização de tumores. A partir de então, as porfirinas passaram a se tornar a classe de fotossensibilizantes mais intensamente pesquisada (Ackroyd *et al.*, 2001; Dolmans *et al.*, 2003; Nyman & Hynninen, 2004).

Entretanto, a primeira geração de FS está associada a várias limitações, como: prolongada retenção cutânea do fármaco e fotossensibilidade prolongada das áreas expostas à luz, capazes de ocasionar lesões cutâneas significativas (Nyman & Hynninen, 2004; Kolarova *et al.*, 2007).

1.4.3.2. Fotossensibilizantes de segunda geração

Os pontos negativos apresentados pela primeira geração de FS conduziram à procura por formulações de maior eficiência, originando a segunda geração de fotossensibilizantes. Derivados de porfirinas, grande parte deste grupo de FS são baseados em porfirínicos modificados que apresentam perfil de absorção em faixas de comprimentos de onda longos, mais próximos da região do vermelho, e incluem moléculas sintéticas ou naturais (Nyman & Hynninen, 2004; Phillips, 2010).

Em geral, os compostos da segunda geração apresentam características mais favoráveis para a aplicação na TFD em comparação aos da primeira geração de FS, tais como: elevado rendimento quântico na geração de oxigênio singlete, maior estabilidade química e física, atóxico em ausência de luz, alto grau de pureza química e redução de efeitos secundários (Nyman & Hynninen, 2004; Yano *et al.*, 2011). Atualmente, alguns compostos já estão sendo estudados em testes clínicos desde a fase I até a fase III, e algumas das principais classes de FS estudadas com aplicação terapêutica são: texafirinas, clorinas, feoforbídeos, purpurinas, protoporfirinas, derivados de benzoporfirinas e ftalocianinas (Phillips, 2010; Yano *et al.*, 2011).

1.4.3.3. Fotossensibilizantes de terceira geração

O desenvolvimento de fotossensibilizantes de terceira geração consiste na conjugação de FS a compostos biologicamente ativos, tais como: anticorpos, peptídeos e ácido fólico (Yano *et al.*, 2011), e mais recentemente, a associação de FS a carreadores nanoestruturados como lipossomos e compostos nanopoliméricos.

Dentre as diferentes gerações de FS, esta classe tem apresentado resultados promissores no aprimoramento de suas propriedades para a aplicação em TFD, com destaque para o direcionamento sítio-específico, conduzindo à elevada acumulação do composto em tecido tumoral (Castano *et al.*, 2005; Yano *et al.*, 2011).

1.4.4. Alumínio-Cloro Ftalocianina

As ftalocianinas constituem uma classe de FS amplamente estudada que tem apresentado bons resultados em aplicações na TFD. Derivadas de azoporfirinas, as ftalocianinas possuem alto coeficiente de absorção espectral na faixa de comprimentos de onda longos, entre 650-850 nm, correspondendo ao intervalo da região do vermelho visível e com maior poder de penetração tissular (Allison *et al.*, 2004). Dentre as demais vantagens dos

derivados de ftalocianina estão: elevada capacidade de produção de ERO comparadas a outros FS, alto potencial seletivo de agregação a células tumorais e rápida eliminação do organismo.

Pertencente a uma nova geração de substâncias, as ftalocianinas são capazes de se ligar a uma variedade de compostos metálicos, principalmente alumínio e zinco (Martins *et al.*, 2004; Kolarova *et al.*, 2007), a presença e a natureza do íon metálico central influencia fortemente as propriedades fotofísicas do fotossensibilizante. Estruturas complexas resultantes da combinação de ftalocianina com íons magnéticos, como zinco, alumínio, gálio e silício, conduzem a uma elevada capacidade de geração e a um aumento na durabilidade do estado tripleto eletrônico, essencial para a eficiência das reações fotoquímicas (Maftoum-Costa *et al.*, 2008; Durmus & Ahsen, 2010). Nesse sentido, estudos têm apontado o complexo Alumínio-Cloro Ftalocinina (AlClPc) como um dos mais favoráveis para a aplicação na TFD (Maftoum-Costa *et al.*, 2008).

Apesar das vantagens apontadas acima, um dos entraves à utilização das ftalocianinas e de seus derivados na TFD, e da maioria dos FS, deve-se a sua alta hidrofobicidade, possuindo baixa solubilidade em meios fisiológicos hidrofílicos, o que gera dificuldades em seu transporte através dos sistemas biológicos e eleva drasticamente o potencial de agregação do FS (Allison *et al.*, 2004; Maftoum-Costa *et al.*, 2008). A agregação do FS afeta suas propriedades fotofísicas, com a redução na formação de O_2^{+1} ; químicas, com o decréscimo nas taxas de solubilidade; e biológicas, como dificuldades no transporte em meios fisiológicos, em comparação às espécies monoméricas, que são as formas fotoativas ideais (Maftoum-Costa *et al.*, 2008).

Uma alternativa para o direcionamento do FS para sítios específicos em sistemas fisiológicos consiste em seu carreamento em formulações nanoestruturadas. Essa estratégia permite a manutenção da forma monomérica do FS em meios hidrofílicos e aumento no controle da seletividade, uma vez que alterações na composição dos nanovetores, como a adição de grupos funcionais, podem ser feitos de forma a adequá-los para o transporte e direcionamento às células e tecidos-alvo em meio fisiológico (Ferrari, 2005; Wang & Thanou, 2010).

Ao serem direcionados, os nanocarreadores potencializam o nível de absorção do FS em células tumorais. Além disso, a nanopartícula pode evitar a degradação do FS dentro do organismo antes que o mesmo atinja o sítio-alvo, além de protegê-lo da interação com células saudáveis, evitando a ocorrência de efeitos secundários (NIH, 2011). No entanto, a utilização de nanocarreadores deve obedecer a certas condições, como: biocompatibilidade, preservar a

integridade das características originais dos FS vetorizados e seletividade às células-alvo (Ferrari, 2005).

Como citado anteriormente, atualmente há vários tipos de nanossistemas empregados no direcionamento de fotossensibilizantes com aplicação à TFD, em que as principais se incluem: lipossomos, imunolipossomos (Allison *et al.*, 2004; Derycke & Witte, 2004), nanopartículas de ouro (Cheng *et al.*, 2008), nanoemulsões e nanopartículas poliméricas (Dolmans *et al.*, 2003; Chatterjee *et al.*, 2008).

1.4.5. Nanopartículas poliméricas

Entre as diversas plataformas nanotecnológicas utilizadas na vetorização de FS na TFD, destaca-se as nanopartículas poliméricas, que têm recebido grande atenção como potenciais carreadores de fotossensibilizantes devido a diversas características, tais como (Bechet *et al.*, 2008; Chatterjee *et al.*, 2008):

- a) alto rendimento na captação de FS;
- b) arquitetura e estrutura química que permitem adaptações a compostos de diferentes graus de hidrofobicidade, massas moleculares e cargas iônicas;
- c) estrutura que apresenta capacidade de manutenção da atividade fotodinâmica de FS hidrofóbicos em meios hidrofílicos;
- d) flexibilidade das propriedades de superfície que permite a incorporação de grupos funcionais para direcionamento sítio-específico;
- e) característica não imunogênica que evita a ativação de resposta imunológica ao ser introduzido no organismo;
- f) propriedades e composição que podem ser otimizadas para o controle da degradação do polímero e de sistemas de liberação controlada de FS.

Existe uma grande variedade de materiais e processos de síntese de nanopolímeros, os quais podem ser separados em duas grandes categorias: não-biodegradáveis e biodegradáveis (Bechet *et al.*, 2008; Chatterjee *et al.*, 2008).

1.4.5.1. Nanopartículas não-biodegradáveis

Nanopartículas não-biodegradáveis são compostos que não são usualmente empregados em sistema de entrega de drogas, visto que não ocorre a degradação e a liberação do FS de seu carreador, dessa forma, o FS permanece protegido do meio e não oferece

toxicidade às células adjacentes (Bechet *et al.*, 2008; Chatterjee *et al.*, 2008). A estratégia de ação funciona como um catalisador na síntese de produtos tóxicos a partir do oxigênio dissolvido no meio, portanto, é essencial que ocorra a livre difusão de oxigênio através da nanopartícula (Chatterjee *et al.*, 2008).

Alguns dos compostos mais estudados atualmente baseiam-se em composições de sílica, ouro e nanopartículas magnéticas. Ao longo de seu mecanismo de ação, as nanopartículas não sofrem degradação e podem ser utilizadas repetidamente por meio de ativação apropriada (Bechet *et al.*, 2008; Chatterjee *et al.*, 2008). Dentre as vantagens no uso desse sistema destacam-se: estabilidade em ambientes com flutuações de temperatura e alterações de pH; compostos não reativos como a sílica não são sujeitos a ataques microbianos; o tamanho, a forma e a porosidade podem ser facilmente regulados durante o processo de síntese (Bechet *et al.*, 2008).

Apesar dos aspectos positivos citados acima, o emprego de nanopolímeros não-biodegradáveis na TFD enfrenta alguns entraves. A eficiência da TFD baseia-se principalmente na produção de oxigênio singlete, e para a formação deste composto é essencial que haja a difusão de oxigênio molecular através das nanopartículas, uma vez que não ocorre a liberação do FS. No entanto, como a meia-vida do oxigênio singlete em meio fisiológico possui duração na ordem de microsegundos, a rapidez necessária para a reação do O_2^{+1} com compostos biológicos torna a indução de toxicidade extremamente localizada (Bechet *et al.*, 2008).

1.4.5.2. Nanopartículas biodegradáveis

Nanopartículas biodegradáveis são sintetizados a partir de polímeros que são capazes de serem degradados em ambientes fisiológicos com liberação do fotossensibilizante. A eficiência na indução de fototoxicidade do composto é dependente da natureza do polímero (Bechet *et al.*, 2008).

Alguns dos sistemas mais estudados atualmente com emprego em TFD englobam poliésteres como o poli(ácido lático), PLA; poli(ácido glicólico), PGA; e o copolímero resultante entre estes, o poli(ácido lático-co-glicólico), PLGA (Paszko *et al.*, 2011). No entanto, mesmo técnicas convencionais que têm apresentado bons resultados também tem sido observado alguns aspectos negativos, como a dificuldade de ligação entre FS e seu nanocarreador, e dessa forma, a captação do FS pela célula-alvo (Chatterjee *et al.*, 2008; Paszko *et al.*, 2011).

As inconveniências apontadas acima conduzem à necessidade de desenvolvimento de novos materiais. Nesse contexto, destaca-se o poli(vinil metil éter-co-anidrido maleico), PVM/MA, um copolímero sintético amplamente utilizado em aplicações farmacêuticas como agentes espessantes e de suspensão, adesivos de próteses dentárias e adjuvantes no preparo de emplastos transdermais (Arbós *et al.*, 2002; Irache *et al.*, 2005).

Várias características apontam o PVM/MA como potencial sistema nanopolimérico para o emprego no direcionamento de fotossensibilizantes com aplicação à TFD, tais como: biocompatibilidade, estrutura química que possibilita a conjugação a FS, propriedades de bioaderência, flexibilidade das propriedades de sua estrutura e baixo custo (Irache *et al.*, 2005; Gómez *et al.*, 2007). Nesse sentido, Muehlmann (2011) desenvolveu uma formulação constituída de Alumínio-Cloro Ftalocianina associado ao PVM/MA com potencial para ser utilizada como fotossensibilizante de terceira geração para Terapia Fotodinâmica antineoplásica. O autor descreveu as caracterizações coloidais, fotoquímicas e fotofísicas, bem como a capacidade de geração de O_2^{+1} dessa formulação.

Entretanto, a eficácia de um FS é também determinada pela sua capacidade de induzir danos a células tumorais. Assim, faz-se necessária a realização de testes biológicos capazes de determinar a toxicidade e a genotoxicidade da formulação constituída de Alumínio-Cloro Ftalocianina associado ao PVM/MA.

Objetivos

2. Objetivos

Diante do exposto na seção anterior, este trabalho teve como objetivo geral analisar a eficácia de um novo material nanoestruturado polimérico composto por Alumínio-Cloro Ftalocianina associado ao poli(vinil metil éter-co-anidrido maleico), PVM/MA, na aplicação em Terapia Fotodinâmica contra células tumorais, em um estudo *in vitro*.

Para tal, foram estabelecidos os seguintes objetivos específicos:

- determinar o perfil de incorporação do fotossensibilizante Alumínio-Cloro Ftalocianina quando associado ao copolímero poli(vinil metil éter-co-anidrido maleico), PVM/MA, por células tumorais e não-tumorais *in vitro*;
- avaliar os possíveis efeitos citotóxicos do PVM/MA não associado ao AICIPc em células tumorais e não-tumorais *in vitro*;
- avaliar os possíveis efeitos citotóxicos do AICIPc associado ao copolímero PVM/MA, AICIPc-NP, não irradiado em células tumorais e não-tumorais *in vitro*;
- avaliar o efeito fotodinâmico do fármaco AICIPc-NP em células tumorais e não-tumorais *in vitro*;
- determinar o perfil de morte celular induzido pela Terapia Fotodinâmica mediada pelo AICIPc-NP em células tumorais e não-tumorais *in vitro*;
- determinar o perfil de fragmentação do DNA induzido pela Terapia Fotodinâmica mediada pelo AICIPc-NP em células tumorais e não-tumorais *in vitro*.

Materiais e Métodos

3. Materiais e Métodos

3.1. Equipamentos, Materiais e Reagentes

Tabela 1. Lista de Equipamentos

Equipamentos	Modelo	Fabricante
Agitador de tubos	Vortex-Genie 2	Daigger & Co., Inc., USA
Balança analítica	AA200	Denver Instrument Company, USA
Bomba a vácuo	TE058	Tecnal, BRA
Banho-maria	-	Jprolab, BRA
Câmera fotomicroscópica	AxioCam MRc 5	Zeiss Inc., DE
Centrífuga de bancada	Excelsa baby	Fanem, BRA
Citômetro de Fluxo	Cyflow	Partec, DE
Espectrofotômetro	Spectramax M2	Molecular Devices, USA
Fluxo Laminar	CFLV 12	Veco, BRA
Incubadora de CO ₂	Series 8000 WJ	Thermo Scientific Inc., USA
Laser Diodo 670 nm	<i>BWF Light Source-Tech</i>	B&W Tek Inc., USA
Microcentrífuga refrigerada	Mikro 22R	Hettich, DE
Microscópio de fluorescência	AxioVert 100	Zeiss, DE
Microscópio de luz invertido	Ck 12	Olympus, JPN

Tabela 2. Lista de Materiais

Materiais	Fabricante
Criotubos	TPP, CHE
Microtubos de centrifugação	Axygen, USA
Filtro para seringa (0,22 μm)	TPP, CHE
Frascos de cultura (25 cm^2 , 75 cm^2)	TPP, CHE
Hemocitômetro de Neubauer	C. A. Hausser & Son, USA
Micropipetas	Gilson, Inc., USA
Microplaca escura	Greiner Bio-one, BRA
Microplaca para cultura de células	TPP, CHE
Lâminas para microscopia	Bioslide
Lamínulas para microscopia	Exacta Perfecta, BRA
Ponteiras para micropipetas	Axygen, USA
Seringas	Advantive, NLD
Tubos de centrifugação	TPP, CHE
Tubos para citometria de fluxo	Sarstedt, DE

Tabela 3. Lista de Reagentes

Reagentes	Fabricante
Alaranjado de Acridina	Sigma-Aldrich Co., USA
Antibiótico (Penicilina e Estreptomicina)	Gibco, USA
Azul Trypan	Sigma-Aldrich Co., USA
Bicarbonato de Sódio	Sigma-Aldrich Co., USA
Brometo de Etídio	Sigma-Aldrich Co., USA
Citrato de Sódio	Vetec Química Fina Ltda, BRA
DMSO	Mallinckrodt Chemicals, USA
DMEM	Gibco, USA
EGF	Sigma-Aldrich Co., USA
Ham's F12	Gibco, USA
Hidrocortisona	Sigma-Aldrich Co., USA
Insulina Bovina	Sigma-Aldrich Co., USA
Iodeto de Propídio	Invitrogen, USA
MTT	Invitrogen, USA
RNase	Invitrogen, USA
Soro Equino	Gibco, USA
Soro Fetal Bovino	Gibco, USA
PBS	Laborclin, BRA
Toxina Colérica	Sigma-Aldrich Co., USA
Tripsina-EDTA	Gibco, USA
Triton X-100	Sigma-Aldrich Co., USA

3.2. Solução Nanopolimérica de Alumínio-Cloro Ftalocianina

Soluções descongeladas do copolímero PVM/MA associado à Alumínio-Cloro Ftalocianina, AICIPc-NP, foram utilizadas durante os experimentos. As amostras nanopoliméricas, foram sintetizadas previamente de acordo com o método descrito por Muehlmann (2011) no Laboratório de Nanobiotecnologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, em que as principais características do AICIPc-NP foram descritas:

- a) Diâmetro hidrodinâmico: $206,2 \pm 4,6$ nm
- b) Índice de polidispersão (PDI): $0,05 \pm 0,01$
- c) Potencial zeta: $-20,4 \pm 0,61$ mV
- d) Carga de ftalocianina/polímero: $0,9$ $\mu\text{g}/\text{mg}$

3.3. Linhagens Celulares

No presente estudo foram utilizadas quatro linhagens celulares imortalizadas, sendo duas linhagens murinas e duas humanas, Tabela 4. A linhagem murina tumoral (4T1) foi cedida pela Dr. Suzanne Ostrand-Rosenberg, Maryland, EUA. Já a linhagem murina não-tumoral (NIH/3T3) foi obtida do banco de células do Rio de Janeiro, RJBC, Brasil. A linhagem humana tumoral (MCF-7) foi obtida do banco de células American Type Culture Collection, ATCC.

A linhagem derivada de glândula mamária humana, MCF-10A, empregada no presente trabalho foi gentilmente cedida pela Prof. Dr. Maria Mitzi Brentani da Universidade de São Paulo, USP. Todas as linhagens são mantidas em cultura no Laboratório de Nanobiotecnologia da Universidade de Brasília, UnB.

Tabela 4. Linhagens celulares utilizadas no presente estudo.

Linhagens Celulares	Descrição
Humanas	
MCF-7	Adenocarcinoma mamário
MCF-10A	Epiderme mamária não tumoral
Murinas	
4T1	Carcinoma epidermóide mamário
NIH/3T3	Fibroblasto embrionário não tumoral

3.3.1. Manutenção das células

Alíquotas de células em concentração de 2×10^6 células/mL foram retiradas de estoque de nitrogênio líquido e descongeladas a 37 °C. Como meio de cultura para as linhagens NIH/3T3, 4T1 e MCF-7 foi utilizado o DMEM estéril tamponado com bicarbonato de sódio suplementado com soro fetal bovino a 10% e antibiótico (100 UI/mL penicilina e 100 µg/mL streptomina) a 1%, pH 7,2. Para a linhagem MCF-10A o meio de cultura utilizado foi o DMEM/F12 estéril suplementado com soro equino a 5%, EGF a 20 ng/mL, insulina bovina a 10 µg/mL, hidrocortisona a 0,5 µg/mL, toxina colérica a 100 ng/mL e antibiótico (100 IU/mL penicilina e 100 µg/mL streptomina) a 1%.

Após o descongelamento, 500 microlitros das alíquotas de células eram adicionados a três mililitros de meio de cultura e submetidos a centrifugação à 750 g por três minutos. Em seguida, o precipitado era ressuspensão em um mililitro de meio de cultura, transferido para frasco de cultura de células e mantido em incubadora a 37 °C, em atmosfera contendo 5% de CO₂ e 80% de umidade.

3.3.2. Estabelecimento de subculturas

O estabelecimento de subculturas era feito a partir da remoção de uma monocamada de células confluentes em frasco de 75 cm² de cultura inicial e transferência de menor densidade celular para um novo frasco. As células eram removidas a partir do descarte do meio de cultura do frasco inicial e tratamento com três mililitros de solução de tripsina-EDTA por três minutos a 37 °C. Em seguida, eram acrescentados três mililitros de meio de cultura para a inativação da atividade da enzima e o preparado era submetido à centrifugação a 750 g por dois minutos. Após esta etapa, o sobrenadante era descartado e as células ressuspensas em um mililitro de meio de cultura.

Para a determinação da quantidade de células viáveis, dez microlitros da suspensão eram adicionadas a 40 µL de solução de Azul Trypan, este corante não é capaz de penetrar em células que apresentam a membrana plasmática intacta, o que torna possível a distinção das células viáveis a partir do princípio de exclusão do Azul Trypan. Dez microlitros do preparado contendo o corante eram retirados e aplicados em hemocitômetro de Neubauer. A concentração de células era determinada baseando-se em seus quadrantes laterais e de acordo com a equação abaixo:

$$\frac{\text{Número de células contadas}}{\text{Número de quadrantes contados}} \times \text{Fator de diluição} \times 1 \times 10^4 = \text{Número de células / mL}$$

Após a contagem, cerca de 10% das células iniciais eram transferidas para novo frasco de cultura e mantidas em incubadora a 37 °C, em atmosfera contendo 5% de CO₂ e 80% de umidade. Para a manutenção das células, renovava-se o meio de cultura a cada 48h. Todas as linhagens de células utilizadas neste estudo foram empregadas respeitando o limite máximo de dez passagens para a formação de subculturas. Após este limite, as células eram descartadas. Para a realização dos experimentos, após a quantificação, células de todas as linhagens eram transferidas para microplacas de cultura de acordo com o experimento a ser realizado.

3.4. Perfil de Incorporação do fotossensibilizante Alumínio-Cloro Ftalocianina associado ao copolímero poli(vinil metil éter-co-anidrido maleico) por células *in vitro*

De acordo com o estudo de incorporação conduzido por Muehlmann (2011) em microscopia confocal, o AlClPc-NP é incorporado e distribui-se apenas no citoplasma de células da linhagem 4T1. Dessa forma, foram realizados testes para o delineamento do perfil cinético de incorporação dessas nanopartículas por células tumorais e não-tumorais. Para isso, aproximadamente 3 x 10³ células foram transferidas para cada poço de microplacas de cultura de 96 poços.

Após 24h de incubação e a formação de uma monocamada de células nas condições descritas na seção 3.3.1, o meio de cultura inicial foi substituído por 200 µL de meio de cultura contendo suspensão de AlClPc-NP em concentração equivalente a 0,25 µM de AlClPc. As células foram então expostas à AlClPc-NP por: um, cinco, dez, quinze, trinta e sessenta minutos. Após os intervalos de tempo estabelecidos, a suspensão de AlClPc-NP foi removida e as células foram submetidas a duas lavagens com PBS. As células foram então lisadas com DMSO para a liberação da AlClPc incorporada. Após esse procedimento, 200 µL do lisado celular foram coletados e colocados em espectrofotômetro para a quantificação da fluorescência emitida pela AlClPc incorporada pelas células. Os comprimentos de onda utilizados foram: excitação de 350 nm e emissão de 690 nm.

Os grupos controle consistiram em células não expostas ao AlClPc-NP, grupo controle negativo, e de solução contendo AlClPc-NP sem a presença de células, grupo controle

positivo. A frequência de emissão de fluorescência foi calculada tendo como padrão inicial, 100%, os valores de fluorescência do grupo controle positivo. Os valores obtidos nos diferentes tempos de observação foram normalizados e calculados a partir desse padrão inicial.

A retenção do fármaco pelo material componente dos poços das microplacas expostas ao AICIPc-NP foi constante e seus resultados foram subtraídos dos demais para cada replicata. Todos os testes foram realizados em experimentos independentes em quintuplicata.

3.5. Fonte de *laser*

Os testes com exposição luminosa foram realizados com o uso de um equipamento com sistema emissor de *laser* com comprimento de onda de emissão de 670 nm, acoplado a fibra ótica e com potência máxima de saída de 50 mW.

Para a determinação da quantidade de energia luminosa a ser aplicada às células, foi empregada a expressão de densidade de energia, cujo parâmetro representa a quantidade de energia incidida sobre uma área estabelecida. Dessa forma, a densidade de energia aplicada nos ensaios foi determinada de acordo com a equação abaixo (Stoker, 2005):

$$\frac{\text{Potência (W)} \times \text{Tempo de incidência (s)}}{\text{Área do feixe de } \textit{laser} \text{ (cm}^2\text{)}} = \text{Densidade de Energia (J/cm}^2\text{)}$$

3.6. Determinação da viabilidade celular

Este ensaio, com base no trabalho de Mosmann (1983), é uma avaliação da citotoxicidade em células eucarióticas por meio do método colorimétrico de brometo de 3 (4,5 dimetiltiazol-2il)-2,5-difenil-tetrazólio, MTT. Em células viáveis, desidrogenases mitocondriais, em especial a succinil desidrogenase, promovem a redução do reagente MTT em um composto conhecido como formazan, que apresenta coloração púrpura e é insolúvel em meios hidrofílicos. Dessa forma, a quantificação da produção de formazan permite correlacioná-la à presença destas desidrogenases ativas, o que pode ser considerado como um indicativo de viabilidade celular.

Para a realização do MTT, em cada poço o meio de cultura foi substituído por 200 μ L de um novo meio contendo MTT (5 mg/mL) a 10%. O preparado foi incubado a 37 °C em condições de cultivo descritas na seção 3.3.1. Após três horas, removeu-se a solução contendo MTT e foram adicionados 200 μ L de DMSO para a solubilização dos cristais de formazan. A quantificação do formazan foi realizada pela medida do espectro de absorbância com

comprimento de onda de 595 nm em espectrofotômetro conjugado à leitora de microplacas. Esse ensaio foi realizado em dois experimentos independentes em quintuplicata.

3.6.1. Efeito do *laser* na viabilidade celular

A finalidade desse ensaio consistiu em determinar se apenas o feixe de *laser*, sem a presença do fármaco, era capaz de induzir toxicidade em estruturas celulares, e assim conduzir à morte celular.

Para esse teste, células com concentração inicial de 3×10^3 células/poço eram cultivadas em microplacas de 96 poços nas condições descritas na seção 3.3.1. Após o período de 24h de incubação, o meio de cultura inicial foi descartado e as células foram submetidas a duas lavagens com PBS. Em seguida, as células foram expostas a 200 μ L de PBS e irradiadas sob as seguintes densidades de energia: 3,82 J/cm²; 11,46 J/cm²; 22,93 J/cm² e 34,39 J/cm². Logo após, o PBS foi removido e as células foram cultivadas sob as condições descritas na seção 3.3.1 por 24h. Em seguida, o possível efeito do *laser* na viabilidade celular foi determinado por MTT conforme descrito na seção 3.6.

3.6.2. Determinação da toxicidade do copolímero poli(vinil metil éter-co-anidrido maleico)

Esse teste teve como finalidade a verificação da possibilidade do PVM/MA, sem estar associado ao fotossensibilizante AICIPc, induzir toxicidade em células eucarióticas.

Diante do exposto, células com concentração inicial de 3×10^3 células/poço eram cultivadas em microplacas de 96 poços nas condições descritas na seção 3.3.1. Após 24h de incubação, o meio de cultura inicial foi descartado e as células foram submetidas a duas lavagens com PBS. Logo após a lavagem, as células foram expostas a 200 μ L de suspensão contendo o copolímero PVM/MA nanoparticulado não associado a AICIPc em meio de cultura nas seguintes concentrações: 0,80 μ M; 1,60 μ M; 3,19 μ M; 6,39 μ M; 12,78 μ M; 25,55 μ M; e 38,33 μ M. As microplacas foram recobertas com folha de alumínio e incubadas a 37 °C sob atmosfera de 5% e umidade relativa de 80% por 15 min para todas as linhagens celulares. Para a linhagem MCF-10A as células também foram incubadas por 30 min. Após os períodos estabelecidos, o preparado foi descartado e as células submetidas a duas lavagens com PBS e incubadas sob as condições descritas na seção 3.3.1 por 24h. Na sequência, foi determinada a viabilidade celular por meio do ensaio de MTT conforme descrito na seção 3.6.

3.6.3. Determinação da toxicidade do Alumínio-Cloro Ftalocianina associado ao copolímero poli(vinil metil éter-co-anidrido maleico)

Após a definição do espaço de tempo necessário para a incorporação do AICIPc-NP pelas células, descrita na seção 3.4, foram realizados testes para a determinação das concentrações do fármaco capazes de induzir toxicidade nas células na ausência de exposição à irradiação luminosa.

Para tanto, 3×10^3 células/poço eram cultivadas em microplacas de 96 poços nas condições descritas na seção 3.3.1. Após 24h de incubação, o meio de cultura inicial foi descartado e as células foram submetidas a duas lavagens com PBS. Após essa etapa, as células foram expostas a 200 μ L de meio de cultura contendo o AICIPc-NP nas seguintes concentrações: 0,25 μ M; 0,5 μ M; 1,0 μ M; 2,0 μ M; 4,0 μ M; 8,0 μ M e 12,0 μ M. As microplacas foram então recobertas com folha de alumínio e incubadas em ausência de luminosidade a 37 °C sob atmosfera de 5% e umidade relativa de 80% por 15 min para todas as linhagens celulares. Células da linhagem MCF-10A também foram incubadas por 30 min. Após os períodos descritos, o meio foi descartado e as células submetidas a duas lavagens com PBS e incubadas sob as condições descritas na seção 3.3.1 por 24h. Em seguida, foi determinada a viabilidade celular por meio do ensaio de MTT conforme descrito na seção 3.6.

3.6.4. Terapia Fotodinâmica mediada pelo Alumínio-Cloro Ftalocianina associado ao copolímero poli(vinil metil éter-co-anidrido maleico)

Este teste foi realizado de modo a avaliar a eficácia do AICIPc-NP como fotossensibilizante a ser empregado na Terapia Fotodinâmica.

Nesse sentido, 3×10^3 células/poço foram cultivadas em microplacas de 96 poços nas condições descritas na seção 3.3.1. Após 24h de incubação, o meio de cultura inicial foi descartado e as células foram submetidas a duas lavagens com PBS. Após essa etapa, as células foram incubadas em 200 μ L de meio de cultura contendo AICIPc-NP nas seguintes concentrações: 0,25 μ M; 0,5 μ M; 1,0 μ M e 2,0 μ M. As microplacas foram então recobertas com folha de alumínio e incubadas em ausência de luminosidade a 37 °C sob atmosfera de 5% e umidade relativa de 80% por 15 min para todas as linhagens celulares. Para a linhagem MCF-10A as células também foram incubadas por 30 min.

Após o período de incubação com a suspensão de AICIPc-NP, as células foram lavadas duas vezes com PBS e submetidas à irradiação luminosa sob as seguintes densidades de energia: 0,48 J/cm²; 1,38 J/cm² e 3,82 J/cm². Na sequência, o PBS foi removido e as células

foram cultivadas sob as condições descritas na seção 3.3.1 por 24h. Em seguida, foi determinada a viabilidade celular por meio do ensaio de MTT conforme descrito na seção 3.6.

3.7. Avaliação do perfil de morte celular por Alaranjado de Acridina/Brometo de Etídio

Com a finalidade de detectar e avaliar a frequência do mecanismo de morte celular induzido pela TFD mediada por AICIPc-NP, foi realizado o teste colorimétrico por alaranjado de acridina/brometo de etídio, AO/EB, intercalantes fluorescentes de material genético. Este método combina a diferença de captação do AO/EB pelas células e os aspectos morfológicos do padrão de condensação da cromatina corada, possibilitando a distinção entre células viáveis, em apoptose ou em necrose (Takahashi *et al.*, 2004).

Este ensaio é possível pois o corante alaranjado de acridina é capaz de penetrar tanto em células viáveis como em não-viáveis, emitindo fluorescência verde como resultado de sua intercalação com a dupla-fita de DNA e fluorescência vermelho-alaranjada resultante da ligação com o RNA de fita-simples, que se encontra em grande parte acumulado nos lisossomos. O corante brometo de etídio emite fluorescência vermelha devido à intercalação com o DNA apenas em células que apresentam alterações na membrana plasmática, ou seja, células em estágio de necrose ou apoptose tardia (Kosminder *et al.*, 2004; Takahashi *et al.*, 2004).

Para a realização desse teste, primeiramente fez-se necessário a determinação por análises estatísticas da LC_{50} , concentração de uma substância em um meio que ocasiona mortalidade em 50% da população exposta, para a irradiação com densidade de energia de $0,48 \text{ J/cm}^2$, Tabela 5. Em seguida, 3×10^4 células/poço foram cultivadas em microplacas de 12 poços nas condições descritas na seção 3.3.1. Após 24h de incubação, o meio de cultura inicial foi descartado e as células foram submetidas a duas lavagens com PBS. Na sequência, foram adicionadas às células 400 μL de meio de cultura contendo AICIPc-NP em concentrações correspondentes a LC_{50} : 0,31 μM ; 0,63 μM ; 1,80 μM e 0,46 μM para as células 4T1, NIH/3T3, MCF-7 e MCF-10A respectivamente.

As microplacas foram então recobertas com folha de alumínio e incubadas em ausência de luminosidade a 37°C sob atmosfera de 5% e umidade relativa de 80% por 15 min para as linhagens 4T1, NIH/3T3 e MCF-7. Para a linhagem MCF-10A as células foram incubadas por 30 min. Após o período de incubação com a suspensão de AICIPc-NP, as células foram lavadas duas vezes com PBS e submetidas à irradiação luminosa sob a densidade de energia

de 0,48 J/cm² e 1,38 J/cm². Na sequência, o PBS foi removido e as células foram cultivadas sob as condições descritas no item 3.3.1 por 24h.

Tabela 5. Concentrações de AICIPc-NP relativas à LC₅₀ sob irradiação luminosa com densidade de energia igual a 0,48 J/cm² para cada linhagem celular.

Linhagem Celular	LC ₅₀ (μM)
4T1 *	0.31
NIH/3T3 *	0.63
MCF-7 *	1.80
MCF-10A *	-
MCF-10A **	0.46

* Após 15 min de exposição

** Após 30 min de exposição

Vinte e quatro horas após o tratamento, o meio de cultura inicial foi retirado e reservado. Em seguida, as células foram removidas a partir de tratamento com 500 μL de solução de tripsina-EDTA por três minutos a 37 °C. Na sequência, o meio de cultura reservado previamente foi adicionado à suspensão celular para a inativação da enzima e para permitir posteriormente a análise das células aderidas e das não-aderidas à placa de cultura. O preparado foi submetido à centrifugação a 750 g por três minutos. Após esta etapa, o sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 50 μL de PBS e incubadas com solução de alaranjado de acridina (100 μg/mL) e brometo de etídio (100 μg/mL) na proporção 1:1 por cinco minutos em ambiente ausente de luminosidade. Dez microlitros da suspensão de células foram depositados no centro de uma lâmina de vidro para microscopia e recobertos com uma lamínula. As células foram imediatamente analisadas e quantificadas em microscópio de fluorescência contendo filtro de 540 nm. A aquisição das imagens foi feita com o uso de câmera fotomicroscópica digital, sendo avaliadas 100 células por replicata. Esse teste foi realizado em dois experimentos independentes em triplicata.

3.7.1. Critérios para a classificação das células em viáveis, em apoptose e em necrose

A detecção e a quantificação das células em diferentes mecanismos de morte celular foi realizada de acordo com o perfil de ação do AO/EB ao penetrar as células viáveis e não-viáveis, conforme explicado na seção 3.10. Nesse contexto, três estágios podem ser identificados por meio desse ensaio:

- 1) células viáveis: apresentam coloração verde uniforme para o núcleo e vermelho-alaranjado para o citoplasma, Figura 3A.
- 2) apoptose: a membrana celular encontra-se parcialmente alterada podendo permitir a entrada do brometo de etídio. Junto a isso, a fragmentação e a condensação da cromatina, gerando corpos apoptóticos, podem ser observadas. As células apresentam coloração verde com possíveis manchas avermelhadas, Figura 3B.
- 3) necrose: a membrana celular encontra-se alterada o que permite a passagem de brometo de etídio. As células apresentam coloração vermelha uniforme, Figura 3C.

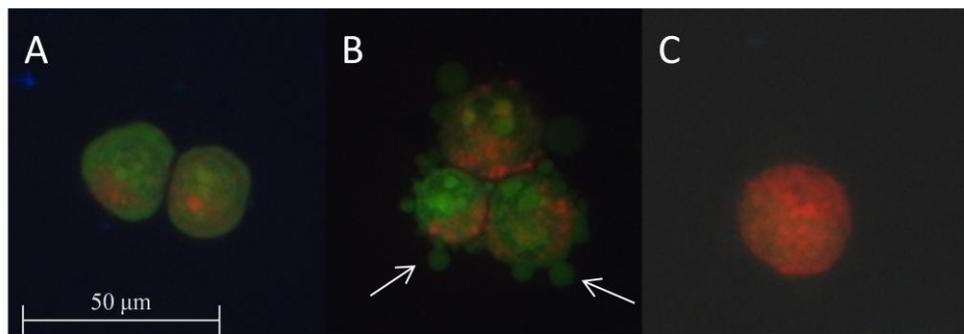


Figura 3. Fotomicrografia de células da linhagem MCF-7 coradas com alaranjado de acridina/brometo de etídio e analisadas em microscópio de fluorescência com filtro de 540 nm. (A) Células viáveis; (B) células em apoptose; (C) célula em necrose; e (setas) corpos apoptóticos.

3.8. Teste de Fragmentação do DNA

Este ensaio foi realizado por meio de citometria de fluxo. Para tanto, 3×10^4 células/poço foram cultivadas em microplacas de 12 poços nas condições descritas na seção 3.3.1. Após 24h de incubação, o meio de cultura inicial foi descartado e as células foram submetidas a duas lavagens com PBS. Na sequência, foram adicionadas às células 400 μL de meio de cultura contendo AIClPc-NP em concentrações que variavam para cada tipo celular: 0,31 μM

para a linhagem 4T1; 0,63 μM para a linhagem NIH/3T3; 1,80 μM para a linhagem MCF-7 e 0,40 μM para a linhagem MCF-10A.

As microplacas foram então recobertas com folha de alumínio e incubadas em ausência de luminosidade a 37 °C sob atmosfera de 5% e umidade relativa de 80% por 15 min para as linhagens 4T1, NIH/3T3 e MCF-7. Para a linhagem MCF-10A as células foram incubadas por 30 min. Após o período de incubação com a suspensão de AICIPc-NP, as células foram lavadas duas vezes com PBS e submetidas à irradiação luminosa sob as seguintes densidades de energia: 0,48 J/cm² e 1,38 J/cm². Na sequência, o PBS foi removido e as células foram cultivadas sob as condições descritas na seção 3.3.1.

Vinte e quatro horas após, o meio de cultura inicial foi retirado e reservado. Em seguida, as células foram removidas a partir de tratamento com 500 μL de solução de tripsina-EDTA por três minutos a 37 °C. Na sequência, o meio de cultura previamente reservado foi adicionado à suspensão celular para a inativação da enzima e para permitir posteriormente a análise das células aderidas e das não-aderidas à placa de cultura. O preparado foi submetido à centrifugação a 750 g por três minutos. Após esta etapa, o sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 200 μL de solução tamponada de lise (0,1% citrato de sódio, 0,1% Triton X-100, 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ iodeto de propídio, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ RNase A, pH 7,4) e incubadas por 30 min a 37 °C em ambiente ausente de luminosidade.

Após o período determinado, as células foram analisadas em citômetro de fluxo para leitura em comprimento de onda entre 560 nm e 580 nm (canal FL-2), correspondente ao comprimento de onda de fluorescência emitido pelo iodeto de propídio. O iodeto de propídio é um intercalante fluorescente de DNA, o que possibilita a detecção e a quantificação desta estrutura em cada célula. Dez mil eventos foram avaliados por replicata. Nesse ensaio, as moléculas de DNA íntegras emitem maior fluorescência em comparação a moléculas de DNA fragmentado. Esse teste foi realizado em dois experimentos independentes em triplicata.

3.9. Análises Estatísticas

Os dados referentes às variáveis distribuídas em grupos foram submetidos à análise de variância, ANOVA. Em casos em que foram detectadas diferenças foi aplicado o teste de Tukey, em nível de significância (α) igual a 0,05 – $p < 0,05$. A análise e a tabulação dos dados foram realizados por meio do software GraphPad Prism® 5.

Resultados

4. Resultados

4.1. Perfil de Incorporação do fotossensibilizante Alumínio-Cloro Ftalocianina associado ao copolímero poli(vinil metil éter-co-anidrido maleico) por células *in vitro*

Uma das abordagens experimentais inicialmente planejadas consistiu na determinação do perfil de incorporação do fotossensibilizante Alumínio-Cloro Ftalocianina associado ao copolímero poli(vinil metil éter-co-anidrido maleico) por células, tumorais e não-tumorais, em cultura. Esse perfil foi determinado por meio da avaliação do espectro de fluorescência emitida pelo fármaco e está expresso na Figura 4. Nessa figura, observa-se que todas as linhagens celulares incorporaram o AlClPc-NP a partir de cinco minutos com elevação gradativa até os 60 minutos de avaliação, sendo este o pico de incorporação observado para as células de todas as linhagens. A linhagem MCF-10A, que apesar de apresentar diminuição progressiva a partir de 30 minutos, esta diferença não foi significativa em relação aos 60 minutos de avaliação.

Vale ressaltar que aos 60 minutos, as células da linhagem tumoral 4T1 apresentaram taxas mais elevadas de incorporação do fármaco, 21,78%, em comparação às células da linhagem não-tumoral NIH/3T3, 16,59%. Apesar de ambas as linhagens apresentarem picos máximos de incorporação em um mesmo espaço de tempo. Para as células das linhagens humanas, essa diferença também foi observada aos 60 minutos, em que as células da linhagem tumoral humana MCF-7 mostraram níveis maiores de incorporação do AlClPc-NP, 20,97%, em comparação às células da linhagem não-tumoral humana MCF10A, 12,01%.

Um importante ponto a ser mencionado é que mesmo os picos máximos de incorporação demonstrados por cada linhagem celular foram inferiores aos demonstrados pelo grupo controle positivo constituído de solução contendo AlClPc-NP sem a presença de células, MSC-AlClPc, que na Figura 4 está representado pela linha tracejada em preto. O grupo controle negativo, composto por células não expostas ao AlClPc-NP, não apresentou emissão de fluorescência significativa.

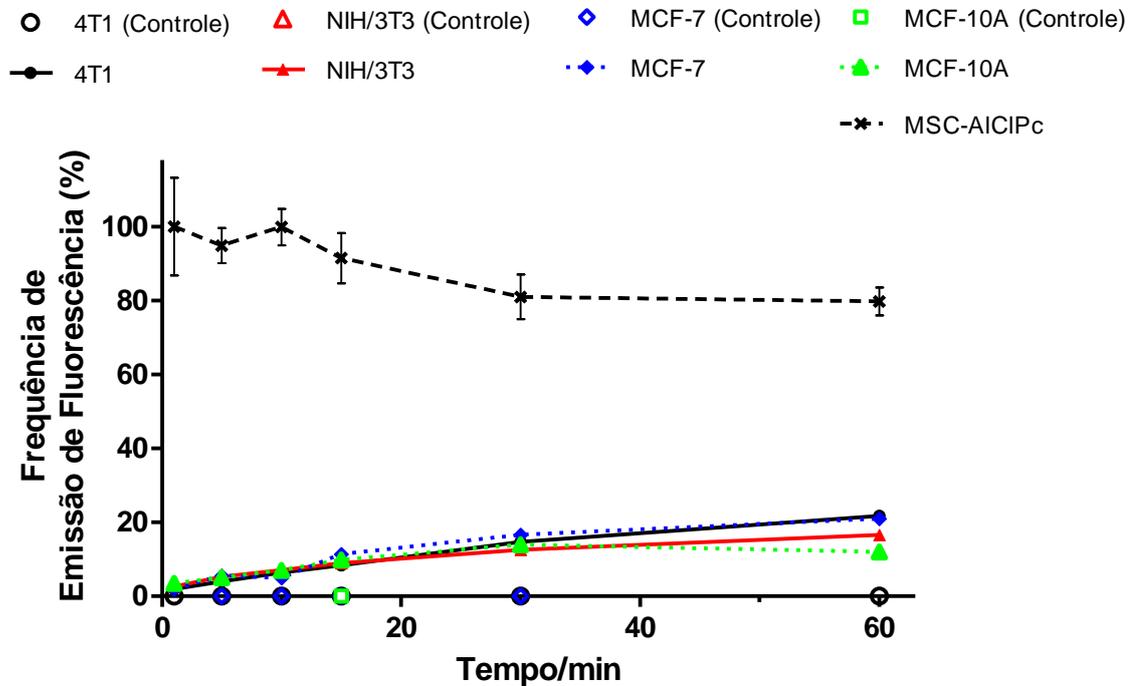


Figura 4. Perfil de incorporação de Alumínio-Cloro Ftalocianina, AICIPc, por células das linhagens 4T1, NIH/3T3, MCF-7 e MCF-10A expostas ao AICIPc associado a nanopartículas de PVM/MA em diferentes tempos. Os resultados estão expressos como intensidade de fluorescência normalizada (λ de excitação de 350 nm e λ de emissão de 690 nm) em função do tempo de incubação com AICIPc-NP. Os dados estão apresentados como média \pm E.P.M. para quintuplicata.

4.2. Efeito do *laser* na viabilidade celular

O efeito do feixe de *laser*, na ausência do fármaco fotossensibilizante AICIPc-NP, na viabilidade celular das linhagens 4T1, NIH/3T3, MCF-7 e MCF-10A está representado na Figura 5. Conforme ilustrado nessa figura, o *laser* por si só, mesmo incidindo na maior densidade de energia empregada, 34,39 J/cm², não ocasionou citotoxicidade nem nas células tumorais nem nas não-tumorais.

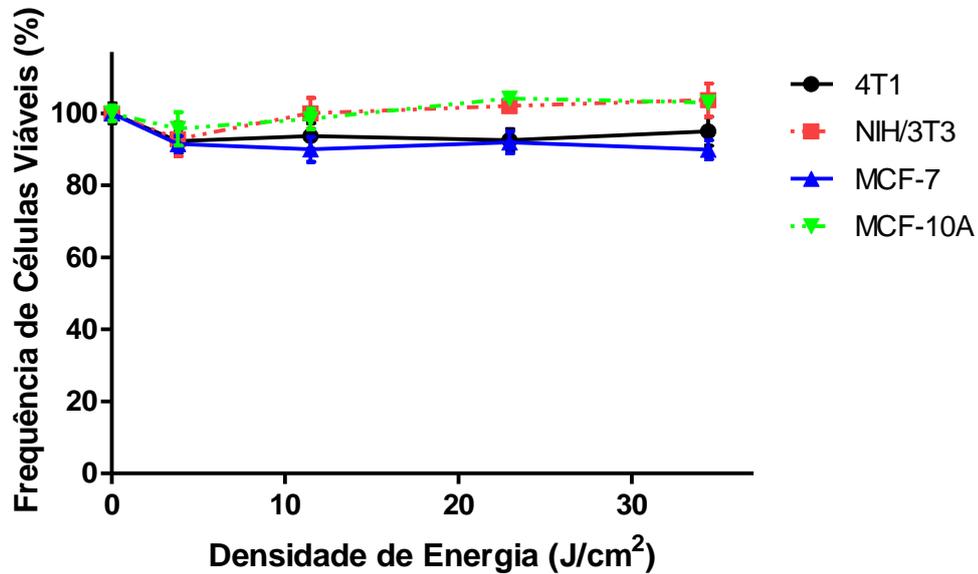


Figura 5. Citotoxicidade em células tumorais (4T1, MCF-7) e não tumorais (NIH/3T3, MCF-10A) submetidas a irradiação luminosa (670 nm), na ausência do fármaco AICIPc-NP, sob as densidades de energia: 3,82 J/cm²; 11,46 J/cm²; 22,93 J/cm² e 34,39 J/cm². Não houve correlação estatisticamente significativa entre as variáveis em relação ao grupo controle, $p < 0,05$. Os dados estão apresentados como média \pm E.P.M. para quintuplicata.

4.3. Toxicidade do copolímero poli(vinil metil éter-co-anidrido maleico)

Este ensaio foi realizado para a determinação da possibilidade do copolímero PVM/MA, mesmo não associado ao fotossensibilizante AICIPc, ser capaz de induzir algum efeito na viabilidade celular das linhagens 4T1, NIH/3T3, MCF-7 e MCF-10A.

Conforme mostrado na Figura 6, o copolímero por si só, ou seja, não associado ao fotossensibilizante AICIPc, em nenhuma das concentrações empregadas foi capaz de induzir citotoxicidade nas quatro linhagens celulares estudadas.

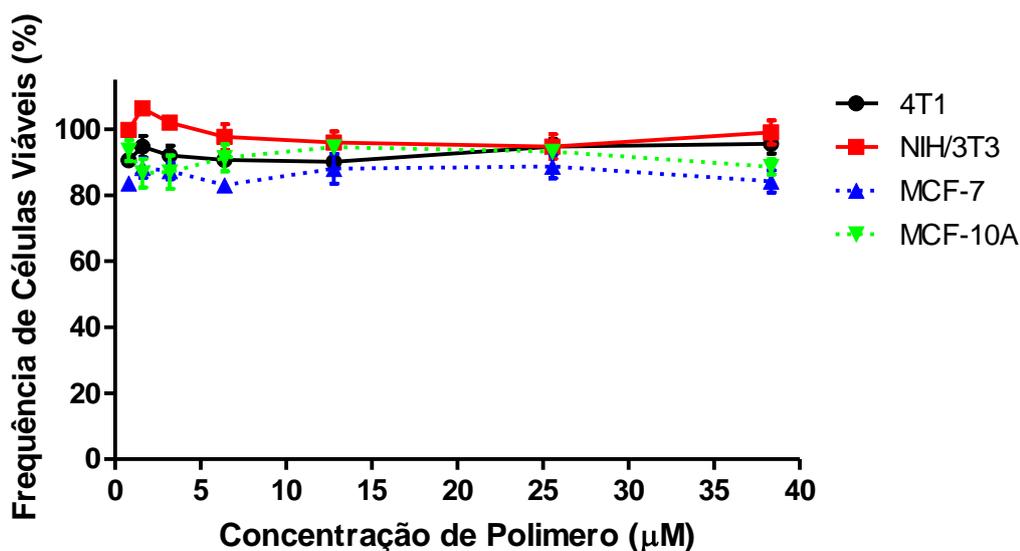


Figura 6. Citotoxicidade em células tumorais (4T1, MCF-7) e não tumorais (NIH/3T3, MCF-10A) expostas por 15 minutos ao copolímero PVM/MA nas concentrações: 0,80 µM; 1,60 µM; 3,19 µM; 6,39 µM; 12,78 µM; 25,55 µM; e 38,33 µM. Não houve correlação estatisticamente significativa entre as variáveis em relação ao grupo controle, $p < 0,05$. Os dados estão apresentados como média \pm E.P.M. para quintuplicata.

4.4. Toxicidade do Alumínio-Cloro Ftalocianina associado ao copolímero poli(vinil metil éter-co-anidrido maleico)

O efeito do fotossensibilizante Alumínio-Cloro Ftalocianina associado ao copolímero poli(vinil metil éter-co-anidrido maleico), AICIPc-NP, sobre a viabilidade das células das linhagens 4T1, NIH/3T3, MCF-7 e MCF-10A está expresso nas figuras 7 e 8.

Conforme ilustrado na Figura 7, o AICIPc-NP não irradiado foi citotóxico para as células da linhagem 4T1 a partir da concentração 8,0 µM, e para as células da linhagem NIH/3T3 a partir da concentração 4,0 µM. A linhagem 4T1 mostrou 87,77%, 58,03% e 9,03% de células viáveis quando expostas à presença do AICIPc-NP nas concentrações de 4,0 µM, 8,0 µM e 12 µM respectivamente. Já para a linhagem NIH/3T3, essa frequência foi de 69,49%, 35,19% e 15,07% nas concentrações de 4,0 µM; 8,0 µM e 12 µM respectivamente. Para essas duas linhagens, a toxicidade induzida pelo AICIPc-NP mostrou-se dose-dependente.

É importante mencionar que as células da linhagem NIH/3T3, linhagem não-tumoral mostraram-se mais sensíveis ao AICIPc-NP não irradiado nas concentrações 4,0 µM e 8,0 µM em comparação às células da linhagem 4T1, linhagem tumoral. Já a sensibilidade de ambas as linhagens celulares frente ao AICIPc-NP na concentração de 12 µM foi semelhante.

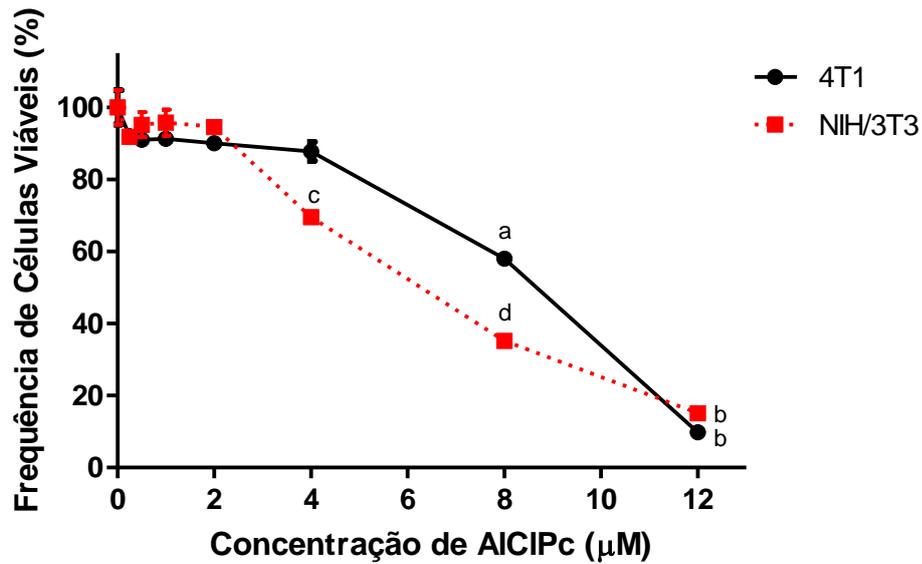


Figura 7. Citotoxicidade em células das linhagens 4T1 e NIH/3T3 expostas por 15 minutos ao AICIPc-NP não irradiadas nas concentrações: 0,25 µM; 0,5 µM; 1,0 µM; 2,0 µM; 4,0 µM; 8,0 µM e 12 µM. Letras distintas indicam correlação estatisticamente significativa entre as variáveis entre si e em relação ao grupo controle, $p < 0,05$. Os dados estão apresentados como média \pm E.P.M. para quintuplicata.

Na Figura 8 pode ser observado que nas linhagens celulares humanas MCF-7 e MCF-10A o AICIPc-NP não submetido à irradiação luminosa não induziu citotoxicidade em nenhuma das concentrações empregadas.

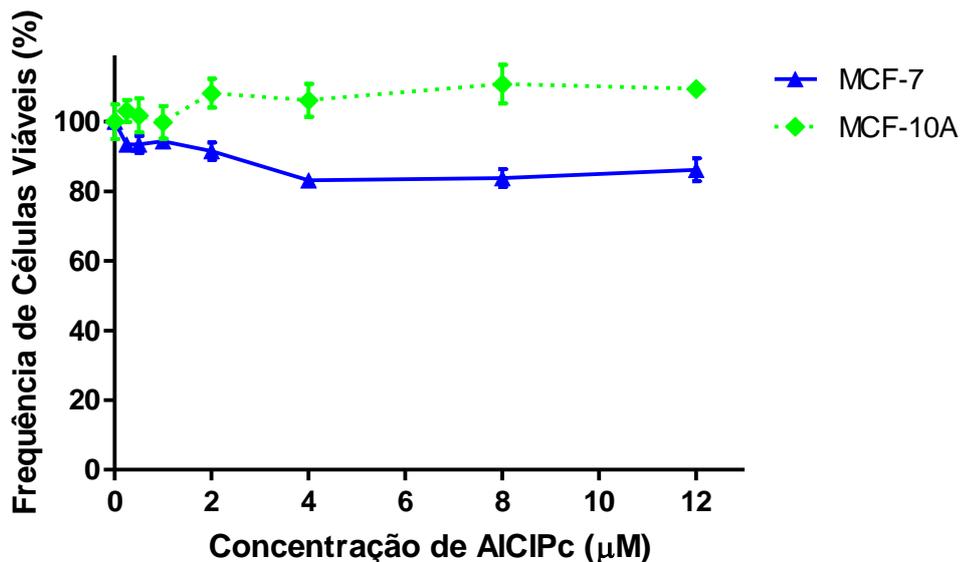


Figura 8. Citotoxicidade em células das linhagens MCF-7 e MCF-10A expostas por 15 minutos ao AICIPc-NP não irradiadas nas concentrações: 0,25 µM; 0,5 µM; 1,0 µM; 2,0 µM; 4,0 µM; 8,0 µM e 12 µM. Subscritos (*) indicam correlação estatisticamente significativa entre as variáveis em relação ao grupo controle, $p < 0,05$. Os dados estão apresentados como média \pm E.P.M. para quintuplicata.

4.5. Terapia Fotodinâmica mediada pelo Alumínio-Cloro Ftalocianina associado ao copolímero poli(vinil metil éter-co-anidrido maleico)

O efeito citotóxico promovido pela TFD mediada por AICIPc-NP sobre as células das linhagens 4T1, NIH/3T3, MCF-7 e MCF-10A após exposição por 15 minutos ao fármaco nas concentrações de 0,25 μM , 0,5 μM , 1,0 μM e 2,0 μM , e irradiação sob 0,48 J/cm^2 , 1,38 J/cm^2 e 3,82 J/cm^2 de densidade de energia, está ilustrado nas figuras 9, 10, 11 e 12. As concentrações utilizadas nesse ensaio foram escolhidas, pois o fármaco, para todas linhagens celulares, em concentrações abaixo de 4,0 μM não mostrou-se citotóxico por si só.

A Figura 9 ilustra os dados obtidos para as células da linhagem 4T1. Sob a irradiação de 0,48 J/cm^2 , 1,38 J/cm^2 e 3,82 J/cm^2 de densidades de energia, o AICIPc-NP foi capaz de induzir citotoxicidade em células dessa linhagem em todas as concentrações empregadas. No entanto, essa toxicidade se mostrou mais elevada sob tratamento com aplicação de irradiação de 1,38 J/cm^2 e 3,82 J/cm^2 de densidades de energia em comparação à irradiação de 0,48 J/cm^2 em concentrações de AICIPc-NP menores que 2,0 μM .

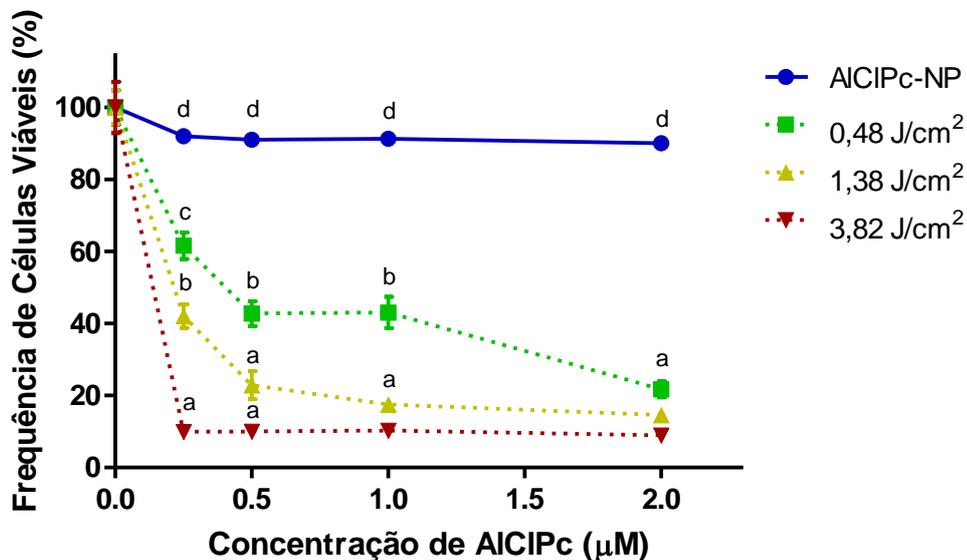


Figura 9. Citotoxicidade em células da linhagem 4T1 expostas por 15 minutos ao AICIPc-NP nas concentrações: 0,25 μM ; 0,5 μM ; 1,0 μM ; 2,0 μM e irradiadas sob as densidades de energia de 0,48 J/cm^2 , 1,38 J/cm^2 e 3,82 J/cm^2 . Letras distintas denotam correlação estatisticamente significativa, $p < 0,05$. Os dados estão apresentados como média \pm E.P.M. para quintuplicata.

Sob a irradiação de 0,48 J/cm^2 , a frequência de células viáveis foi de 61,62%, 42,72%, 43,03% e 21,72% nas concentrações de 0,25 μM , 0,5 μM , 1,0 μM e 2,0 μM , respectivamente. Sob a irradiação de 1,38 J/cm^2 , a frequência de células viáveis foi de 42,04%, 22,84%, 17,45%

e 14,55% nas concentrações de 0,25 μM , 0,5 μM , 1,0 μM e 2,0 μM , respectivamente. Na mesma figura pode ser observado também que sob a irradiação de 3,82 J/cm^2 , a frequência de células viáveis foi de 9,89%, 9,96%, 10,24% e 8,97% nas concentrações de 0,25 μM , 0,5 μM , 1,0 μM e 2,0 μM , respectivamente.

O efeito citotóxico promovido pela TFD mediada por AICIPc-NP sobre a linhagem não tumoral NIH/3T3 está ilustrado na Figura 10. Nessa linhagem, sob a irradiação de 0,48 J/cm^2 , 1,38 J/cm^2 e 3,82 J/cm^2 de densidades de energia, o AICIPc-NP foi capaz de induzir citotoxicidade nas células em todas as concentrações empregadas. Essa toxicidade se mostrou mais elevada sob tratamento com aplicação de irradiação de 1,38 J/cm^2 e 3,82 J/cm^2 de densidades de energia em comparação à irradiação de 0,48 J/cm^2 nas concentrações de AICIPc-NP menores que 2,0 μM .

Sob a irradiação de 0,48 J/cm^2 , a frequência de células viáveis foi de 84,42%, 62,21%, 43,92% e 25,83% nas concentrações de 0,25 μM , 0,5 μM , 1,0 μM e 2,0 μM , respectivamente. Sob a irradiação de 1,38 J/cm^2 , a frequência de células viáveis foi de 52,37%, 32,22%, 29,66% e 29,61% nas concentrações de 0,25 μM , 0,5 μM , 1,0 μM e 2,0 μM , respectivamente. Já sob a irradiação de 3,82 J/cm^2 , a frequência de células viáveis foi de 33,81%, 30,27%, 30,15% e 29,59% nas concentrações de 0,25 μM , 0,5 μM , 1,0 μM e 2,0 μM , respectivamente.

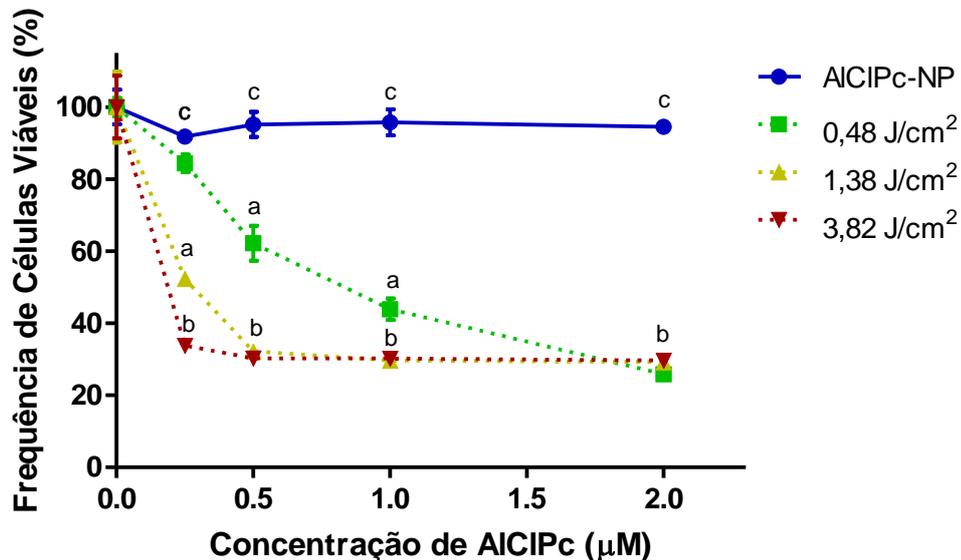


Figura 10. Citotoxicidade em células da linhagem NIH/3T3 expostas por 15 minutos ao AICIPc-NP nas concentrações: 0,25 μM ; 0,5 μM ; 1,0 μM ; 2,0 μM e irradiadas sob as densidades de energia de 0,48 J/cm^2 , 1,38 J/cm^2 e 3,82 J/cm^2 . Letras distintas denotam correlação estatisticamente significativa, $p < 0,05$. Os dados estão apresentados como média \pm E.P.M. para quintuplicata.

Conforme apresentado na Figura 11, as células da linhagem humana MCF-7 também exibiram sensibilidade ao AICIPc-NP, irradiado sob as densidades de energia de $0,48 \text{ J/cm}^2$, $1,38 \text{ J/cm}^2$ e $3,82 \text{ J/cm}^2$, em todas as concentrações empregadas. Essa toxicidade se mostrou mais elevada sob tratamento com aplicação de irradiação de $1,38 \text{ J/cm}^2$ e $3,82 \text{ J/cm}^2$ de densidades de energia em comparação à irradiação de $0,48 \text{ J/cm}^2$ em todas as concentrações de AICIPc-NP utilizadas. No entanto, a toxicidade induzida pelo AICIPc-NP na concentração de $2,0 \mu\text{M}$ para a densidade de energia de $0,48 \text{ J/cm}^2$ foi mais intensa quando comparada à induzida pelo AICIPc-NP nas concentrações $0,25 \mu\text{M}$, $0,5 \mu\text{M}$, $1,0 \mu\text{M}$, que induziram citotoxicidade semelhante.

Nessa linhagem tumoral humana, sob a densidade de energia de $0,48 \text{ J/cm}^2$, a frequência de células viáveis foi de 78,34%, 68,62%, 65,75% e 47,18% nas concentrações de $0,25 \mu\text{M}$, $0,5 \mu\text{M}$, $1,0 \mu\text{M}$ e $2,0 \mu\text{M}$, respectivamente. Sob a irradiação de $1,38 \text{ J/cm}^2$, a frequência de células viáveis foi de 31,45%, 30,86%, 27,89% e 26,55% nas concentrações de $0,25 \mu\text{M}$, $0,5 \mu\text{M}$, $1,0 \mu\text{M}$ e $2,0 \mu\text{M}$, respectivamente. Sob a irradiação de $3,82 \text{ J/cm}^2$, a frequência de células viáveis foi de 28,33%, 25,16%, 24,28% e 22,93% nas concentrações de $0,25 \mu\text{M}$, $0,5 \mu\text{M}$, $1,0 \mu\text{M}$ e $2,0 \mu\text{M}$, respectivamente.

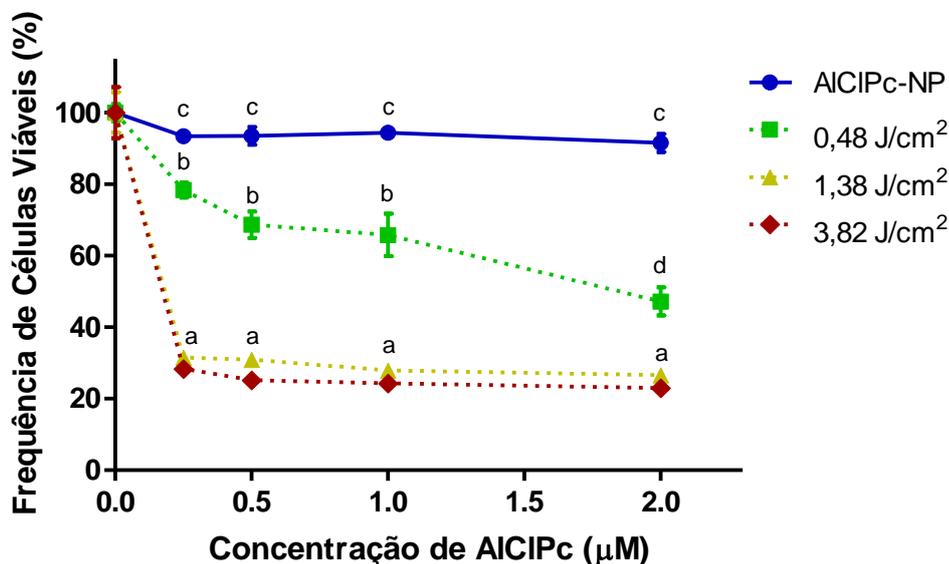


Figura 11. Citotoxicidade em células da linhagem MCF-7 expostas por 15 minutos ao AICIPc-NP nas concentrações: $0,25 \mu\text{M}$; $0,5 \mu\text{M}$; $1,0 \mu\text{M}$; $2,0 \mu\text{M}$ e irradiadas sob as densidades de energias: $0,48 \text{ J/cm}^2$, $1,38 \text{ J/cm}^2$ e $3,82 \text{ J/cm}^2$. Letras distintas denotam correlação estatisticamente significativa, $p < 0,05$. Os dados estão apresentados como média \pm E.P.M. para quintuplicata.

Como mostra a Figura 12, o AICIPc-NP irradiado sob $3,82 \text{ J/cm}^2$ de densidade de energia foi citotóxico em todas as concentrações após exposição por 15 minutos às células da linhagem humana MCF-10A. A frequência de células viáveis foi de 44,74%, 44,02%, 45,03% e 39,87% nas concentrações de $0,25 \text{ }\mu\text{M}$, $0,5 \text{ }\mu\text{M}$, $1,0 \text{ }\mu\text{M}$ e $2,0 \text{ }\mu\text{M}$, respectivamente.

Sob a irradiação de $1,38 \text{ J/cm}^2$ de densidade de energia, o AICIPc-NP foi citotóxico apenas na concentração de $2,0 \text{ }\mu\text{M}$, pois a frequência de células viáveis foi de 87,10%, 83,29%, 86,21% e 69,03% nas concentrações $0,25 \text{ }\mu\text{M}$, $0,5 \text{ }\mu\text{M}$, $1,0 \text{ }\mu\text{M}$ e $2,0 \text{ }\mu\text{M}$, respectivamente. Já para a irradiação de $0,48 \text{ J/cm}^2$ de densidade de energia, o AICIPc-NP não foi citotóxico em nenhuma das concentrações empregadas, em que a frequência de células viáveis foi de 93,26%, 89,68%, 91,26% e 95,02% nas concentrações $0,25 \text{ }\mu\text{M}$, $0,5 \text{ }\mu\text{M}$, $1,0 \text{ }\mu\text{M}$ e $2,0 \text{ }\mu\text{M}$, respectivamente.

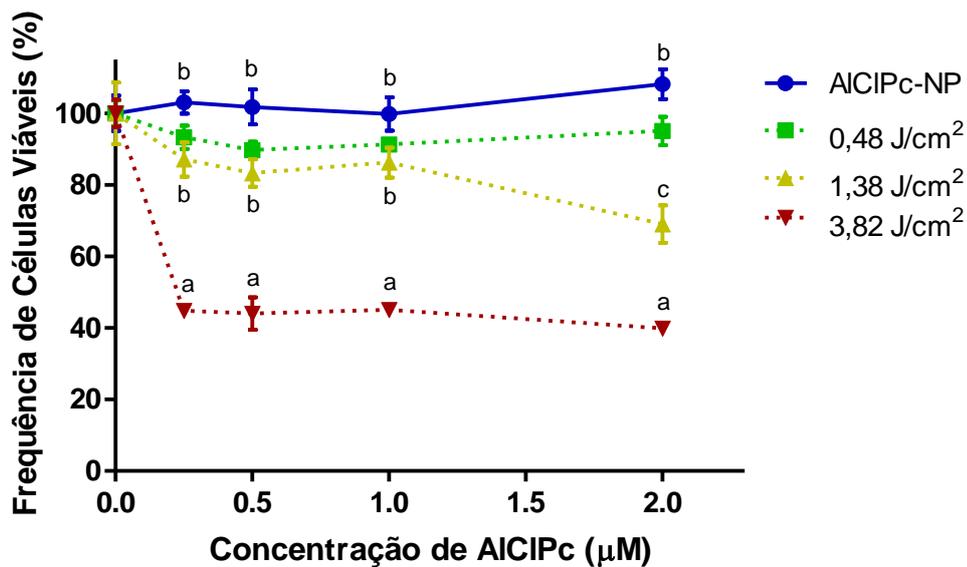


Figura 12. Citotoxicidade em células da linhagem MCF-10A expostas por 15 minutos ao AICIPc-NP nas concentrações: $0,25 \text{ }\mu\text{M}$; $0,5 \text{ }\mu\text{M}$; $1,0 \text{ }\mu\text{M}$; $2,0 \text{ }\mu\text{M}$ e irradiadas sob as densidades de energias: $0,48 \text{ J/cm}^2$, $1,38 \text{ J/cm}^2$ e $3,82 \text{ J/cm}^2$. Letras distintas denotam correlação estatisticamente significativa, $p < 0,05$. Os dados estão apresentados como média \pm E.P.M. para quintuplicata.

Considerando que as células da linhagem MCF-10A apresentaram um valor mais elevado de incorporação do AICIPc-NP aos 30 minutos, foi realizada também um ensaio de viabilidade celular após 30 minutos de exposição ao fármaco. Os resultados estão expressos na Figura 13. Nela, pode-se observar que o AICIPc-NP irradiado sob $0,48 \text{ J/cm}^2$ e $1,38 \text{ J/cm}^2$ de densidades de energia induziu citotoxicidade em todas as concentrações empregadas. No entanto, essa toxicidade foi maior quando o AICIPc-NP era irradiado com $1,38 \text{ J/cm}^2$ de

densidade de energia em comparação à irradiação de $0,48 \text{ J/cm}^2$ em concentrações de AICIPc-NP menores que $1,0 \mu\text{M}$.

A frequência de células viáveis sob tratamento com AICIPc-NP e irradiação de densidade de energia de $0,48 \text{ J/cm}^2$ foi de 65,44%, 52,82%, 42,11% e 39,25% para as concentrações $0,25 \mu\text{M}$, $0,5 \mu\text{M}$, $1,0 \mu\text{M}$ e $2,0 \mu\text{M}$, respectivamente. Para a irradiação de $1,38 \text{ J/cm}^2$, a frequência de células viáveis foi de 34,44%, 32,21%, 34,68% e 32,33% nas concentrações $0,25 \mu\text{M}$, $0,5 \mu\text{M}$, $1,0 \mu\text{M}$ e $2,0 \mu\text{M}$, respectivamente.

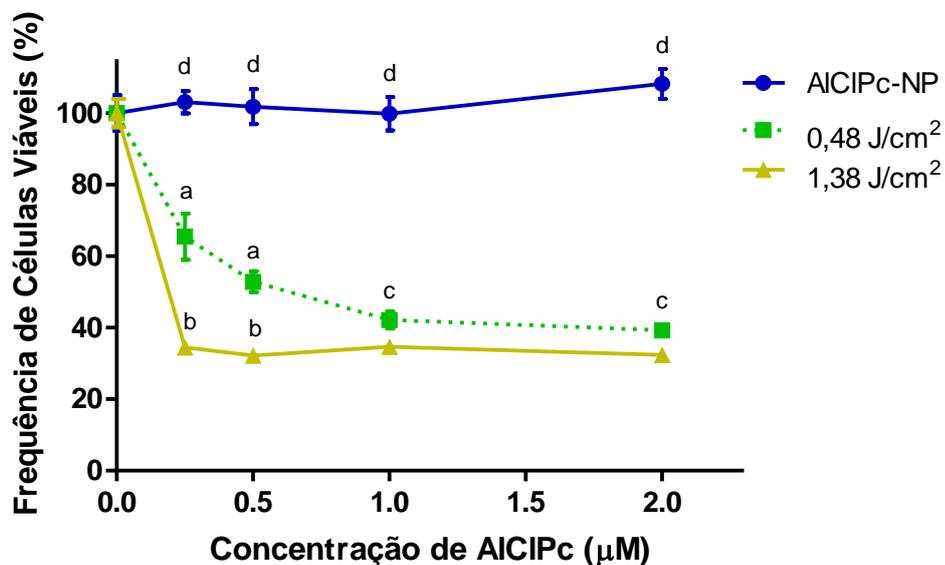


Figura 13. Citotoxicidade em células da linhagem MCF-10A expostas por 30 minutos ao AICIPc-NP nas concentrações: $0,25 \mu\text{M}$; $0,5 \mu\text{M}$; $1,0 \mu\text{M}$; $2,0 \mu\text{M}$ e irradiadas sob as densidades de energias: $0,48 \text{ J/cm}^2$ e $1,38 \text{ J/cm}^2$. Letras distintas denotam correlação estatisticamente significativa, $p < 0,05$. Os dados estão apresentados como média \pm E.P.M. para quintuplicata.

4.6. Perfil de morte celular induzido pela Terapia Fotodinâmica mediada pelo Alumínio-Cloro Ftalocianina associado ao copolímero poli(vinil metil éter-co-anidrido maleico)

O perfil de morte celular induzido pela Terapia Fotodinâmica mediada pelo Alumínio-Cloro Ftalocianina associado ao copolímero poli(vinil metil éter-co-anidrido maleico) foi determinado por meio do ensaio colorimétrico com alaranjado de acridina e brometo de etídio. O resultado desse ensaio está expresso na Figura 14. Como mostrado nessa figura, a morte celular induzida pelo AICIPc-NP após irradiação sob densidade de energia de $0,48 \text{ J/cm}^2$ foi ocasionada principalmente por apoptose em todas as linhagens celulares estudadas. A frequência de morte celular foi de 51,33%, 43,03%, 53,33% e 40,67% para as linhagens 4T1,

NIH/3T3, MCF-7 e MCF10A respectivamente, sendo deste percentual os valores de 35,67%, 29,67%, 38,33% e 32,33% para as frequências de células em apoptose para as mesmas linhagens respectivamente.

Para a densidade de energia de $1,38 \text{ J/cm}^2$, o principal tipo de morte celular induzido pelo AICIPc-NP após irradiação foi ocasionado por necrose em todas as linhagens celulares analisadas. A frequência de morte celular foi de 84,33%, 81,03%, 82,33% e 71,33% para as linhagens 4T1, NIH/3T3, MCF-7 e MCF10A respectivamente, sendo deste percentual os valores de 73,01%; 72,02%; 72,66% e 62,67% para as frequências de células em necrose para as mesmas linhagens respectivamente.

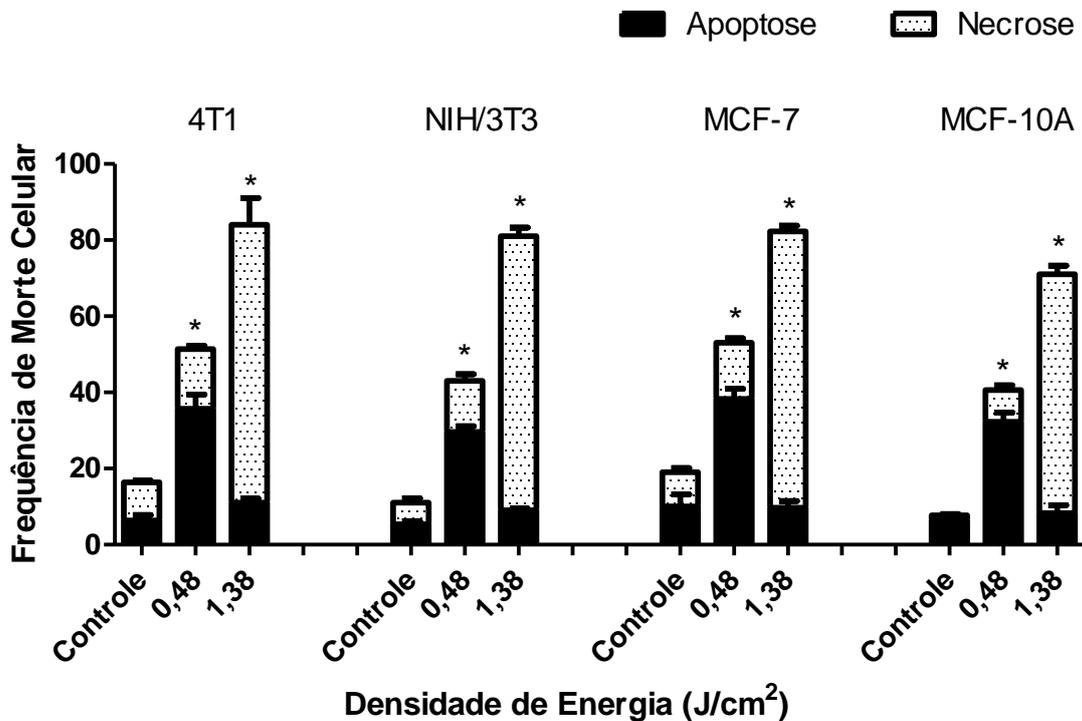


Figura 14. Teste colorimétrico por Alaranjado de Acridina/Brometo de Etídio. Frequência de morte celular por apoptose (preto) e necrose (branco) em células das linhagens 4T1, NIH/3T3 e MCF-7, expostas por 15 minutos ao AICIPc-NP, e sobre células da linhagem MCF-10A, após exposição por 30 minutos ao AICIPc-NP, nas concentrações: $0,31 \mu\text{M}$; $0,63 \mu\text{M}$; $1,80 \mu\text{M}$ e $0,46 \mu\text{M}$ respectivamente e irradiadas sob as densidades de energias: $0,48 \text{ J/cm}^2$ e $1,38 \text{ J/cm}^2$. Subscritos (*) indicam correlação estatisticamente significativa entre as variáveis e o grupo controle, e os subgrupos entre si, $p < 0,05$. Os dados estão apresentados como média \pm E.P.M. para triplicata.

4.7. Fragmentação do DNA

A Figura 15 ilustra a frequência de fragmentação do DNA induzida pela TFD sobre as células das linhagens 4T1, NIH/3T3 e MCF-7, após 15 minutos de exposição ao AICIPc-NP, e sobre a linhagem celular MCF-10A, após 30 minutos de exposição ao fármaco, nas concentrações: 0,31 μM ; 0,63 μM ; 1,80 μM e 0,46 μM , e irradiação sob a densidade de energia 0,48 J/cm^2 . Como pode ser observado nessa figura, a TFD mediada por AICIPc-NP irradiado sob densidade de energia de 0,48 J/cm^2 foi capaz de induzir fragmentação no DNA de todas as linhagens celulares estudadas. A frequência de fragmentação do DNA foi de 55,95%, 37,34%, 46,77% e 32,11% para as linhagens 4T1, NIH/3T3, MCF-7 e MCF10A respectivamente. O perfil de fragmentação do DNA foi mais elevado para as células das linhagens tumorais em comparação às células das linhagens não-tumorais dentro de uma mesma espécie.

Já a TFD mediada pelo AICIPc-NP irradiado sob densidade de energia de 1,38 J/cm^2 não induziu fragmentação no DNA de nenhuma das linhagens celulares em relação ao grupo controle.

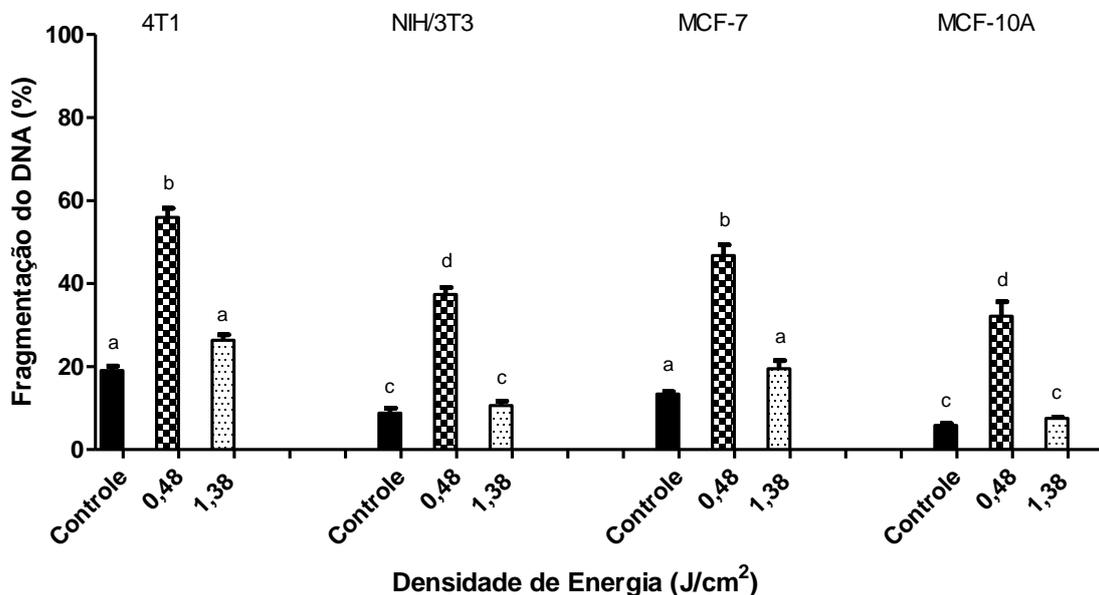


Figura 15. Frequência de fragmentação do DNA em células das linhagens 4T1, NIH/3T3 e MCF-7, expostas por 15 minutos ao AICIPc-NP, e sobre células da linhagem MCF-10A, após exposição por 30 minutos ao AICIPc-NP, nas concentrações: 0,31 μM ; 0,63 μM ; 1,80 μM e 0,46 μM respectivamente e irradiadas sob as densidades de energias: 0,48 J/cm^2 e 1,38 J/cm^2 . Letras distintas indicam correlação estatisticamente significativa, $p < 0,05$. Os dados estão apresentados como média \pm E.P.M. para triplicata.

Discussão

5. Discussão

Os tratamentos convencionais existentes para o câncer de mama apresentam diversos entraves e ocasionam efeitos colaterais, além de oferecer riscos de danos a tecidos saudáveis ou erradicação incompleta das células malignas (NIH, 2011; Pautler & Brenner, 2010). Dessa forma, esforços têm sido dedicados na pesquisa de novos tratamentos que possam apresentar maior especificidade contra as células tumorais e reduzir os aspectos negativos citados anteriormente.

Nesse contexto, a Terapia Fotodinâmica tem sido alvo de intensas pesquisas como plataforma terapêutica no tratamento contra o câncer, principalmente devido a sua especificidade e a sua seletividade (Robertson *et al.*, 2009). Atualmente, diversos estudos clínicos até a fase III, bem como a aplicação clínica da TFD, já tem sido aprovados como forma de tratamento e de alívio de sintomas em uma grande variedade de tumores malignos, em que se inclui o câncer mamário (Dolmans *et al.*, 2003; NCI, 2011; Yano *et al.*, 2011).

A TFD tem como base a interação de três componentes: fotossensibilizante, luz de comprimento de onda específico e oxigênio molecular. Nos dias de hoje, um grande número de FS tem sido testado para aplicação na TFD, dentre eles destaca-se o Alumínio-Cloro Ftalocianina. O AICIPc tem apresentado propriedades fotodinâmicas com resultados favoráveis para a aplicação em TFD (Maftoum-Costa *et al.*, 2008). No entanto, sua elevada hidrofobicidade, que conduz a um elevado estado de agregação e conseqüentemente a um comprometimento de suas propriedades fotofísicas e fotoquímicas, gera impedimentos que comprometem a eficácia de sua atuação (Allison *et al.*, 2004; Maftoum-Costa *et al.*, 2008). Estratégias já descritas para contornar esse entrave consistem na associação da AICIPc a formulações nanoestruturadas, como lipossomos e nanopartículas poliméricas (Chatterjee *et al.*, 2008; Wong & Lee, 2011).

Os lipossomos são nanossistemas amplamente empregados no carregamento de FS para a TFD. No entanto, dificuldades na associação do FS a esses compostos (Chatterjee *et al.*, 2008) conduzem à procura por outras alternativas, com destaque para as nanopartículas poliméricas, que têm apresentado propriedades favoráveis como potenciais carreadores de FS (Bechet *et al.*, 2008; Chatterjee *et al.*, 2008).

Diante do exposto acima, Muehlmann (2011) conduziu o desenvolvimento de uma formulação constituída de Alumínio-Cloro Ftalocianina associado ao copolímero PVM/MA, AICIPc-NP. Essa formulação mostrou propriedades favoráveis para a atuação como fotossensibilizante de terceira geração com aplicação na TFD. No entanto, um FS para ser

utilizado na TFD contra o câncer deve ser capaz de induzir danos a células tumorais. Além disso, para ser classificado como ideal, é necessário que o FS não seja capaz de induzir toxicidade na ausência de luz. Desse modo, o presente trabalho teve como foco principal a avaliação da eficácia do Alumínio-Cloro Ftalocianina associado ao PVM/MA como fotossensibilizante a ser utilizado na Terapia Fotodinâmica. Para tal, utilizou-se como modelo células de linhagens murinas tumoral (4T1) e não-tumoral (NIH/3T3), e também células de linhagens humanas tumoral (MCF-7) e não-tumoral (MCF-10A).

A escolha de linhagens celulares tumorais e não-tumorais foi devida principalmente ao fato de que terapias contra o câncer devem idealmente promover a destruição das células malignas e não exercer toxicidade em células saudáveis. As células MCF-7, mantêm várias características do epitélio mamário e são bastante utilizadas em estudos de câncer de mama *in vitro* que envolvem a avaliação dos efeitos anti-tumorais de diversos fármacos. Da mesma forma, as células MCF-10A, originárias da linhagem não-tumoral de mama, também são bastante empregadas em estudos de citotoxicidade de substâncias terapêuticas. Estas células permitem a identificação e a avaliação de eventos celulares e moleculares existentes na interação célula-fármaco, o que é de grande relevância clínica. Já o emprego das linhagens celulares murinas deveu-se à perspectiva de posteriores estudos *in vivo* com esse fármaco a serem conduzidos em camundongos.

Como os resultados do estudo de incorporação conduzido por Muehlmann (2011) em microscopia confocal, mostraram que o AICIPc-NP é incorporado e distribui-se apenas no citoplasma de células da linhagem 4T1, fez-se necessário a verificação do período de tempo em que as células eram capazes de incorporar esse composto antes da determinação da eficácia do AICIPc-NP como FS a ser utilizado na TFD. Dessa forma, o primeiro passo deste estudo consistiu na caracterização do perfil de incorporação do fotossensibilizante AICIPc-NP por células tumorais e não-tumorais. Uma vez que o AICIPc é capaz de emitir fluorescência em comprimento de onda de 688 nm (Muehlmann, 2011), o perfil de incorporação do AICIPc-NP foi determinado indiretamente tendo como base o espectro de emissão de fluorescência do AICIPc. Essa etapa é de grande importância em estudos toxicológicos, pois fornece evidências da interação nanopartícula-célula, em que toda a maquinaria intracelular encontra-se exposta a um componente externo nanoestruturado (Marquis *et al.*, 2009).

Os resultados dessa primeira etapa mostraram que o AICIPc-NP é incorporado tanto por células tumorais como por não-tumorais. No entanto, aos 60 minutos de avaliação, os níveis de incorporação se mostraram mais elevados nas células tumorais em comparação às não-tumorais. Essa diferença pode ser consequência da maior atividade metabólica e de endocitose

das células malignas. Trabalhos anteriores já reportaram resultados semelhantes em relação às diferenças de captação de nanopartículas entre células tumorais e não-tumorais (Konan-Kouakou *et al.*, 2005; Xing *et al.*, 2010; Muehlmann, 2011).

Outro resultado importante a ser destacado é que em nenhuma das linhagens celulares foi verificada a incorporação de toda a quantidade de fármaco presente no meio. Essa diferença foi cerca de 60% entre os picos mais elevados de incorporação apresentados por todas as linhagens celulares em relação ao grupo controle positivo. Esse limite máximo imposto pelas células para a captação do AICIPc-NP já foi mostrado anteriormente por Muehlmann (2011). O autor mostrou a diminuição na incorporação do fármaco a partir de 60 minutos de avaliação.

O ensaio seguinte deste estudo consistiu na avaliação do efeito do feixe de luz a ser utilizado para ativar o AICIPc-NP. Este teste é importante, pois para serem classificados como adequados para aplicação em TFD, tanto o fotossensibilizante quanto a luz de comprimento de onda específico devem necessariamente ser inócuos quando isolados e capazes de induzir efeitos tóxicos a tecidos e células-alvo somente quando combinados (Dolmans *et al.*, 2003; Robertson *et al.*, 2009). Diante disso, a fonte de luz ideal não deve por si só, ou seja, na ausência do fármaco fotossensibilizante, ser citotóxica. Assim, ensaios experimentais somente com a incidência de irradiação luminosa têm como objetivo a avaliação da capacidade citotóxica da fonte de laser, e assim, determinar a possibilidade da fonte de luz apresentar propriedades ideais para sua aplicação na TFD.

O AICIPc apresenta faixa de absorção espectral entre 650–850 nm (Allison *et al.*, 2004) com pico máximo de absorção na faixa de comprimento de onda de 678 nm (Muehlmann, 2011). Desse modo, foi empregada uma fonte emissora de *laser* de comprimento de onda de 670 nm, capaz de ativar o FS próximo ao seu pico máximo de absorção. Como o esperado, os resultados dos ensaios experimentais mostram que somente o feixe de *laser* não foi capaz de induzir redução significativa nas taxas de sobrevivência nas células das linhagens tratadas, tanto nas tumorais como nas não-tumorais, em densidades de energia crescentes até 34,39 J/cm² (Figura 5). Conforme já demonstrado em outros estudos, sistemas de *laser* de baixa potência, não apresentam potencial nocivo a tecidos biológicos (Stoker, 2005).

Além da característica mencionada acima, o comprimento de onda de 670 nm do feixe de luz empregado compreende a faixa espectral correspondente a comprimentos de onda longos de baixa excitação. Esse espectro de 670 nm pertence também à faixa ótima de absorção da janela óptica dos tecidos biológicos para aplicação em TFD, em que ocorre o mínimo de desvio óptico devido à baixa absorção de luz por cromóforos tissulares. Essas observações são

indicativas da adequação de características físicas ideais da fonte de luz para o emprego na Terapia Fotodinâmica.

A etapa seguinte deste estudo envolveu a avaliação da possibilidade de indução de toxicidade do copolímero PVM/MA sobre células tumorais e não-tumorais. Uma vez que o copolímero encontra-se associado à AICIPc e o perfil de incorporação do AICIPc-NP foi determinado indiretamente tendo como base o espectro de emissão de fluorescência do AICIPc, infere-se que o PVM/MA foi também incorporado pelas células das diferentes linhagens. Dessa forma, ao encontrar-se incorporado pelas células, é essencial que haja uma avaliação dos possíveis efeitos deletérios desse composto.

O tempo de 15 minutos foi escolhido para a incubação com o PVM/MA pois, de acordo com o perfil de incorporação, foi um período em que já havia a constatação de incorporação do fármaco pelas células. Os resultados mostraram que o PVM/MA em nenhuma das concentrações empregadas foi tóxico para as quatro linhagens celulares estudadas. Esse resultado está de acordo com achados anteriores, em que estudos mostraram que o PVM/MA induz baixa toxicidade em células da mucosa oral. Essa incapacidade de induzir toxicidade é interessante ao ser considerado o fato de esse copolímero ser amplamente utilizado na indústria farmacêutica como adesivo dentário, na preparação de emplastos transdermais e na produção de dentifrícios e enxaguatórios bucais (Arbós *et al.*, 2002; Irache *et al.*, 2005; Dibart & Zhang, 2011).

Após a confirmação de que o copolímero PVM/MA era inócuo às células de todas as linhagens, o próximo passo consistiu na averiguação da capacidade de indução de toxicidade do AICIPc associado ao PVM/MA sobre células tumorais e não-tumorais em ausência de luz, e dessa forma, determinar se o AICIPc-NP seria capaz de induzir toxicidade de forma independente.

O AICIPc-NP na ausência de luz mostrou-se citotóxico apenas em concentrações a partir de 4,0 μM , e mesmo assim, somente para as células das linhagens murinas 4T1 e NIH/3T3. A ausência de toxicidade nas linhagens humanas MCF-7 e MCF-10A em nenhuma das concentrações do AICIPc-NP pode estar relacionada ao fato de essas células provavelmente não terem passado por nenhuma divisão celular, enquanto que as células murinas podem ter passado por uma ou duas divisões, as células murinas em cultura se dividem aproximadamente a cada 12h, enquanto as células humanas se dividem aproximadamente a cada 25h. Assim, considerando que células em divisão não apresentam membrana nuclear, o que facilitaria a entrada do fármaco no núcleo, podendo gerar danos no DNA que por não

serem reparados, induziriam as células à morte. Dados da literatura mostram que células com maior índice proliferativo são mais susceptíveis à ação de drogas (Ren *et al.*, 2011).

A maior sensibilidade ao fármaco mostrada pelas células da linhagem NIH/3T3 em comparação às da linhagem 4T1 em concentrações do fármaco acima de 2,0 μM , pode estar relacionada à maior instabilidade genética apresentada pela linhagem tumoral. A elevada instabilidade genética é uma das características marcantes de células tumorais (Lord & Ashworth, 2012; Lozy & Karantza, 2012). Enquanto que células saudáveis são capazes de identificar e reparar danos, ou mesmo impedir a propagação de erros no material genético, as células tumorais têm como característica a incapacidade de reparar esses erros, acumulando mutações ao longo do tempo. Assim, devido à maior instabilidade genética, algumas das células da linhagem 4T1 poderiam ter mecanismos de morte celular inativados, enquanto que as células da linhagem NIH/3T3 dispararam esses mecanismos para impedir a propagação de erros. Dessa forma, a frequência de células vivas seria maior em células da linhagem 4T1 em comparação às células da linhagem NIH/3T3. Vale ressaltar que células tumorais sempre encontram uma maneira de se esquivar da morte e sobreviverem, elas são focadas a exercerem uma única função, a de simplesmente se multiplicarem (Weinberg, 2008).

Como citado anteriormente, para ser utilizado em TFD, um fotossensibilizante deve necessariamente ser inócuo e somente induzir efeitos tóxicos a tecidos e células-alvo quando irradiado. Desse modo, como os resultados dos ensaios de toxicidade com o AICIPc associado ao PVM/MA mostraram que o AICIPc-NP não foi tóxico nas concentrações de 0,25 μM ; 0,5 μM ; 1,0 μM e 2,0 μM em nenhuma das quatro linhagens analisadas, decidiu-se que nos ensaios da Terapia Fotodinâmica utilizaria-se o fármaco nessas concentrações. Da mesma forma, como os ensaios experimentais somente com o feixe de *laser* mostraram que o *laser* por si só, mesmo incidindo na maior densidade de energia empregada, 34,39 J/cm^2 , não ocasionou citotoxicidade nas células tumorais nem nas não-tumorais, decidiu-se também pelo emprego da densidade de energia mais baixa desse teste, 3,82 J/cm^2 , a ser utilizada para a aplicação da Terapia Fotodinâmica. Como os testes com irradiação nessa densidade de energia mostraram que a TFD mediada por AICIPc-NP sobre as células de todas as linhagens foi capaz de induzir citotoxicidade nas concentrações do fármaco abaixo de 2,0 μM , foram realizados ensaios de viabilidade celular utilizando-se também a irradiação de 0,48 J/cm^2 e 1,38 J/cm^2 de densidades de energia.

Os resultados da Terapia Fotodinâmica mediada por AICIPc-NP sobre as células das linhagens murinas 4T1 e NIH/3T3 mostraram que esse fármaco quando irradiado foi capaz de induzir toxicidade em células dessas duas linhagens em todas as densidades de energia

empregadas. No entanto, essa toxicidade se mostrou menos elevada quando as concentrações eram menores que $1,0 \mu\text{M}$ e a densidade de energia era de $0,48 \text{ J/cm}^2$. Estes dados mostraram-se coerentes com estudos anteriores, em que o grau de fototoxicidade da TFD é dependente, entre outros fatores, tanto da concentração do fotossensibilizante quanto da dosimetria de energia da irradiação luminosa empregada (Firczuk *et al.*, 2011; Frost *et al.*, 2011).

Um ponto importante a ser mencionado é que mesmo que a maior instabilidade genética apresentada pela linhagem tumoral possa lhe ter proporcionado uma sobrevivência maior do que a apresentada pelas células não tumorais frente ao tratamento com altas concentrações de AICIPc-NP não irradiado, isso não ocorreu quando as células tumorais foram expostas às espécies reativas de oxigênio geradas pela irradiação luminosa sobre o AICIPc-NP em baixas concentrações. Nesse caso, a linhagem não-tumoral é a que apresentou maior frequência de células vivas quando comparadas às tumorais. Outro ponto importante a salientar é que, dentre as células vivas detectadas após a TFD mediada por AICIPc-NP nessas duas linhagens celulares pode existir uma quantidade de células resultante de divisões mitóticas das células que sobreviveram inicialmente ao tratamento, pois essas células apresentam divisão celular aproximadamente a cada 12h. Desse modo, é plausível acreditar que a concentração de células mortas inicialmente pode ter sido maior do que o detectado. Assim, seria interessante a avaliação da viabilidade celular em espaços de tempo menores que 24h após a TFD mediada por AICIPc-NP.

Em relação às células das linhagens humanas, as células tumorais e não-tumorais mostraram respostas diferentes frente à TFD mediada por AICIPc-NP sob as mesmas condições. Nas células tumorais MCF-7, a TFD foi capaz de induzir toxicidade em todas as densidades de energia empregadas, e essa toxicidade se mostrou mais elevada quando as células eram expostas a concentrações do fármaco maiores que $1,0 \mu\text{M}$ para a densidade de energia de $0,48 \text{ J/cm}^2$ e para todas as concentrações abaixo de $2,0 \mu\text{M}$ para as densidades de energias de $1,38 \text{ J/cm}^2$ e $3,82 \text{ J/cm}^2$ em comparação com os demais. Já para as células não-tumorais MCF-10A, quando o AICIPc-NP foi irradiado com densidade de energia de $0,48 \text{ J/cm}^2$, a toxicidade ocasionada pela TFD não foi significativa para promover morte celular em todas as concentrações testadas com 15 minutos de exposição nessa linhagem. Esses dados mostram que células humanas não-tumorais podem ser mais resistentes a TFD mediada pelo AICIPc-NP em comparação às células não-tumorais. Diferentemente das células murinas, 4T1 e NIH/3T3, as células humanas se dividem aproximadamente a cada 25 horas, assim as células vivas detectadas nas linhagens MCF-7 e MCF-10A muito provavelmente são as mesmas que foram submetidas à TFD mediada por AICIPc-NP. É possível que a maior

instabilidade genética apresentada pela linhagem tumoral tenha conduzido as células da linhagem MCF-7 a uma sensibilidade mais elevada, em comparação à linhagem não-tumoral MCF-10A, a danos ocasionados por espécies reativas moleculares dependentes de oxigênio gerados por meio da aplicação da irradiação luminosa sobre o AICIPc-NP.

Por outro lado, o ensaio que determinou o perfil de incorporação do AICIPc-NP pelas quatro linhagens celulares mostrou um valor mais elevado de internalização do fármaco aos 30 minutos, em comparação ao observado nos primeiros 15 minutos. Assim, a menor sensibilidade à TFD mostrada pelas células humanas não-tumorais em relação às tumorais pode também ser devido à menor quantidade de fármaco disponível dentro das células. Por isso, resolveu-se realizar um ensaio em que as células MCF-10A eram submetidas à TFD após 30 minutos de exposição ao AICIPc-NP sob as mesmas condições de irradiação luminosa dos ensaios de viabilidade celular após 15 minutos de exposição ao AICIPc-NP.

Os resultados mostraram que a frequência de células vivas foi menor comparada ao mesmo tratamento após exposição ao fármaco por 15 minutos. Essa toxicidade foi menos pronunciada em concentrações menores que $1,0 \mu\text{M}$ e em densidade de energia de $0,48 \text{ J/cm}^2$ em comparação com a densidade de energia de $1,38 \text{ J/cm}^2$. Novamente os resultados sugerem a possibilidade de que a toxicidade promovida pela TFD mediada por AICIPc-NP seja dependente tanto da concentração de fármaco quanto da dose de energia aplicada. Esses resultados estão de acordo com a literatura, em que estudos anteriores apontaram a associação entre o aumento da captação de fármaco com o aumento dos efeitos citotóxicos (Allouni *et al.*, 2012).

As diferenças encontradas nos resultados de viabilidade para cada linhagem celular descritos neste estudo corroboram achados da literatura. Como revisto por Mroz *et al.* (2011), linhagens celulares distintas quando expostas ao mesmo fármaco e sob as mesmas condições de irradiação luminosa podem apresentar respostas diversas à TFD. Essas diferenças se refletem inclusive no mecanismo de morte celular induzido pela TFD, ou seja, não há apenas um único caminho capaz de conduzir à morte celular por meio dessa terapia. A TFD pode conduzir a três diferentes formas de morte celular: apoptose, necrose e autofagia (Firczuk *et al.*, 2011; Mroz *et al.*, 2011).

A apoptose é um complexo mecanismo de morte celular programada que pode ser ativada por receptores de morte ou por liberação de citocromo c na mitocôndria. Ambos os eventos conduzem à ativação de caspases, que são as principais enzimas envolvidas no processo que de ativação da apoptose, que levam à clivagem de substratos celulares (Agostini *et al.*, 2011; Rufini & Melino, 2011). A necrose é uma forma rápida de degeneração celular, geralmente

causada por danos físicos ou químicos e está associada a um processo de morte não programado (Mroz, 2011). Já a autofagia é um mecanismo catabólico celular que envolve a degradação lisossomal de organelas celulares e de proteínas. Esse processo permite o balanço entre a síntese, a degradação e a reciclagem de produtos celulares (Lozy & Karantza, 2012).

Diante da capacidade de indução de morte celular promovida pela Terapia Fotodinâmica mediada pelo AICIPc-NP, e como os resultados mostrados anteriormente sugerem que a TFD mediada pela AICIPc-NP pode ser dependente da concentração de FS e da dosimetria de energia da irradiação luminosa empregada, foram realizados ensaios para a determinação do mecanismo de morte celular associado a esse novo fármaco. As concentrações referentes à LC_{50} para cada linhagem celular foram escolhidas para este ensaio, pois permitiam uma quantidade de células vivas ou em processo de morte celular suficientes para a determinação dos mecanismos de morte celular.

Os resultados mostraram que para todas as linhagens celulares, a morte celular induzida pelo AICIPc-NP após irradiação sob densidade de energia de $0,48 \text{ J/cm}^2$ foi ocasionada principalmente por apoptose. Já sob a densidade de energia de $1,38 \text{ J/cm}^2$, o principal tipo de morte celular induzido pelo AICIPc-NP após irradiação foi ocasionado por necrose em todas as linhagens celulares. Esses resultados estão de acordo com diversos estudos anteriores que mostram a apoptose como mecanismo de morte celular prevalente para baixas doses de energia, e a necrose como o tipo associado a altas doses de energia em tratamentos com o uso da Terapia Fotodinâmica (Ichinose *et al.*, 2006; Robertson *et al.*, 2009).

Como algumas células vivas detectadas tanto na linhagem 4T1 como na linhagem NIH/3T3 podem ser resultantes de divisões mitóticas de células que sobreviveram inicialmente ao tratamento, o mecanismo de morte celular por apoptose sob a densidade de energia de $0,48 \text{ J/cm}^2$ pode ser explicado pelo acúmulo de erros no material genético da geração de células resultantes da duplicação da geração inicial de células sobreviventes ao tratamento. Possivelmente, as células das linhagens 4T1 e NIH/3T3 que inicialmente sobreviveram à TFD mediada pelo AICIPc-NP, reuniram alterações no material genético que foram transferidas para as células-filhas subsequentes. Essa segunda geração de células pode ter apresentado um excesso de erros genéticos além da possibilidade de reparação e de proliferação, o que resultou na ativação do processo de morte celular por apoptose.

Em relação às células da linhagem humanas MCF-7 e MCF-10A, como as células vivas detectadas fazem parte da mesma população que foi submetida à TFD mediada por AICIPc-NP, uma vez que as células dessas linhagens apresentam ciclo celular entorno de 29h e 25h respectivamente, o mecanismo de morte celular por apoptose sob a densidade de energia de

0,48 J/cm² pode ser explicado pela tentativa dessas células em reparar os danos ocasionados pelo tratamento.

Como estudos anteriores relataram a possibilidade de a autofagia ser ativada como mecanismo inicial de resgate (Mroz *et al.*, 2011), é possível que nas células das linhagens MCF-7 e MCF10A esse mecanismo tenha sido acionado inicialmente. No entanto, a quantidade de danos era então robusta que o reparo não foi mais possível, e dessa forma, a apoptose foi desencadeada, pois danos além da possibilidade de reparo induzem ao mecanismo de apoptose (Weinberg, 2008; Wlodkowic *et al.*, 2011).

Os resultados da morte celular ocasionada principalmente por necrose para a densidade de energia de 1,38 J/cm² é corroborada por achados na literatura, em que a Terapia Fotodinâmica em altas doses de energia é primariamente associada ao mecanismo de morte celular por necrose. Uma explicação discutida no trabalho de Mroz (2011) para a ocorrência de necrose, consiste na possibilidade de que proteínas que participam tanto dos processos de autofagia como nos de apoptose possam ter sido imediatamente destruídas pela TFD, ocasionando quebra da integridade celular e conduzindo à necrose.

Por outro lado, outra sugestão dada baseia-se na carência de oxigênio no meio intracelular, uma vez que a TFD induz a elevada produção de espécies reativas de oxigênio, essa molécula pode ter sido altamente consumida durante as reações para a formação de ROS. Tanto a apoptose como a autofagia são mecanismos de morte celular que dependem da disponibilidade de energia, ATP, na célula (Bernstein *et al.*, 2002; Kang *et al.*, 2012). Dessa forma, a falta de um dos reagentes principais do processo de geração de ATP, o oxigênio molecular, induzida pela TFD, pode ter conduzido a célula ao mecanismo de morte celular por necrose.

Uma das características mais marcantes na distinção entre a morte celular por apoptose ou por necrose consiste no perfil de fragmentação do DNA. Além disso, a frequência de danos ao DNA pode ser relacionada também à instabilidade cromossômica, em que células cromossomicamente instáveis possivelmente apresentam maior frequência de quebras, uma vez que essa alteração consiste no primeiro passo para rearranjos cromossômicos (Morgan *et al.*, 2002). Dessa forma, foi realizado um ensaio para a determinação do perfil de fragmentação do DNA de modo a servir de comparação aos dados obtidos em experimentos anteriores para os mecanismos de morte celular associado à TFD mediada por AICIPc-NP e para a detecção de instabilidade cromossômica.

Como os resultados apontaram para uma intensa fragmentação do DNA somente em células submetidas ao tratamento sob densidade de energia de 0,48 J/cm², esses dados

corroboram com os resultados obtidos para a avaliação do perfil de morte celular ocasionada pela TFD mediada por AICIPc-NP. A degradação precoce do genoma é uma das características marcantes do processo de morte celular programada, a apoptose (Lecoeur, 2002; Rufini & Melino, 2011). Já quando ocorre a morte celular por necrose, de forma geral, pouca ou nenhuma fragmentação do DNA é verificada (Kressel & Groscurth, 1994; Krysko *et al.*, 2008). Dessa forma, a ausência de fragmentação do DNA observada nas células expostas à densidade de energia de $1,38 \text{ J/cm}^2$ de irradiação luminosa pode ser associada à morte celular por necrose, enquanto que a elevada fragmentação do DNA nas células expostas à menor densidade de energia pode ser relacionada à morte celular por apoptose.

Vale ressaltar que o perfil de fragmentação do DNA mais elevado verificado para as células das linhagens tumorais em comparação às células das linhagens não-tumorais, dentro de uma mesma espécie, pode ser devido à maior instabilidade genética apresentada pelas células malignas. Como pode ser notado, mesmos os grupos controle tanto das células da linhagem 4T1 como da linhagem MCF-7 mostraram fragmentação mais intensa em comparação aos grupos controles das células das linhagens não-tumorais. Dessa forma, essa instabilidade genética pode ter conduzido à maior frequência de fragmentação do material genético em células tumorais em comparação às não-tumorais quando estas células não eram submetidas à Terapia Fotodinâmica.

Diante do exposto acima, é plausível acreditar que os resultados obtidos neste estudo, quando somados a outros da literatura, são promissores e oferecem a perspectiva de que o AICIPc-NP seja empregado como fotossensibilizante na Terapia Fotodinâmica contra o câncer de mama. Além disso, sugere-se que estudos futuros a serem conduzidos *in vivo* com esse fármaco poderão reforçar a eficácia do AICIPc-NP como fotossensibilizante a ser utilizado na TFD, além de contribuir para a melhor elucidação de seus mecanismos de ação.

Conclusões

6. Conclusões

Com base nos resultados obtidos neste estudo, é plausível concluir que:

- as células das linhagens 4T1, NIH/3T3, MCF-7 e MCF-10A incorporam o AICIPc-NP a partir de cinco minutos de exposição ao fármaco;
- o copolímero PVM/MA não associado ao fotossensibilizante AICIPc, não é citotóxico em nenhuma das concentrações empregadas para as quatro linhagens celulares estudadas;
- o AICIPc-NP não irradiado não se mostrou citotóxico para células de linhagens humanas, mas citotóxico para células das linhagens murinas somente em concentrações maiores ou iguais a $4,0 \mu\text{M}$;
- a Terapia Fotodinâmica mediada pelo AICIPc-NP induziu citotoxicidade em todas as concentrações utilizadas sob todas as densidades de energia empregadas nas células das linhagens murinas e nas células da linhagem tumoral humana. Para a linhagem humana não-tumoral, a TFD mediada pelo AICIPc-NP mostrou-se mais eficaz após exposição das células por 30 minutos ao fármaco;
- a Terapia Fotodinâmica mediada pelo AICIPc-NP em densidade de energia de $0,48 \text{ J/cm}^2$ induz morte celular por apoptose, enquanto que na densidade de energia de $1,38 \text{ J/cm}^2$ induz morte celular por necrose;
- a Terapia Fotodinâmica mediada pelo AICIPc-NP induz fragmentação no DNA somente na densidade de energia de $0,48 \text{ J/cm}^2$.

Referências Bibliográficas

7. Referências Bibliográficas

- ACKROYD, R.; KELTY, C.; BROWN, N.; REED, M. **The History of Photodetection and Photodynamic Therapy**. *Photochemistry and Photobiology*. v. 74, n. 5, p. 656-669, 2001.
- AGOSTINI, M.; TUCCI, P.; MELINO, G. Cell death pathology: **Perspective for human diseases**. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. v. 414, p. 451-455, 2011.
- ALLISON, R.; DOWNIE, G.; CUENCA, R.; HU, X.; CHILDS, C.; SIBATA, C. **Photosensitizers in clinical PDT**. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. v. 1, p. 27-42, 2004.
- ALLOUNI, Z. E.; HOL, P. J.; CAUQUI, M. A. ; GJERDET, N. R.; CIMPAN, M. R. **Role of physicochemical characteristics in the uptake of TiO₂ nanoparticles by fibroblasts**. *Toxicology in Vitro*. 2012. DOI: 10.1016/j.tiv.2012.01.019
- ARBÓS, P.; WIRTH, M.; ARANGO, M. A.; GABOR, F.; IRACHE, J. M. **Gantrez® AN as a new polymer for the preparation of ligand-nanoparticle conjugates**. *Journal of Controlled Release*. v. 83, p. 321-330, 2002.
- BECHET, D.; COULEAUD, P.; FROCHOT, C.; VIRIOT, M.; GUILLEMIN, F.; HEYOB, M. **Nanoparticles as vehicles for delivery of photodynamic therapy agents**. *Trends in Biotechnology*. v. 26, n. 11, p. 612-621, 2008.
- BERNSTEIN, C.; BERNSTEIN, H.; PAYNE, C. M.; GAREWAL, H. **DNA repair/pro-apoptotic dual-role proteins in five major DNA repair pathways: failsafe protection against carcinogenesis**. *Mutation Research*. v. 511, issue 2, p. 145-178, 2002.
- CASTANO, A. P.; DEMIDOVA, T. N.; HAMBLIN, M. R. **Mechanisms in photodynamic therapy: Part three – Photosensitizer pharmacokinetics, biodistribution, tumor localization and modes of tumor destruction**. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. v. 2, n. 2, p. 91-106, 2005.
- CASTANO, A. P.; MROZ, P.; HAMBLIN, M. R. **Photodynamic therapy and anti-tumor immunity**. *Nature Reviews Cancer*. v. 6, p. 535-545, 2006.
- CHATTERJEE, D. K.; FONG, L. S.; ZHANG, Y. **Nanoparticles in photodynamic therapy: An emerging paradigm**. *Advanced Drug Delivery Reviews*. v. 60, p. 1627-1637, 2008.
- CHENG, Y.; SAMIA, A. C.; MEYERS, J. D.; PANAGOPOULOS, I.; FEI, B.; BURDA, C. **Highly Efficient Drug Delivery with Gold Nanoparticle Vectors for in vivo Photodynamic Therapy of Cancer**. *Journal of American Chemical Society*. v. 130, issue 32, p. 10643-10647, 2008.

- CREMOUX, P. **Hormone therapy and breast cancer.** Bulletin du Cancer. v. 98, n. 11, p. 1311-9, 2011.
- DAVID, A. & ZIMMERMAN, M. **Cancer: an old disease, a new disease or something in between?** Nature Reviews Cancer. v. 10, p. 728-733, 2010.
- DERYCKE, A. S. L. & WITTE, P. A. M. **Liposomes for photodynamic therapy.** Advanced Drug Delivery Reviews. v. 56, p. 17-30, 2004.
- DIBART, S. & ZHANG, Y. P. **A multi-tasking dentifrice for the 21st century.** American Journal of Dentistry. v. 24, Special Issue A, 2011.
- DOLMANS, D.; FUKUMA, D.; JAIN, R. **Photodynamic therapy for cancer.** Nature Reviews Cancer. v. 3, p. 380-387, 2003.
- DURMUS, M. & AHSEN, V. **Water-soluble cationic gallium (III) and indium (III) phthalocyanines for photodynamic therapy.** Journal of Inorganic Biochemistry. v. 104, p. 297-309, 2010.
- ECKSTEIN, N. **Platinum resistance in breast and ovarian cancer cell lines.** Journal of Experimental & Clinical Cancer Research. v. 30, i. 91, p. 1-11, 2011.
- FERRARI, M. **Cancer nanotechnology: opportunities and challenges.** Nature Reviews Cancer. v. 5, p. 161-171, 2005.
- FIRCZUK, M.; NOWIS, D.; GOLAB, J. **PDT-induced inflammatory and host responses.** Photochemical and Photobiological Sciences. v. 10, p. 653-663, 2011.
- FROST, G. A.; HALLIDAY, G. M.; DAMIAN, D. L. **Photodynamic Therapy-Induced Immunosuppression in Humans is Prevented by Reducing the Rate of Light Delivery.** Journal of Investigative Dermatology. v. 131, p. 962-968, 2011.
- GÓMEZ, S.; GAMAZO, C.; ROMAN, B. S.; FERRER, M.; SANZ, M. L.; IRACHE, J. M. **Gantrez® AN nanoparticles as an adjuvant for oral immunotherapy with allergens.** Vaccine. v. 25, p. 5263-5271, 2007.
- GONZALES-ANGULO, A. M.; MORALES-VASQUEZ, F.; HORTOBAGYI, G. N. **Overview of resistance to systemic therapy in patients with breast cancer.** v. 608, p. 1-22, 2007.
- GUPTA, A. & GUPTA, M. **Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications.** Biomaterials. v. 26, p. 3995-4021, 2005.
- HAMNVIK, O. P.; LARSEN, P. R.; MARQUSEE, E. **Thyroid dysfunction from antineoplastic agents.** Journal of the National Cancer Institute. V. 103, issue 21, p. 1572-1587, 2011.

- HIGGINS, M. J. & BASELGA, J. **Targeted therapies for breast cancer**. The Journal of Clinical Investigation. v. 121, n. 10, p. 3797-3803, 2011.
- ICHINOSE, S.; USUDA, J.; HIRATA, T.; INOUE, T.; OHTANI, K.; MAEHARA, S.; KUBOTA, M.; IMAI, K.; TSUNODA, Y.; KUROIWA, Y.; YAMADA, K.; TSUTSUI, H.; FURUKAWA, K.; OKUNAKA, T.; OLEINICK, N.; KATO, H. **Lysosomal cathepsin initiates apoptosis, which is regulated by photodamage to Bcl-2 at mitochondria in photodynamic therapy using a novel photosensitizer, ATX-s10 (Na)**. International Journal of Oncology. v. 29, p. 349-355, 2006.
- INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. **Global Cancer Statistics, 2008**. Lyon: IARC, 2009. Disponível em: <<http://www.iarc.fr/>>. Acesso em: 16 out. 2010.
- INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. **INCA**: Rio de Janeiro: INCA 2011. Disponível em: <<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/mama>>. Acesso em: 27 nov. 2011.
- IRACHE, J. M.; HUICI, M.; KONECNY, M. ; ESPUELAS, S.; CAMPANERO, M. A.; ARBOS, P. **Bioadhesive Properties of Gantrez Nanoparticles**. Molecules. v. 10, p. 126-145, 2005.
- JUNQUEIRA, L. & CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 10^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. 488p.
- KANG, H.; HAN, B. S.; KIM, S. J.; OH, Y. J. **Mechanisms to prevent caspase activation in rotenone-induced dopaminergic neurodegeneration: role of ATP depletion and procaspase-9 degradation**. Apoptosis. 2012. DOI: 10.1007/s10495-012-0699-0.
- KOLAROVA, H.; LENOBEL, R.; KOLAR, P.; STRNAD, M. **Sensitivity of different cell lines to phototoxic effect of disulfonated chloroaluminium phthalocyanine**. Toxicology in Vitro. v. 21, p. 1304-1306, 2007.
- KONAN-KOUAKOU, Y. N.; BOCH, R.; GURNY, R.; ALLÉMANN, E. **In vitro and in vivo activities of verteporfin-loaded nanoparticles**. Journal of Controlled Release. v. 103, p. 83-91, 2005.
- KOSMINDER, B.; ZYNER, E.; OSIECKA, R.; OCHOCKI, J. **Induction of apoptosis and necrosis in A549 cells by the cis-Pt (II) complex of 3-aminoflavone in comparison with cis-DPP**. Mutation Research. v. 563, p. 61-70, 2004.
- KRESSEL, M. & GROSCURTH, P. **Distinction of apoptotic and necrotic cell death by in situ labeling of fragmented DNA**. Cell and Tissue Research. v. 278, n. 3, p. 549-556, 1994.

- KRYSKO, D. V.; BERGHE, T. V.; D'HERDE, K.; VANDENABEELE, P. **Apoptosis and necrosis: Detection, discrimination and phagocytosis**. *Methods*, v. 44, p. 205-221, 2008.
- LANGER, R. **Drug delivery: drugs on target**. *Science*, v. 293, p. 58-59, 2001.
- L'AZOU, B.; JORLY, J.; ON, D.; SELLIER, E.; MOISAN, F.; FLEURY-FEITH, J.; CAMBAR, J.; BROCHARD, P.; OHAYON-COURTÈS, C. **In vitro effects of nanoparticles on renal cells**. *Particle and Fiber Toxicology*, v. 5, n. 22, p. 1-14, 2008.
- LECOEUR, H. **Nuclear Apoptosis Detection by Flow Cytometry: Influence of Endogenous Endonucleases**. *Experimental Cell Research*, v. 277, p. 1-14, 2002.
- LIU, Y.; SOLOMON, M.; ACHILEFU, S. **Perspectives and Potencial Applications of Nanomedicine in Breast and Prostate Cancer**. *Medicinal Research Reviews*, 2010. DOI: 10.1002/med.20233.
- LORD, C. J. & ASHWORTH, A. **The DNA damage response and cancer therapy**. *Nature*, v. 481, p. 287-294, 2012.
- LOZY, F. & KARANTZA, V. **Autophagy and cancer cell metabolism**. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 2012. DOI: 10.1016/j.semcdb.2012.01.005.
- MAFTOUM-COSTA, M.; NAVES, K.; OLIVEIRA, A.; TEDESCO, A.; SILVA, N.; PACHECO-SOARES, C. **Mitochondria, endoplasmic reticulum and actin filament behavior after PDT with chloroaluminum phthalocyanine liposomal in HeLa cells**. *Cell Biology International*, v. 32, p. 1024-1028, 2008.
- MARQUIS, B. J.; LOVE, S. A.; BRAUN, K. L.; HAYNES, C. L. **Analytical methods to assess nanoparticle toxicity**. *Analyst*, v. 134, p. 425-439, 2009.
- MARTINS, J.; LEONOR, A.; LARANJINHA, J. **Simultaneous Production of Superoxide Radical and Singlet Oxygen by Sulphonated Chloroaluminum Phthalocyanine Incorporated in Human Low-density Lipoproteins: Implications for Photodynamic Therapy**. *Photochemistry and Photobiology*, v. 80, p. 267-273, 2004.
- MAVROGENIS, A. F.; PALA, E.; ROMANTINI, M.; GUERRA, G.; ROMAGNOLI, C.; MACCAURO, G.; RUGGIERI, P. **Side effects of radiation in musculoskeletal oncology: clinical evaluation of radiation-induced fractures**. *International Journal of Immunopathology and Pharmacology*, v. 24, p. 29-37, 2011.
- MORGAN, W. F.; HARTMANN, A.; LIMOLI, C. L.; NAGAR, S.; PONNAIYA, B. **Bystander effects in radiation-induced genomic instability**. *Mutation Research*, v. 504, p. 91-100, 2002.

- MOSMANN, T. **Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays.** Journal of Immunological Methods. v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.
- MROZ, P.; YAROSLAVSKY, A.; KHARKWAL, G. B.; HAMBLIN, M. R. **Cell Death Pathways in Photodynamic Therapy of Cancer.** Cancers. v. 3, p. 2516-2539, 2011.
- MUEHLMANN, L. A. **Cloreto de alumínio-ftalocianina associado a nanopartículas de poli(vinil,metil-éter-co-anidrido maleico) como potencial fotossensibilizante de terceira geração para terapia fotodinâmica antineoplásica.** Tese. 2011.
- NIH (National Institute of Health, National Cancer Institute). **What You Need To Know About Breast Cancer.** NIH Publication, n. 09-1556, 2009.
- NIH (National Institute of Health). **Breast Cancer Treatment.** National Cancer Institute - NCI, 2011. Disponível em: <<http://www.cancer.gov/cancertopics/pdq/treatment/breast>>. Acesso em: 05 out. 2011.
- NCI (National Cancer Institute). **NCI Alliance for Nanotechnology in Cancer.** National Cancer Institute - NCI, 2011. Disponível em: <<http://nano.cancer.gov/>>. Acesso em: 15 out. 2011.
- NYMAN, E. & HYNNINEN, P. **Research advances in the use of tetrapyrrolic photosensitizers for photodynamic therapy.** Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology. v. 73, p. 1-28, 2004.
- PASZKO, E.; EHRHARDT, C.; SENGE, M. O.; KELLEHER, D. P.; REYNOLDS, J. V. **Nanodrug applications in photodynamic therapy.** Photodiagnosis and Photodynamic Therapy. v. 8, p. 14-19, 2011.
- PAUTLER, M. & BRENNER, S. **Nanomedicine: promises and challenges for the future of public health.** International Journal of Nanomedicine. v. 5, p. 803-809, 2010.
- PHILLIPS, D. **Light relief: photochemistry and medicine.** Photochemical & Photobiological Sciences. v. 9, issue 12, p. 1589-1596, 2010.
- PIROTH, M. D.; PIROTH, D. M.; PINKAWA, M.; WOODRUFF, S. G.; HOLY, R.; EBLE, M. J. **Immediate reconstruction with an expander/implant following ablation mammae because of breast cancer: side effects and cosmetic results after adjuvant chest wall radiotherapy.** Strahlentherapie und Onkologie, v. 185, n. 10, p. 669-674, 2009.
- PLAETZER, K.; KRAMMER, B.; BERLANDA, J.; BERR, F.; KIESSLICH, T. **Photophysics and photochemistry of photodynamic therapy: fundamental aspects.** Lasers in Medical Science. v. 24, p. 259-268, 2009.

- REN, X.; LIM, S.; JI, Z.; YUH, J.; PENG, V.; SMITH, M. T.; ZHANG, L. **Comparison of proliferation and genomic instability responses to WRN silencing in hematopoietic HL60 and TK60 cells.** PLoS One, v. 6, issue 1, 2011.
- ROBERTSON, C.; HAWKINS, D.; ABRAHAMSE, H. **Photodynamic therapy (PDT): A short review on cellular mechanisms and cancer research applications for PDT.** Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology. v. 96, p. 1-8, 2009.
- ROCO, M. C. **Nanotechnology: convergence with modern biology and medicine.** Current Opinion in Biotechnology. United States. v. 14, p. 337-346, 2003.
- RUDDON, R. **Cancer Biology.** 4th ed. New York: Oxford University Press, 2007. 530 p.
- RUFFINI, A. & MELINO, G. **Cell death pathology: The war against cancer.** Biochemical and Biophysical Research Communications. v. 414, p. 445-450, 2011.
- SURENDIRAN, A.; SANDHIYA, S.; PRADHAN & ADITHAN, C. **Novel applications of nanotechnology in medicine.** Indian Journal of Medical Research. v. 130, p. 689-701, 2009.
- STOKER, M. R. **Basic principles of lasers.** Anesthesia and Intensive Care Medicine. v. 6, n. 12, p.402-204, 2005.
- TAKAHASHI, A.; MATSUMOTO, H.; YUKI, K.; YASUMOTO, J.; KAJIWARA, A.; AOKI, M.; FURUSAWA, Y.; OHNISHI, K.; OHNISHI, T. **High-let radiation enhanced apoptosis but not necrosis regardless of p53 status.** International Journal of Radiation Oncology Biology Physics. v. 60, n. 2, p. 591-597, 2004.
- TSANG, R. Y. & FINN, R. S. **Beyond trastuzumab: novel therapeutic strategies in HER2-positive metastatic breast cancer.** British Journal of Cancer. v. 106, p. 6-13, 2012.
- VITTAR, N.; AWRUCH, J.; AZIZUDDIN, K.; RIVAROLA, V. **Caspase-independent apoptosis, in human MCF-7c3 breast cancer cells, following photodynamic therapy, with a novel water-soluble phthalocyanine.** The International Journal of Biochemistry & Cell Biology. v. 42, p. 1123-1131, 2010.
- WANG, M. & THANOU, M. **Targeting nanoparticles to cancer.** Pharmacological Research. v. 62, p. 90-99, 2010.
- WEINBERG, R. A. **A biologia do câncer.** Porto Alegre: Artmed, 2008. 864 p.
- WILLEMS & VAN DEN WILDENBERG. **NanoRoadMap: Work document on Nanomaterials.** W&W, España s.l., 2004.

- WLODKOWIC, D.; TELFORD, W.; SKOMMER, J.; DARZYNKIEWICZ, Z. **Apoptosis and Beyond: Cytometry in Studies of Programmed Cell Death**. *Methods in Cell Biology*. v. 103, p. 55-98, 2011.
- WONG, K. Y. & LEE, P. Y. **Nanomedicine: A New Frontier in Cancer Therapeutics**. *Current Drug Delivery*. v. 8, p. 245-253, 2011.
- XING, Z.; CHANG, Y.; KANG, I. **Immobilization of biomolecules on the surface of inorganic nanoparticles for biomedical applications**. *Science and Technology of Advanced Materials*.v. 11, p. 1-17, 2010.
- YANO, S.; HIROHARA, S.; OBATA, M.; HAGIYA, Y.; OGURA, S.; IKEDA, A.; KATAOKA, H.; TANAKA, M.; JOH, T. **Current states and future views in photodynamic therapy**. *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews*. v. 12, p. 46-67, 2011.