

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA MOLECULAR

Tese de Doutorado

**ENTREGA DE FOTOSSENSIBILIZADORES MEDIADA
POR NANOFOLHAS DE ÓXIDO DE GRAFENO PARA
TERAPIAS FOTODINÂMICA E FOTOTÉRMICA
COMBINADAS NO TRATAMENTO DE CARCINOMA
MAMÁRIO *IN VITRO* E *IN VIVO***

MAYARA SIMONELLY COSTA DOS SANTOS

ORIENTADOR: PROF^ª. SÔNIA NAIR BÁO

Brasília, 30 de outubro de 2017

**ENTREGA DE FOTOSSENSIBILIZADORES MEDIADA
POR NANOFOLHAS DE ÓXIDO DE GRAFENO PARA
TERAPIAS FOTODINÂMICA E FOTOTÉRMICA
COMBINADAS NO TRATAMENTO DE CARCINOMA
MAMÁRIO *IN VITRO* E *IN VIVO***

Por

Mayara Simonelly Costa dos Santos

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília como parte integrante dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Biologia Molecular.

**ENTREGA DE FOTOSSENSIBILIZADORES MEDIADA
POR NANOFOLHAS DE ÓXIDO DE GRAFENO PARA
TERAPIAS FOTODINÂMICA E FOTOTÉRMICA
COMBINADAS NO TRATAMENTO DE CARCINOMA
MAMÁRIO *IN VITRO* E *IN VIVO***

Por

Mayara Simonelly Costa dos Santos

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília como parte integrante dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Biologia Molecular.

Membros componentes da banca examinadora:

Prof. Dr. Sônia Nair Bão (Presidente e Orientador)

IB-Universidade de Brasília

Prof. Dr. Eliana Martins Lima (Membro Titular)

UFG-Universidade Federal de Goiás

Prof. Dr. Graziella Anselmo Joanitti (Membro Titular)

FCE-Universidade de Brasília

Prof. Dr. Luciano Paulino da Silva (Membro Titular)

EMBRAPA-Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

Prof. Dr. Maria de Fátima Menezes de Almeida Santos (Membro Suplente)

IB-Universidade de Brasília

“It doesn’t matter how beautiful your theory is, it doesn’t matter how smart you are. If it doesn’t agree with experiment, it’s wrong.”

Richard Phillips Feynman

Agradecimentos

A Deus, pela vida e pela minha família tão maravilhosa. Tê-los em minha vida é o meu maior presente e alegria os meus dias.

Aos meus pais Ribamar e Genize, sempre tão presentes, fontes de força e amor na minha caminhada. Muito obrigada pelo exemplo diário de luta e determinação.

Ao meu irmão Eduardo, pelo apoio, amizade, cuidado e amor. Obrigada por eu sempre poder contar com você.

Ao meu esposo e amor Pedro, fonte de inspiração, tamanha a minha admiração, que fez com que tudo isso fosse possível. Agradeço o cuidado, carinho, compreensão, as discussões de física, química e matemática e, principalmente, pelo caminhar *junto* pela vida.

Aos meus avós maternos Dinorá e Antônio pela presença, amor, palavras de incentivo, apoio, carinho e orações.

Aos meus avós paternos Maria Euza (*In Memoriam*) e Antônio pelo apoio e amor dedicados.

À Inez, Giuliana, mais novo sobrinho, Chico, Taygoara, Isabel, Yan e Ana Letícia pelo apoio, amor, ajuda e torcida.

À Professora Sônia Nair Bão, pela oportunidade, orientação, apoio, ensinamentos e exemplo de profissionalismo, que contribuíram não só para o meu crescimento acadêmico e profissional, mas também para a minha formação como pessoa e ser humano. Obrigada por investir e confiar em mim nesses longos anos de convivência.

Ao Professor Leonardo Giordano Paterno- IQ, pelos ensinamentos, apoio e amizade nessa caminhada. Por ter me recebido tão bem em seu laboratório, auxiliando em momentos de urgência e dúvidas. A convivência com o senhor e seus alunos do Lab PolN, definitivamente, fizeram parte dos melhores momentos do doutorado e da vida.

Aos Professores Paulo Souza-IF e Fabiane Veiga- IB, pela amizade, apoio, ensinamentos e os momentos compartilhados, mesmo aos fins de semana, na produção de

resultados.

Ao Professor Ricardo Bentes de Azevedo, pela recepção e livre acesso ao Laboratório de Nanobiotecnologia, a qualquer hora, para condução da maior parte do estudo.

Aos Professores João Paulo Longo, Maria de Fátima, Graziela Anselmo Joanitti, Luís Alexandre Muehlmann, Aline Pic-Tylor, Zara Guimarães, José Raimundo Corrêa, Élide Campos, Maria Clotilde, Eliane Ferreira Noronha, Marcelo Valle, Marcelo Brígido, Robert G. Neil e Sônia Maria de Freitas pelos ensinamentos, ajuda, apoio e torcida.

Ao Professor César Romero, pela ajuda essencial nos experimentos *in vivo*.

Aos Professores Simone Odília e Valbert Cardoso-UFMG, por me apresentarem a Medicina Nuclear e me guiarem nos meus passos rumo ao doutorado sanduíche. Extrema gratidão.

Aos amigos do Laboratório de Microscopia Eletrônica, representados pela Ingrid, por todos esses anos de amizade, convivência, torcida, risadas e atenção. Obrigada por fazerem esse processo mais prazeroso e leve.

Aos amigos do Laboratório de Nanobiotecnologia, em especial a Karen, pela amizade, ajuda e atenção durante todos esses anos.

Aos amigos Priscila Rios, Alan Baggio e Caio Coradi do Lab PolN-IQ pela amizade e gentileza em sempre me ajudar com um grande sorriso.

À Zélia, ser humano iluminado. Sempre tão prestativa, competente e atenciosa. Obrigada pela amizade, que só enriqueceu os meus dias e pelos conselhos e reflexões, que eu levo com carinho em meu coração.

Ao Jaques, pela amizade, conselhos e ajuda no Laboratório de Bioquímica e Química de Proteínas.

À Ana Luisa Gouvêa da Silva e Ludmilla David de Moura pela amizade, pois sem elas eu não teria ido tão longe. Pelas risadas, apoio e companheirismo dia, tarde e noite. Aos amigos Cristiano Araújo e Luiz Phellipe pelo apoio nas madrugadas.

Aos amigos de Boston, Ilana, Mike e Patrick, pela amizade, generosidade e por contribuírem para o meu crescimento.

Aos amigos do Laboratório de Medicina Nuclear e Imagem Molecular do Boston Children's Hospital. Eu sinto falta de vocês todos os dias em meu coração.

Ao Jason Dearling, meu mentor e *boss*, obrigada pela amizade, almoços, risadas, laser nos olhos, exemplo, atenção, confiança, investimento de tempo e por acreditar em mim.

Ao James Inkster e Vamsidhar Akurathi, muito obrigada pelos conselhos, ajuda e enxergarem em mim potencial para coisas que eu nunca imaginei. Obrigada pelas conversas, exemplo de determinação, amizade e carinho.

Ao Alan Packard, meu mentor e *mega boss*, obrigada por ter aberto o seu laboratório pra mim e por me dar o prazer da grande oportunidade que foi trabalhar com você. Agradeço aos *cookies* caseiros no meio da tarde que varriam as dúvidas do coração.

Ao Frederic Fahey, grande amigo e portador da alegria! Obrigada pelos almoços, risadas, conversas, ensinamentos, conselhos, atenção, pelo exemplo de humildade, respeito, pai, professor, pesquisador e ser humano. Obrigada pela oportunidade! Agradeço também a Chris Fahey pelo carinho comigo e apoio durante todos os momentos em que estivemos juntas.

Agradeço a todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

À Universidade de Brasília pelo fornecimento da estrutura e oportunidade para a realização deste estudo. À CAPES, ao CNPq, a Finep, a FAP-DF e ao INCT de Nanobiotecnologia pelos auxílios concedidos, sem os quais este trabalho não poderia ter sido realizado.

Resumo

As fototerapias têm se mostrado como uma abordagem promissora frente às terapias convencionais para o tratamento do câncer. O presente estudo teve como objetivo produzir e avaliar a eficácia de ação da plataforma de nanofolhas de óxido de grafeno carboxilado associadas ao azul de metileno (NanoGO-AM) no uso das terapias fotodinâmica (TFD) e fototérmica (TFT) combinadas contra modelo de carcinoma mamário murino ortotópico singênico. *In vitro*, NanoGO-AM apresentou produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) após irradiação com luz de LED de 660 nm, e aumento de temperatura de 35,6 ° C seguido de irradiação com luz de laser. Os ensaios *In vivo* demonstraram um efeito aditivo obtido por NanoGO-AM com uso das TFD/TFT combinadas, que promoveram a ablação completa do tumor em 5/5 camundongos portadores de tumores de células 4T1-Luciferase. Até 30 dias após o último tratamento, não houve recidiva do tumor comparado aos grupos de TFD ou TFT apenas, que apresentaram bioluminescência tumoral 63 vezes maior que o grupo de tratamento para TFD/TFT combinadas. Estudos histológicos confirmaram que as terapias combinadas foram capazes de prevenir o crescimento tumoral e as metástases no fígado, pulmão e baço. Todos os dados sugerem o potencial de NanoGO-AM no tratamento de câncer de mama e prevenção de metástases. Na segunda parte do estudo, utilizou-se o cloreto de ftalocianina de alumínio (AlClFt), que é um fotossensibilizador hidrofóbico com alto rendimento quântico de oxigênio singleto. A combinação de nanofolhas de óxido de grafeno com AlClFt resultou em um dispositivo no qual o fotossensibilizador e o agente fototérmico estão em uma única nanoestrutura com potencial para uso em terapias combinadas. As nanofolhas de óxido de grafeno (NanoGO) foram produzidas a partir do método de Hummers tradicional e AlClFt foi adsorvido a sua superfície. Sob irradiação para TFD, NanoGO-AlClFt apresentou considerável produção de ERO em ambiente biológico. Células normais e tumorais (humanas e murinas), como MCF-7 (carcinoma mamário humano), MCF-10A (células normais de mama humana), 4T1-Luciferase (carcinoma mamário murino bioluminescente) e NIH/3T3 (célula de fibro-

blasto de embrião de camundongo) foram tratadas com NanoGO-AlClFt e irradiadas para TFD, TFT ou TFD/TFT combinadas. Houve uma redução significativa na viabilidade das células tumorais de até 90%, mostrando o potencial da plataforma NanoGO-AlClFt em produzir danos celulares irreversíveis em células de carcinoma de mamário humano e murino. Os ensaios *in vivo* com camundongos portadores de tumor de células 4T1-Luciferase demonstraram a eficiência do NanoGO-AlClFt na mediação da ablação parcial do tumor e na prevenção da progressão tumoral com o uso da TFD/TFT combinadas.

Palavras-chave: Terapia fotodinâmica, Terapia fototérmica, Óxido de grafeno, Corante fotossensibilizador, Azul de metileno, Cloreto de alumínio ftalocianina, Bioluminescência, Regressão tumoral e Prevenção de metástase

Abstract

Phototherapies have been shown as a promising alternative to the conventional therapies for cancer treatment. The present study aimed to prepare and use the nanographene oxide carboxylated-methylene blue platform (NanoGO-MB) to promote tumor ablation using combined photodynamic (PDT) and photothermal (PTT) therapies against a syngeneic orthotopic murine breast cancer model. *In vitro*, NanoGO-MB presented reactive oxygen species (ROS) production after LED light irradiation, and a temperature increase of approximately 40 °C followed by laser light irradiation. *In vivo* assays demonstrated an additive effect obtained by NanoGO-MB with the combined PDT/PTT therapies, which promoted complete tumor ablation in 5/5 4T1- Luciferase tumor-bearing mice. Up to 30 days after the last treatment, there was no tumor regrowth compared with PDT or PTT only groups, which displayed tumoral bioluminescence 63-fold higher than the combined PDT/PTT treatment group. Histological studies confirmed that the combined therapies were able to prevent tumor growth and liver, lung, and spleen metastasis. All data suggest the potential of NanoGO-MB in the treatment of breast cancer and metastasis prevention. In the second part of the study, it was used aluminum phthalocyanine chloride (AlPc), which is a hydrophobic photosensitizer with a high singlet oxygen species quantum yield. The combination of nanographene oxide and AlPc resulted in a device which the photosensitizer and the photothermal agent are in a single nanostructure with potential for use in the combined therapies. Graphene oxide nanosheets (NanoGO) were produced from a traditional Hummers method and AlPc was adsorbed on its surface. NanoGO-AlPc upon irradiation for PDT therapy displayed considerable ROS production in a biological environment. Normal and tumor cells (human and murine), as MCF-7 (human breast carcinoma cells), MCF-10A (human breast normal cells), 4T1-Luc (murine mammary tumor bioluminescent cells) and NIH/3T3 (murine embryo fibroblast cell) were treated with NanoGO-AlPc and irradiated for single PDT or single PTT and combined PDT/PTT therapies. There was a significant decrease in tumor cells viability of up to

90% showing the potential of platform NanoGO-ALPc in produce irreversible cell damage in human and murine breast carcinoma cells. *In vivo* assays with 4T1-Luc tumor-bearing mice demonstrated the efficiency of NanoGO-ALPc in mediating partial tumor ablation and preventing tumor progression with PDT and PTT combined therapies.

Keywords: Photodynamic therapy, Photothermal therapy, Graphene oxide, Photosensitizer dye, Methylene blue, Aluminum phthalocyanine chloride, Bioluminescence, Tumor regression and Metastasis avoidance

Sumário

Lista de Tabelas	p. xvi
Lista de Figuras	p. xvii
Lista de Abreviaturas, Siglas e Símbolos	p. xv
1 Introdução	p. 1
1.1 Referencial Teórico	p. 3
1.1.1 Câncer	p. 3
1.1.2 Carcinoma Mamário	p. 3
1.1.3 Nanotecnologia e Modalidades Terapêuticas Alternativas	p. 4
1.1.4 Terapia Fotodinâmica (TFD) e Terapia Fototérmica (TFT)	p. 5
1.1.5 Azul de Metileno-AM	p. 6
1.1.6 Cloreto de Alumínio Ftalocianina-ALClFt	p. 7
1.1.7 Grafeno e Óxido de Grafeno	p. 8
1.2 Justificativa	p. 10
1.3 Objetivos Gerais	p. 11
1.4 Objetivos Específicos	p. 11
2 Materiais e Métodos	p. 12
2.1 Materiais	p. 12

2.2	Preparo das Nanofolhas Óxido de Grafeno	p. 13
2.3	Associação de Pluronic F127 às NanoGO	p. 14
2.4	Associação dos Fotosensibilizadores às Nanofolhas de Óxido de Grafeno	p. 15
2.5	Caracterização das NanoGO-AM e NanoGO-AICIFt	p. 15
2.6	Espectroscopia do Ultravioleta (UV)-Visível e Espectroscopia do Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)	p. 16
2.7	Ultraestrutura de NanoGO	p. 16
2.8	Sistemas de Emissão de Luz de LED 660 nm e Laser IVP 808 nm	p. 17
2.9	Avaliação da Fototerapia Mediada por NanoGO	p. 19
2.10	Avaliação da Produção de Espécies Reativas de Oxigênio (ERO) por NanoGO-AM e NanoGO-AICIFt	p. 20
2.11	Cultivo e Manutenção Celular	p. 22
2.12	Ensaio de Viabilidade: Citotoxicidade e Fototoxicidade de NanoGO-AM e NanoGO-AICIFt	p. 22
2.13	Medição da Produção de ERO por Ressonância Paramagnética Eletrônica-RPE <i>In Vitro</i>	p. 24
2.14	Indução Tumoral, Terapias Fotodinâmica e Fototérmica Combinadas em Modelo Animal	p. 25
2.15	Imageamento <i>In Vivo</i> em Modelo de Tumor Ortotópico Singênico Murino em IVIS® Lumina XR	p. 29
2.16	Avaliação Macroscópica e Clínica de Órgãos e Tumor Obtido por Inoculação Ortotópica e Preparo para Histologia, apenas para o grupo NanoGO-AM	p. 33
2.17	Análise Imunohistoquímica de Proliferação Celular (PCNA), apenas para o grupo NanoGO-AM	p. 35

2.18	Análise Imunohistoquímica de Apoptose Celular, apenas para o grupo NanoGO-AM	p. 35
2.19	Análise Estatística	p. 36
3	Resultados e Discussão	p. 37
3.1	NanoGO-AM e NanoGO-AIClFt: Obtenção e Caracterização	p. 37
3.2	FTIR e Espectroscopia do UV-Visível	p. 40
3.3	Ultraestrutura de NanoGO	p. 45
3.4	Avaliação da Fototerapia Mediada por NanoGO	p. 46
3.5	Produção de Espécies Reativas de Oxigênio (ERO) por NanoGO-AM e NanoGO-AIClFt	p. 47
3.6	Ensaio de Viabilidade Celular	p. 51
3.7	Medição da Produção de ERO por Ressonância Paramagnética Eletrônica-RPE <i>In Vitro</i>	p. 57
3.8	Terapia Fotodinâmica e Fototérmica <i>In Vivo</i>	p. 60
3.9	Imageamento, Progressão Tumoral e Metástase	p. 63
3.10	Avaliação Macroscópica e Clínica de Órgãos e Tumor Obtido por Inoculação Ortotópica, apenas para o grupo NanoGO-AM	p. 74
3.11	Análise Histológica, apenas para o grupo NanoGO-AM	p. 76
3.12	Análise Imunohistoquímica de Proliferação e Apoptose Celular, apenas para o grupo NanoGO-AM	p. 80
4	Conclusão	p. 83
5	Perspectivas	p. 86

Referências	p. 87
Anexo1	
Aprovação do Comitê de Ética no Uso Animal-UnB	p. 97
Anexo2	
Artigo Aceito para Publicação	
Journal of Nanobiotechnology	p. 99

Lista de Tabelas

1	Amostras Análise UV-Vis	p. 16
2	Grupos de Tratamentos para Ensaio de Medição de ERO por RPE	p. 24
3	Grupo Experimental 1 Tratamentos NanoGO-AM	p. 27
4	Grupo Experimental 2 Tratamentos NanoGO-AlClFt	p. 27
5	Planos de Cortes de Inclusão de Órgãos em Parafina para Histologia	p. 34
6	Propriedades de NanoGO Carboxilado e NanoGO-AM	p. 39
7	Propriedades de NanoGO e NanoGO-AlClFt	p. 39
8	Grupos experimentais- Animais vivos	p. 66

Lista de Figuras

1	Azul de metileno e azul de leucometileno, produto da redução enzimática de AM. Retirado de Donovan <i>et al.</i> (2017).	p. 6
2	Cloreto de Alumínio Ftalocianina.	p. 8
3	Esquematização do grafeno e do óxido de grafeno.	p. 9
4	Sistemas de emissão luz de LED e laser.	p. 18
5	Medidor de energia e potência FIELD MAX II	p. 19
6	Realização do ensaio de produção de espécies reativas de oxigênio.	p. 21
7	Indução de tumor de células de carcinoma mamário murino em camundongos fêmeas BALB/c.	p. 26
8	Ilustração da proposta de estudo com NanoGO carboxilado-AM e NanoGO-AIClFt. Foram realizadas TFD, TFT e TFD/TFT combinadas <i>In Vivo</i>	p. 28
9	Equipamento para análise de bioluminescência.	p. 30
10	Esquema do desenho experimental para realização do experimento <i>in vivo</i> de fototerapias combinadas utilizando NanoGO carboxilado-AM em camundongos fêmeas portadoras do carcinoma mamário murino bioluminescente.	p. 31
11	Esquema do desenho experimental para realização do experimento <i>in vivo</i> de fototerapias combinadas utilizando NanoGO-AIClFt em camundongos fêmeas portadoras do carcinoma mamário murino bioluminescente.	p. 32
12	Aspecto final das soluções de NanoGO, NanoGO carboxilado, NanoGO-AIClFt e NanoGO-AM.	p. 38

13	Distribuição de diâmetro hidrodinâmico por intensidade da suspensão de nanofolhas de óxido de grafeno carboxilado associadas ao azul de metileno.	p. 40
14	Distribuição de diâmetro hidrodinâmico por intensidade da suspensão de nanofolhas de óxido de grafeno associadas ao cloreto de alumínio ftalocianina.	p. 40
15	FTIR do NanoGO (preto) e NanoGO carboxilado (vermelho).	p. 41
16	Espectroscopia de UV-Visível de óxido de grafeno (GO), nanofolha de óxido de grafeno carboxilado (NanoGO), azul de metileno livre (AM) e NanoGO-AM	p. 42
17	Espectro de fluorescência do AM em diversas concentrações com adição de nanofolhas de óxido de grafeno (concentração fixa de $12,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$).	p. 43
18	Espectro de absorção de AlClFt ($2,26 \mu\text{g.mL}^{-1}$) com adição de nanofolhas de óxido de grafeno em diversas concentrações.	p. 44
19	Espectro de fluorescência do AlClFt ($2,26 \mu\text{g.mL}^{-1}$) com adição de nanofolhas de óxido de grafeno em diversas concentrações.	p. 44
20	Caracterização ultraestrutural das NanoGO por MET e MEV	p. 45
21	Avaliação da fototermia de NanoGO carboxilado durante irradiação com luz de laser IVP 808 nm.	p. 46
22	Produção de espécies reativas de oxigênio por NanoGO carboxilado, AM e NanoGO carboxilado-AM.	p. 48
23	Produção de espécies reativas de oxigênio por NanoGO, AlClFt e NanoGO-AlClFt.	p. 50
24	Citotoxicidade no escuro do NanoGO carboxilado (A) e AM livre (B) em células murinas NIH-3T3 (controle normal) e 4T1 (tumoral) após tratamento por 24 horas.	p. 52
25	Citotoxicidade no escuro do NanoGO (A) e AlClFt livre (B) em células murinas NIH-3T3 (controle normal) e 4T1-Luciferase (tumoral) após tratamento por 24 horas.	p. 52

26	Citotoxicidade no escuro do NanoGO carboxilado (A), AM livre (B) e AlClFt livre (C) em células humanas MCF-10A (controle normal) e MCF-7 (tumoral) após tratamento por 24 horas.	p. 53
27	Fototoxicidade nas células NIH/3T3 (A) e 4T1 (B) após tratamento com NanoGO-AM por 24 horas e irradiação com luz de LED 660 nm e luz de laser IVP 808 nm.	p. 54
28	Fototoxicidade nas células NIH/3T3 (A) e 4T1-Luciferase (B) após tratamento com NanoGO-AlClFt por 24 horas e irradiação com luz de LED 660 nm e luz de laser IVP 808 nm.	p. 55
29	Fototoxicidade nas células MCF-10A (A) e MCF-7 (B) após tratamento com NanoGO-AM por 24 horas e irradiação com luz de LED 660 nm e luz de laser IVP 808 nm.	p. 55
30	Fototoxicidade nas células MCF-10A (A) e MCF-7 (B) após tratamento com NanoGO-AlClFt por 24 horas e irradiação com luz de LED 660 nm e luz de laser IVP 808 nm.	p. 56
31	Produção de ERO medidas por RPE nas célula 4T1-Luciferase após tratamento com NanoGO-AM (A), NanoGO-AlClFt (B) e irradiação com luz de LED 660 nm e luz de laser IVP 808 nm.	p. 59
32	Irradiação para terapia fotodinâmica (A) e fototérmica (B) <i>In Vivo</i>	p. 60
33	Imagens por câmera térmica dos animais durante a irradiação com o sistema de laser IVP 808 nm a fluência de $8,3 \text{ kJ.cm}^{-2}$	p. 61
34	Aspecto da ferida após a realização da terapia fototérmica com NanoGO-AM e irradiação com luz laser IVP 808 nm.	p. 62
35	Imagem de bioluminescência de células 4T1-Luciferase.	p. 64
36	Imagens de bioluminescência de camundongos BALB/c antes do início dos tratamentos com NanoGO-AM e irradiação, n=5.	p. 65

37	Representação gráfica dos dados de bioluminescência, volume tumoral relativo e peso corporal de camundongos BALB/c durante tratamento com NanoGO-AM e irradiação, n=5.	p. 67
38	Imagens de bioluminescência de camundongos do grupo apenas luz LED 660 nm, luz de laser IVP 808 nm e NanoGO-AM (sem irradiação), n=5.	p. 69
39	Imagens de bioluminescência de camundongos BALB/c antes do início dos tratamentos com NanoGO-AIClFt e irradiação	p. 70
40	Representação gráfica dos dados de bioluminescência, volume tumoral relativo e peso corporal de camundongos BALB/c durante tratamento com NanoGO-AIClFt e irradiação, n=5.	p. 72
41	Imagens de bioluminescência de camundongos do grupo apenas luz LED 660 nm, luz de laser IVP 808 nm e NanoGO-AIClFt (sem irradiação), n=5.	p. 73
42	Avaliação macroscópica e clínica dos animais após a eutanásia.	p. 75
43	Presença ou ausência de tumor na mama e ablação tumoral por TFT sozinha e terapias TFD/TFT combinadas.	p. 77
44	Prevenção de metástase no fígado no grupo TFT sozinha e terapias TFD/TFT combinadas.	p. 77
45	Prevenção de metástase no baço no grupo TFT sozinha e terapias TFD/TFT combinadas.	p. 78
46	Prevenção de metástase no pulmão apenas no grupo das terapias TFD/TFT combinadas.	p. 78
47	Ausência de metástase nos linfonodos dos animais dos grupos controle ou tratados com TFD ou TFT e terapias TFD/TFT combinadas.	p. 79
48	Ausência de metástase nos rins dos animais dos grupos controle ou tratados com TFD ou TFT e terapias TFD/TFT combinadas.	p. 79

49	Detecção <i>in situ</i> da apoptose pela coloração de TUNEL no tecido mamário controle e tumoral, e imunolocalização de células positivas para PCNA nos tecidos de mama e pulmão 30 dias após o último tratamento com as fototerapias.	p. 82
----	--	-------

Lista de Abreviaturas, Siglas e Símbolos

$^1\text{O}_2$	Oxigênio singleto
$^3\text{O}_2$	Oxigênio tripleto
4T1	Células de carcinoma mamário murino
4T1 – <i>Luciferina</i>	Células de carcinoma mamário murino bioluminescentes
<i>AlClFt</i>	Cloreto de alumínio ftalocianina
AM	Azul de Metileno
ANOVA	Análise de variância
BALB/ <i>c</i>	Linhagem de camundongo albino
BL	Bioluminescência
CMH	1-hidroxi-3-metoxicarbonil-2,2,5,5-tetrametilpirrolidina
CP.	3-carboxy-proxil
DBF	1,3-difenil-isobenzofurano
DETC	Trihidrato de dietilditiocarbamato de sódio
DF	Deferoxamina
DH	Diâmetro hidrodinâmico
DMEM	Dulbeco Modified Eagle Medium
DMEM	
HAM'SF12	DMEM adicionado de mistura nutriente Ham's F12
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ERO	Espécies Reativas de Oxigênio
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FS	Fotossensibilizador

<i>FTIR</i>	Espectroscopia do Infravermelho por Transformada de Fourier
<i>HE</i>	Hematoxilina e Eosina
<i>IBL</i>	Imagens de bioluminescência
<i>INCA</i>	Instituto Nacional do Câncer
<i>IPD</i>	Índice de polidispersão
<i>IV</i>	Infravermelho
<i>I.V.</i>	Intravenoso
<i>IVP</i>	Infravermelho próximo
<i>J</i>	Joule
<i>Lambda λ</i>	Comprimento de onda
<i>Laser</i>	Light amplification by stimulated emission of radiation (amplificação da luz por emissão estimulada de radiação)
<i>LED</i>	Diodo emissor de luz
<i>MCF – 7</i>	Células de carcinoma mamário humano
<i>MCF – 10A</i>	Células epiteliais normais de mama humana
<i>MET</i>	Microscópio eletrônico de transmissão
<i>MEV</i>	Microscópio eletrônico de varredura
<i>MTT</i>	Brometo de 3(4,5 dimetiltiazol-2il)-2,5-difeniltetrazólio
<i>NanoGO</i>	Nanofolhas de óxido de grafeno
<i>NanoGOcarboxilado</i>	Nanofolhas de óxido de grafeno carboxilado
<i>NanoGO – AM</i>	Nanofolhas de óxido de grafeno carboxilado associadas ao azul de metileno
<i>NanoGO – AlClFt</i>	Nanofolhas de óxido de grafeno associadas ao cloreto de alumínio ftalocianina
<i>NIH/3T3</i>	Células fibroblasto normal murino
<i>PBS</i>	<i>Phosphate buffered saline</i> -Tampão fosfato salino
<i>PCNA</i>	Proliferating cell nuclear antigen (antígeno nuclear de células em proliferação)
<i>POE</i>	Poli óxido de etileno

<i>POP</i>	Poli óxido de propileno
<i>RPE</i>	Ressonância Paramagnética Eletrônica
<i>ROI</i>	<i>Region of interest</i> (região de interesse)
<i>RPMI1640</i>	Meio de cultivo de células do Instituto Memorial Park Roswell
<i>SFB</i>	Soro Fetal Bovino
<i>SFE</i>	Soro Fetal Equino
<i>TFD</i>	Terapia Fotodinâmica
<i>TFT</i>	Terapia Fototérmica
<i>TUNEL</i>	Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated digoxigenin-deoxyuridine nick-end labeling (marcação de "nicks" por dUTP e deoxinucleotidil terminal transferase)
<i>UV – Vis</i>	Ultravioleta (UV)-Visível
<i>V</i>	Milivolts
<i>W</i>	Watts
<i>PZ</i>	Potencial zeta

1 *Introdução*

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 [1, 2]. Os tratamentos convencionais para esta doença consistem em cirurgia, radioterapia, quimioterapia, terapia hormonal e imunoterapia, que oferecem riscos de dano aos tecidos saudáveis ou erradicação incompleta das células malignas. Nesse sentido, torna-se necessária a busca por novas modalidades terapêuticas capazes de promoverem um melhor tratamento dessa doença [3, 4]. As terapias combinadas podem alcançar melhores resultados na erradicação do tumor ao se ter a soma dos seus efeitos terapêuticos individuais em um único dispositivo de tratamento [5–7]. As terapias fotodinâmica (TFD) e fototérmica (TFT) têm se destacado como promissoras alternativas terapêuticas no tratamento de diversos tipos de câncer devido à sua especificidade e potencial citotóxico [8–10]. A TFD utiliza-se de um fotossensibilizador (FS), oxigênio presente nos tecidos e células, e luz em um comprimento de onda específico. Esta tríade é então capaz de gerar espécies reativas de oxigênio e induzir efeitos tóxicos às células e tecidos-alvo [9]. A TFT faz uso de um agente fototérmico que ao absorver luz de comprimento de onda específico é excitado e, por meio de decaimento não radioativo, dissipa a energia absorvida na forma de calor [5, 11]. Esse calor induz ao aumento da temperatura localmente, causando dano celular irreversível devido à desnaturação das proteínas e ácido desoxirribonucleico (DNA) [9, 12].

Inúmeros FS têm se destacado para aplicação na TFD. Dentre eles, o azul de metileno (AM), que é um corante de fenotiazina atóxico e barato. Devido à sua forte absorção de banda larga de luz vermelha, ele possui forte eficiência fotodinâmica [13, 14]. O FS de segunda geração cloreto de alumínio ftalocianina também destaca-se pela absorção

na região do infravermelho próximo e elevado potencial fotodinâmico. No entanto, quando em meio aquoso, a sua hidrofobicidade atrapalha tanto a sua administração, quanto a sua capacidade em produzir espécies reativas de oxigênio pela formação de aglomerados [15–17].

A terapia fotodinâmica mediada pelos FS azul de metileno e cloreto de alumínio ftalocianina induz danos teciduais por gerar oxigênio nas formas singleto ou tripleto, os quais apresentam alta reatividade por uma variedade de estruturas e componentes celulares [9, 13, 15, 16, 18]. Para o direcionamento do FS para sítios específicos em sistemas biológicos, tem-se como alternativa o seu carreamento em formulações nanoestruturadas. Essa estratégia permite um maior nível de absorção do FS em células tumorais, além de minimizar sua degradação dentro do organismo antes que o sítio-alvo seja atingido [5]. No entanto, a utilização de nanocarreadores deve obedecer a certas condições, como: biocompatibilidade e preservação das características originais dos FS vetorizados [19]. Grafenos têm sido propostos como bons materiais para associação e entrega de fármacos, tais como agentes anticâncer [20]. A incorporação do azul de metileno e cloreto de alumínio ftalocianina as nanofolhas de óxido de grafeno, poderia protegê-los contra a degradação, agregação, preservar sua eficiência fotodinâmica e regular sua liberação em sistemas biológicos.

A presente Tese teve como objetivo a formulação de nanofolhas de óxido de grafeno carboxilado (NanoGO carboxilado) associadas ao azul de metileno (AM) e nanofolhas de óxido de grafeno (NanoGO) associadas ao cloreto de alumínio ftalocianina (AlClFt). Além de avaliar a possível eficácia do AM ou AlClFt em promoverem fototoxicidade quando associados a essas nanofolhas para aplicação nas terapias fotodinâmica e fototérmica combinadas em estudo *in vitro* e *in vivo*. Para tal, foram utilizadas células de linhagem murina e humana, como as linhagens murinas tumorais (4T1 e 4T1-Luciferase) e não-tumoral (NIH/3T3), e também as linhagens celulares humana não-tumoral (MCF-10A) e tumoral (MCF-7). Ademais, para a realização do estudo *in vivo* também foram utilizados camundongos fêmeas BALB/c para indução tumoral ortotópica com células da linhagem 4T1-Luciferase de carcinoma mamário murino bioluminescente.

1.1 Referencial Teórico

1.1.1 Câncer

Câncer é um grupo de doenças caracterizado pelo crescimento e espalhamento descontrolado de células anormais [21]. Esse comportamento é atribuído a múltiplas alterações na expressão gênica levando a desregulação no balanço de proliferação e morte celular [22]. O câncer evolui para uma população de células capazes de invadir tecidos e provocar metástase em tecidos distantes. Essas células alteradas podem se multiplicar e formar nódulos ou massas de tecido, os chamados tumores. As características que diferenciam um câncer maligno de um tumor benigno, são a capacidade de invadir tecidos adjacentes, se espalhar para linfonodos locais, vasos linfáticos e/ou corrente sanguínea e provocar metástase em órgãos distantes do corpo [22, 23]. Em muitos casos, as causas do câncer não são definidas, mas fatores endógenos — defeitos no sistema imune, hereditariedade, predisposição genética — e exógenos — radiação e substâncias químicas no ambiente — desempenham papéis importantes [1].

O câncer é a principal causa de morte nos países desenvolvidos e a segunda principal causa de morte nos países em desenvolvimento, após as doenças cardiovasculares, devido ao diagnóstico tardio [21]. Nos Estados Unidos da América (EUA), uma em cada quatro mortes é devida ao câncer. O câncer é também a segunda principal causa de morte no mundo, ficando atrás apenas das doenças cardiovasculares. Foram estimados 1.688.720 e 596.070 novos casos de câncer em 2017 para os EUA e em 2016-2017 para o Brasil, respectivamente [1, 24].

1.1.2 Carcinoma Mamário

Cada mama humana consiste entre 15 a 20 glândulas túbulo-alveolares compostas, cuja função é produzir e secretar o leite. O tipo mais comum de câncer de mama é o carcinoma ductal, tendo como origem as células epiteliais dos ductos mamários. O carcinoma lobular, que tem origem no tecido conjuntivo dos lobos ou lóbulos mamários, pode ser encontrado em ambas as mamas [25]. O câncer de mama é um dos tipos de câncer mais incidentes no mundo, correspondendo a cerca de 25,2% dos casos, e o mais

comum entre as mulheres [24].

A detecção precoce da doença é considerada um fator-chave para as taxas de sobrevivência [12, 26]. As taxas de mortalidade pelo câncer de mama continuam elevadas no Brasil, possivelmente devido a diagnósticos e tratamentos tardios da doença [24]. Os tratamentos convencionais para o câncer de mama consistem em cirurgia, radioterapia, quimioterapia, terapia hormonal e imunoterapia [8]. A aplicação de cada um dos tratamentos depende do estágio de desenvolvimento e localização do tumor e, em muitos casos, ocorre a combinação de mais de uma modalidade [3]. Esses métodos, apesar de apresentarem bons prognósticos ao paciente, oferecem riscos de danos aos tecidos saudáveis ou erradicação incompleta das células malignas [3]. As terapias convencionais, que por vezes são acompanhadas de efeitos adversos, podem ser mutilantes, debilitantes e suscitam a procura por novas metodologias de tratamento para o carcinoma mamário [3, 25].

1.1.3 Nanotecnologia e Modalidades Terapêuticas Alternativas

Técnicas convencionais de tratamento para o câncer como cirurgia, radioterapia e quimioterapia apresentam inúmeras limitações e têm se mostrado pouco eficazes na total remoção do tumor. E, apesar dos avanços que vêm sendo feitos nessas metodologias, a busca por métodos mais eficazes permanece e inspira o desenvolvimento de novas terapias [8]. Dentre as possíveis abordagens, as que baseiam-se em nanotecnologia oferecem tratamentos potencialmente locais e direcionados, com redução dos efeitos colaterais, das doses administradas e melhora da vida do paciente [12]. Diversos nanomateriais ou nanossistemas estão disponíveis para uso, como: nanopartículas de ouro, nanopartículas poliméricas, lipossomas, micelas, nanopartículas magnéticas e nanoemulsões [12, 15, 27]. Os nanossistemas podem ser modificados para apresentarem mais de uma característica de interesse como: entrega de fármacos, propriedades fotodinâmicas e fototérmicas, dando origem a uma plataforma multimodal [5, 16]. Nessa nova abordagem, duas ou mais modalidades terapêuticas são combinadas para a obtenção de um efeito sinérgico ou combinado, de modo a aumentar e melhorar a eficácia anticâncer [28, 29]. As fototerapias podem ser descritas como modalidades terapêuticas não invasivas, as quais envolvem o uso de luz visível. Estas técnicas têm inúmeras vantagens, tais como, controlabilidade remota e maior especificidade. Isso pois o FS ou o agente fototérmico está confinado na região

a ser tratada e apenas a região tratada recebe a irradiação, resultando em uma baixa toxicidade sistêmica [5, 30, 31].

1.1.4 Terapia Fotodinâmica (TFD) e Terapia Fototérmica (TFT)

A TFD surgiu como uma modalidade promissora de terapia contra o câncer nos últimos anos [9, 32]. A TFD envolve a combinação de três componentes: fotossensibilizador, luz de comprimento de onda específico e o oxigênio presente nos tecidos e células. Juntos, estes três elementos induzem efeitos tóxicos aos tecidos e células-alvo com base na produção de espécies reativas moleculares dependentes de oxigênio (ERO) [9, 18, 30, 32]. A luz visível é utilizada para estimular os FS para um estado eletronicamente excitado. A energia do estado excitado é então transferida para o estado fundamental do oxigênio molecular para gerar uma forma altamente oxidante de oxigênio conhecido como oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$). Este tem um tempo de vida curto ($<0,04$ microsegundos) e um pequeno raio de ação em sistemas biológicos, menor do que $0,02 \mu\text{m}$, reforçando mais uma vez a alta especificidade [33]. O estado tripleto do oxigênio ($^3\text{O}_2$) também pode ser produzido, sendo este um estado eletronicamente excitado mais estável e de longa duração [9]. Essas formas geram danos a biomoléculas na sua vizinhança próxima, incluindo lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos, o que resulta em baixa toxicidade sistêmica [30]. Portanto, a eficiência da TFD é determinada pela eficiência na produção de oxigênio singlete/triplete, que são produtos da eficácia do FS, das características da luz (intensidade e comprimento de onda) e da concentração de oxigênio no tecido ou sítio alvo [9, 13, 32].

A TFT é menos invasiva do que radioterapia, quimioterapia e cirurgia [34]. Na TFT, o agente fototérmico absorve luz de comprimento de onda específico e dissipa a energia absorvida por meio de um decaimento não radioativo, o qual induz o aumento da temperatura local, causando dano celular irreversível, pois há desnaturação das proteínas, DNA e coagulação do tecido [12]. A luz visível de infravermelho próximo (IVP) utilizada nesta técnica, além de maior poder de penetração tecidual, tem janela terapêutica correspondente ao comprimento de onda que é minimamente absorvido pela água, sangue e tecidos moles. Isso evita a excitação de compostos endógenos que podem produzir autofluorescência [34, 35].

As fototerapias têm como limitação o poder de penetração da luz utilizada para irradiação. Com isso, é necessária a escolha adequada de FS ou agentes fototérmicos que absorvam no comprimento de onda de maior penetração nos tecidos e que possuam uma alta capacidade de produção de $^1\text{O}_2$. Diversos tipos de cânceres vêm sendo tratados com as fototerapias [9,14]. Neste trabalho, o modelo tumoral escolhido para estudo foi o câncer de mama por ser um carcinoma superficial e de fácil irradiação.

1.1.5 Azul de Metileno-AM

Um FS ideal para TFD deve cumprir vários critérios. Dentre eles estão a pureza química, a seletividade tumoral, rápida liberação e acúmulo em tecidos-alvo, ativação em comprimentos de onda que penetrem profundamente nos tecidos, elevado potencial de ativação pela luz e em promover danos em células e tecidos [9,32]. No entanto, esse dano não deve ser causado a menos que o FS seja fotoativado, ou seja, esteja sob irradiação com luz de comprimento de onda específico. Um dos FS tradicionais que tem sido utilizado para uma variedade de aplicações, incluindo TFD, é o azul de metileno (AM) [13], figura 1.

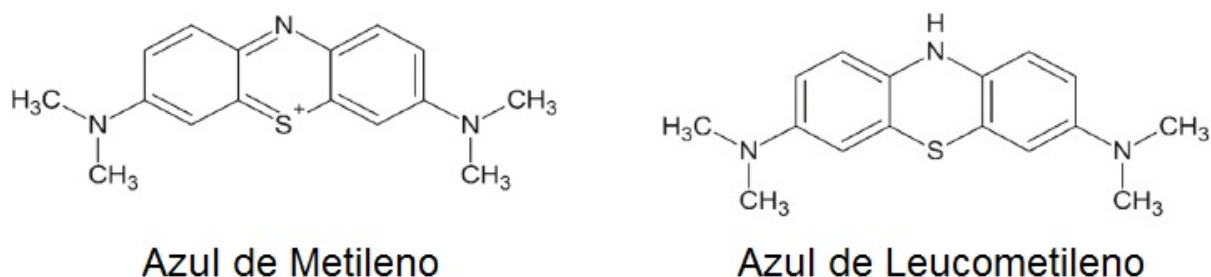


Figura 1: Azul de metileno e azul de leucometileno, produto da redução enzimática de AM. Retirado de Donovan *et al.* (2017).

O AM é aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA) para administração oral e intravenosa no tratamento de metahemoglobinemia¹. O AM é um corante de fenotiazina que tem forte absorção na banda larga de luz vermelha (550-700 nm, λ máximo 664 nm) e forte eficiência fotodinâmica, figura [14]. Devido ao seu elevado rendimento

¹Desordem caracterizada pela presença de meta-hemoglobina no sangue em nível um pouco mais elevado do que o normal. Por não se ligar ao oxigênio, a meta-hemoglobina pode levar a uma injúria eritrocitária, anemia funcional, hipóxia, acidose tecidual, cianose e morte [36,37].

quântico para geração de oxigênio singlete ($\phi = 0,52$) e baixa toxicidade, tem sido utilizado como FS para a TFD em diversos tipos de câncer [31,38,39]. No entanto, associada à sua hidrofiliabilidade, o AM apresenta perda de eficiência terapêutica após administração em sistemas biológicos. O produto da redução enzimática de AM, o azul de leucometileno, é incolor e com eficiência fotodinâmica insignificante [5,38,40], figura 1.

Um dos obstáculos que limitam a utilização de AM e outros FS para aplicações de TFD é a dificuldade na preparação de formulações farmacêuticas que permitam a sua administração sem a perda de eficiência fotodinâmica [41]. Para o direcionamento do AM para sítios específicos em sistemas biológicos, uma alternativa é o seu carreamento em formulações nanoestruturadas como nanofolhas de óxido de grafeno. No entanto, a utilização de nanocarreadores deve obedecer a certas condições, como biocompatibilidade e preservação das características originais dos FS vetorizados [19].

1.1.6 Cloreto de Alumínio Ftalocianina-AlClFt

Os agentes FS podem ser classificados como de primeira ou de segunda geração. Os FS de primeira geração eram obtidos a partir do sangue e modificados quimicamente. Estes compostos da família das porfirinas, apesar de serem promissores, apresentavam alta retenção pela pele. As moléculas FS de segunda geração exibiram uma melhora da eficiência fotodinâmica e menor acúmulo na pele. No entanto, elas demonstraram elevada hidrofobicidade e a baixa especificidade por células cancerígenas [15,42].

As ftalocianinas são FS de segunda geração reconhecidos pela sua eficiência e forte absorção na região do infravermelho próximo (600-800 nm) [16]. Portanto, devido à sua alta hidrofobicidade, esses compostos são candidatos ideais para associação em sistemas de entrega de fármacos [15]. A administração de AlClFt em meio aquoso é dificultada pela formação de aglomerados que interferem diretamente em suas propriedades fotofísicas, reduzindo o seu potencial na produção de ERO [16,17]. Além de que, quando da administração do AlClFt no organismo, este sofre rápida eliminação por fagócitos mononucleares [15].

O cloreto de alumínio ftalocianina, com pico de absorção máximo em 670 nm, destaca-se pela presença do íon metálico Al^{3+} no centro da molécula, figura 2. Existem

uma variedade de ftalocianinas que diferem pelo tipo de metal inserido na molécula [43,44].

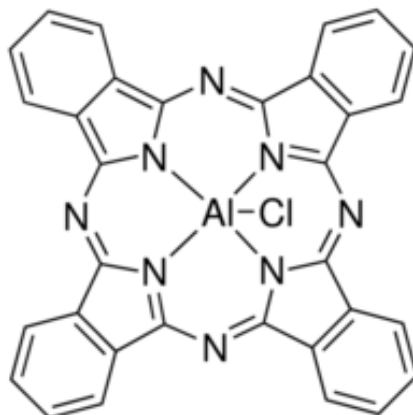


Figura 2: Cloreto de Alumínio Ftalocianina.

É possível visualizar o elemento alumínio (Al) no centro da molécula de AlClPc. Retirado do sítio da Sigma-Aldrich (www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/362530?lang=en®ion=US, acessado em: 13 de outubro de 2017).

1.1.7 Grafeno e Óxido de Grafeno

O grafeno é uma folha bidimensional (2D) de átomos de carbono em hibridização sp^2 com a espessura de apenas um átomo [45]. Desde que flocos de grafeno de poucas camadas foram isolados a partir de flocos de grafite em 2004, o grafeno tem atraído interesse no campo da ciência dos materiais, física, química, biotecnologia e nanomedicina [46–50]. Como em outros alótropos de carbono, ou seja, os fulerenos, nanotubos de carbono e grafite, o grafeno apresenta uma miríade única de propriedades químicas e físicas [47]. Devido a esta estrutura de folha, que tem área de superfície de aproximadamente $2630 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$, ele é adequado para o transporte de fármacos por meio da interação física ou conjugação química [46,51]. Grafenos têm sido propostos como bons materiais para ligação e entrega de fármacos, tais como agentes anticâncer, no entanto, ele é altamente hidrofóbico [20,45]. Inúmeras abordagens para a entrega de fármacos têm sido avaliadas *in vivo* e *in vitro* [5,46,52]. Para evitar a insolubilidade do grafeno em água, ele é primeiramente oxidado para formar o derivado de óxido de grafeno (GO), solúvel em água [53], figura 3.

O GO forma aglomerados em soluções biológicas tamponadas, tais como, meio de cultura de células ou soro [52]. Esta aglomeração é, provavelmente, devido às interações

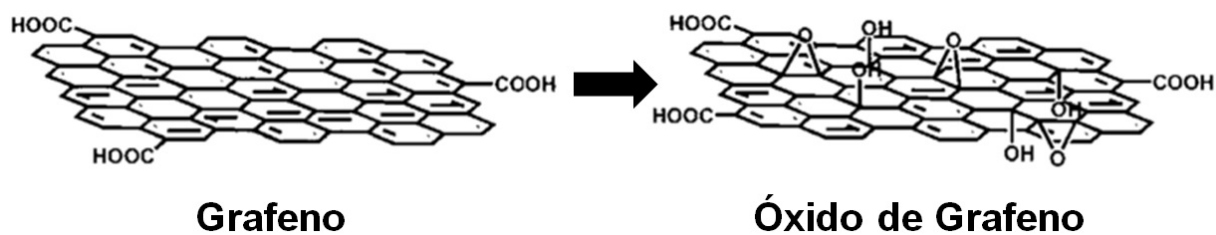


Figura 3: Esquematização do grafeno e do óxido de grafeno.

A. O grafeno possui uma menor variedade de grupos funcionais e menor solubilidade. B. O óxido de grafeno e seus grupos epóxi, hidroxila e ácido carboxílico, conferem maior solubilidade e permitem a associação de uma variedade de substâncias de interesse. Retirado e adaptado de Loh et al, 2010.

que ocorrem com sais e proteínas [5]. As propriedades físico-químicas do grafeno e seus derivados, como os grupos funcionais na superfície, carga, cobertura, tamanho e defeitos estruturais, são de extrema importância para o seu comportamento e desempenho *in vitro* e *in vivo*, bem como a sua toxicidade em sistemas biológicos [49]. A funcionalização de GO com polietilenoglicol (PEG) permite aumento da solubilidade em água e da estabilidade em sistemas biológicos [47]. No entanto, uma ligação GO-PEG exige uma reação química entre o PEG e os grupos ácido carboxílico do GO. Grupos esses que poderiam ser utilizados para a ligação de moléculas de interesse [5,54]. Os Pluronic são uma classe de copolímeros biocompatíveis, aprovados pelo FDA, que apresentam uma estrutura em tri-blocos [55]. Eles são formados intercalando-se uma cadeia hidrofílica (poli óxido de etileno, POE), uma hidrofóbica (poli óxido de propileno, POP) e uma hidrofílica novamente [56], resultando em uma cadeia de POE-POP-POE. A interação desse copolímero com o NanoGO baseia-se em uma interação hidrofóbica entre a parte hidrofóbica do Pluronic com a parte hidrofóbica do NanoGO [5]. Folhas de óxido de grafeno modificadas com polímeros não tóxicos mostraram-se eficientes como nanocarreadores para o transporte de diversos fármacos dentro do citoplasma das células cancerígenas. Estas folhas de óxido grafeno modificadas mostraram-se citocompatíveis e também não apresentaram qualquer toxicidade aguda significativa após dose de injeção intravenosa, administração oral ou intra-peritoneal em camundongos [52]. Além da mínima citotoxicidade e de funcionar como um excelente transportador de fármacos, folhas de grafeno também podem atuar como agente fototérmico, convertendo luz visível de infravermelho próximo em calor de forma eficiente e, com isso, induzir a fototerapia nas células-alvo e tecidos circundantes [57]. Existem poucos estudos relatando a entrega de FS hidrofílico mediado por

NanoGO *in vitro* e o efeito da entrega de FS mediado por NanoGO *in vivo* para avaliar seu efeito nas TFD e TFT combinadas.

Neste estudo foram realizadas a associação do azul de metileno às nanofolhas de óxido de grafeno carboxilado ou a associação do cloreto de alumínio ftalocianina às nanofolhas de óxido de grafeno para o uso em terapias fotodinâmica e fototérmica combinadas para o tratamento de carcinoma mamário humano e murino *in vitro*. Posteriormente, foram realizados ensaios *in vivo* em camundongos fêmeas BALB/c portadoras de carcinoma mamário murino ortotópico singênico empregando as duas nanoplateformas mencionadas, separadamente, para avaliação da eficácias das TFD e TFT combinadas.

1.2 Justificativa

O carcinoma de mama é o segundo tipo mais frequente no mundo, sendo mais comum entre as mulheres. A alta agressividade dessa neoplasia, associada ao elevado índice de diagnóstico tardio em países em desenvolvimento, suscita a busca por modalidades terapêuticas mais modernas, eficazes e menos invasivas. As plataformas de nanofolhas de óxido de grafeno associadas ao azul de metileno ou ao cloreto de alumínio ftalocianina podem apresentar baixa toxicidade e serem empregadas, tanto para entrega do FS hidrofílico AM ou hidrofóbico AlClFt, para o uso em TFD e/ou TFT, com as nanofolhas de óxido de grafeno como agente fototérmico e carreador. Ainda que tenham sido feitas algumas contribuições anteriormente, no estudo de nanoplateformas similares, não foram realizados estudos em um modelo tumoral murino ortotópico singênico que mimetiza o carcinoma mamário humano fase IV, o qual é adequado para se avaliar a eficácia anticâncer de novos candidatos para o tratamento desse tipo de carcinoma.

1.3 Objetivos Gerais

Formular nanofolhas de óxido de grafeno carboxiladas associadas ao azul de metileno e nanofolhas de óxido de grafeno associadas ao cloreto de alumínio ftalocianina, e avaliar a sua eficácia na utilização como agentes para TFD, TFT e TFD/TFT combinadas em estudo *in vitro* e *in vivo*.

1.4 Objetivos Específicos

- Formular e caracterizar nanofolhas de óxido de grafeno carboxilado associadas ao azul de metileno (NanoGO-AM) e nanofolhas de óxido de grafeno associadas ao cloreto de alumínio ftalocianina (NanoGO-AlClFt);
- Analisar as propriedades fotofísicas de AM, AlClFt, NanoGO, NanoGO-AM e NanoGO-AlClFt, bem como a capacidade de produção de ERO e aumento de temperatura (fototermia);
- Avaliar a eventual citotoxicidade no escuro de NanoGO, NanoGO carboxilado, AM e AlClFt em linhagens celulares murinas tumorais (4T1 e 4T1-Luciferase) e não tumoral (NIH/3T3), e também em linhagens celulares humanas tumoral (MCF-7) e não tumoral (MCF-10A) mediante diferentes tratamentos e concentrações;
- Avaliar a possível fototoxicidade das NanoGO-AM e NanoGO-AlClFt após irradiação para as TFD, TFT e TFD/TFT combinadas em células tumorais e não tumorais *in vitro*;
- Realizar as TFD, TFT e TFD/TFT combinadas, mediadas por NanoGO-AM ou NanoGO-AlClFt, em camundongos fêmeas BALB/c portadoras de carcinoma mamário murino bioluminescente (4T1-Luciferase) singênico ortotópico;
- Avaliar os possíveis efeitos como remissão tumoral e prevenção de metástase em camundongos fêmeas BALB/c após tratamentos com NanoGO-AM ou NanoGO-AlClFt e irradiação para TFD, TFT e TFD/TFT combinadas.

2 *Materiais e Métodos*

2.1 **Materiais**

Flocos de grafite ($0,45 \mu\text{m}$), nitrato de sódio, hidróxido de sódio, ácido monoclo-roacético, permanganato de potássio, ácido sulfúrico (98%), ácido clorídrico (36-37%) e peróxido de hidrogênio (30%) foram todos adquiridos da Sigma-Aldrich (MO, EUA) e utilizados como recebidos. Utilizou-se Pluronic F127 ($M_w 12.600 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) da BASF Corp. (EUA) sem purificação adicional. As células humanas epiteliais normais de glândula mamária (Michigan Cancer Foundation-10A, MCF-10A), as células humanas epiteliais tumorais de glândula mamária (Michigan Cancer Foundation-7, MCF-7), as quais têm origem de um adenocarcinoma, e as células epiteliais de carcinoma mamário murino (4T1) foram adquiridas do Banco de Células do Rio de Janeiro (Rio de Janeiro, Brasil). Os fibroblastos murinos (NIH/3T3) foram adquiridos da American Type Culture Collection (ATCC, EUA). As células bioluminescentes 4T1-Luciferase foram obtidas a partir da cotransfecção de células 4T1. Foi utilizado o kit Lipofectamine PLUS com o vetor de controle pGL-3 contendo luciferase de vagalume e o vetor de resistência puromicina, pKO-puro, de acordo com o protocolo Invitrogen (USA), no Laboratório de Nanobiotecnologia da Universidade de Brasília-UnB. Meios de cultura de células “Dulbecco’s modified Eagle’s medium” (DMEM) e “Roswell Park Memorial Institute” (RPMI 1640), soro fetal bovino (SFB) inativado a $55 \text{ }^\circ\text{C}$, soro fetal equino, insulina, hidrocortisona, fator de crescimento epidermal (FCE), toxina colérica, penicilina/estreptomicina, tripsina e 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT) e solução salina tamponada com fosfato (PBS) foram adquiridos da Gibco (NY, EUA). Etanol absoluto e dimetilsulfóxido (DMSO) foram adquiridos de Laborclin (Paraná, Brasil) e Sigma-Vetec (São Paulo, Brasil), respectivamente. Azul de metileno foi adquirido da Dinâmica (Brasil) e

cloreto de alumínio ftalocianina da Sigma-Aldrich (MO, EUA). Trihidrato de dietilditiocarbamato de sódio (DETC), deferoxamina (DF), 1-hidroxi-3-metoxicarbonil-2,2,5,5-tetrametilpirrolidina (CMH), 3-carboxy-proxil (CP.) e tampão Krebs HEPES foram comprados da Noxygen (Elzach, Alemanha). Toda a água utilizada foi do tipo ultrapura (18 M Ω .cm), fornecido pelo sistema de purificação Barnstead TM Easypure TM II da Thermo Scientific (CA, EUA). A diálise de suspensões de NanoGO foi realizada com sacos de diálise de 12 kDa MWCO da Sigma-Aldrich (MO, EUA). Filtros para ultracentrifugação Amicon Ultra-15 MWCO 100 kDa foram adquiridos da Millipore (MA, EUA). O cloridrato de ketamina (100 mg.mL⁻¹, Dopalen) foi obtido da Ceva Saúde Animal Ltda (São Paulo, Brasil), enquanto o cloridrato de xilazina (20 mg.mL⁻¹, Coopazine®) foi comprado da Coopers (São Paulo, Brasil). Os experimentos de TFD e TFT foram conduzidos a partir de dois sistemas de emissão de luz projetados e construídos no Laboratório de Software e Instrumentação em Física Aplicada da Universidade de Brasília-UnB. O sistema para TFD fornece luz de LED de 660 nm e, o sistema para TFT, luz de laser infravermelho próximo de 808 nm.

2.2 Preparo das Nanofolhas Óxido de Grafeno

A suspensão de óxido de grafeno (GO) foi obtida pelo método de exfoliação de Hummers e Offeman (1958) [58] no Laboratório de Polímeros e Nanomateriais (LabPolN) do Instituto de Química da Universidade de Brasília, com o auxílio do professor Dr. Leonardo Giordano Paterno. A suspensão de óxido de grafeno de tamanho nanométrico (NanoGO) foi obtida pelo método de ultrassonicação da suspensão de GO, como reportado por Zhang *et al.* (2011) e Gross (2014) [59, 60]. Parte da suspensão foi reservada para estudo com cloreto de alumínio ftalocianina, a outra parte prosseguiu para carboxilação. Para a reação de carboxilação foram misturados 200 mg (0,005 mol) de hidróxido de sódio e 150 mg (0,016 mol) de ácido cloroacético em 10 mL de suspensão de GO na concentração de 1 mg.mL⁻¹, conforme descrito por Sahu *et al.* (2013) [5]. A suspensão foi aquecida à temperatura de 45 °C, sob agitação magnética, durante quatro horas para que houvesse a reação de carboxilação. Terminada a reação, a mistura foi sonicada durante mais duas horas, para redução do tamanho das folhas de GO e produção do NanoGO, em sonda ultrassônica entre 450-500 Watts de potência (70% da intensidade do equipamento Q700

Sonicator, QSonica Llc) no modo pulso (sonda ligada por um segundo e desligada por dois segundos). Desse modo, houve a prevenção do aumento da temperatura da amostra, além de também ter sido utilizado um banho de gelo. Em seguida, a suspensão foi neutralizada por diálise em água ultrapura (resistividade de 18,2 M Ω .cm a temperatura de 25 °C) com o auxílio de membrana MWCO de 12.000 Daltons (MWCO, molecular weight cut-off ou corte de peso molecular) por dois dias. Durante todo o período foram realizadas frequentes trocas de água ultrapura, pelo menos duas vezes ao dia, para neutralizar o elevado pH 11 da suspensão. A suspensão foi então filtrada em membrana com poros de 0,22 μ m (Kasvi) para esterilização e retirada de aglomerados. Posteriormente, as concentrações das suspensões de NanoGO e NanoGO carboxilada foram determinadas com o auxílio de espectroscopia UV-Vis em espectrofotômetro Lambda 35 UV-vis (PerkinElmer, USA). Foram produzidas curvas de calibração em até cinco diferentes diluições da suspensão e a concentração da suspensão final determinada. A cada nova etapa de filtração da suspensão de NanoGO, a concentração era novamente determinada conforme supracitado. As nanofolhas de óxido de grafeno foram armazenadas em geladeira a temperatura de 10 °C para futuras caracterizações e ensaios biológicos.

2.3 Associação de Pluronic F127 às NanoGO

O copolímero não-iônico Pluronic F127 (Sigma-Aldrich) foi adicionado (100 mg) a 5 mL de suspensão de NanoGO (1 mg.mL⁻¹). A suspensão foi incubada à temperatura de 4 °C por 20 minutos para total dissolução do copolímero e, posteriormente, ultrassonicada por 30 minutos, como descrito anteriormente. A adsorção do copolímero à superfície do NanoGO foi facilitada pela incubação da suspensão de NanoGO mais Pluronic F127 a 37 °C por 30 minutos. O Pluronic F127 livre presente na suspensão foi removido a partir de sucessivas ultrafiltrações de spin a rotação de 5000 rpm por 15 minutos e a temperatura de 5 °C, em centrífuga Heraeus[®] Multifuge X3R (Thermo Scientific). Foram utilizados tubos ou unidades de centrifugação Amicon Ultra-15 com membranas de limite nominal de peso molecular (NMWL) ou corte de peso molecular (MWCO) de 100 kilodaltons (kDa). Isso significa que, em uma membrana de ultrafiltração de 100 kDa, 90% da substância de peso molecular de 100 kDa, colocada na parte superior do filtro, será retida. E os outros 10% da substância passarão para o filtrado, resultando na concentração e dessalinização da

substância. Após a ultrafiltração, foi determinada a nova concentração da suspensão de NanoGO a partir de uma curva de calibração com o auxílio de espectroscopia UV-Vis em espectrofotômetro.

2.4 Associação dos Fotosensibilizadores às Nanofolhas de Óxido de Grafeno

A associação do azul de metileno ou cloreto de alumínio ftalocianina ao NanoGO foi realizada pela mistura de uma solução aquosa de AM ou uma solução etanólica de AlClFt à suspensão de NanoGO sob agitação magnética. Foram adicionados uma massa de azul de metileno correspondente a 20% (m/m), no máximo, da massa de grafeno contida em suspensão. Uma hora após a mistura, o AM ou o AlClFt livre foram removidos também por ultrafiltração de spin a rotação de 5000 rpm por 15 minutos e a temperatura de 5 °C. As suspensões resultantes, chamadas de NanoGO-AM ou NanoGO-AlClFt, foram armazenadas a temperatura de 10 °C para estudos posteriores. O termo NanoGO-AM refere-se as nanofolhas de óxido de grafeno carboxilado associadas ao Pluronic F127 e ao azul de metileno. Já o termo NanoGO-AlClFt diz respeito as nanofolhas de óxido de grafeno associadas ao Pluronic F127 e ao cloreto de alumínio ftalocianina.

2.5 Caracterização das NanoGO-AM e NanoGO-AlClFt

NanoGO, NanoGO-AM, AlClFt e NanoGO-AlClFt foram diluídas a concentração de 5% e caracterizadas em termos de seus diâmetros hidrodinâmicos (DH) e índices de polidispersão (IPD) por espalhamento de luz dinâmica (ELD, laser 633 nm) utilizando Zetasizer[®] NanoZS (Malvern Instruments, Malvern, UK). As medições foram realizadas a temperatura de 25 °C e ângulo de dispersão fixo de 90° após a diluição das amostras em água ultrapura a concentração de 5% (v/v). Os Potenciais Zeta (PZ) das suspensões foram obtidos pela mobilidade eletroforética do mesmo equipamento mencionado.

2.6 Espectroscopia do Ultravioleta (UV)-Visível e Espectroscopia do Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

Amostras de AM, AlClFt, NanoGO, NanoGO-AM e NanoGO-AlClFt, sobretudo a confirmação da associação do AM ou AlClFt às nanofolhas, foram avaliadas por espectroscopia de absorção de UV-Vis em espectrofotômetro UV-vis Cary 5000 UV-Vis-NIR (Agilent Technologies) por meio da obtenção de espectros de fluorescência e absorção de UV-Vis. As amostras, conforme tabela 1, foram diluídas em 1 mL de água ultrapura e medidas. Os principais comprimentos de onda analisados foram de 660 e 670 nm, que referem-se aos comprimentos de onda de absorção do AM e AlClFt, respectivamente. O estudo dos grupos funcionais presentes na amostra, bem como a verificação da obtenção de NanoGO carboxilado, foi realizado a partir de espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR). Os espectros de FTIR foram adquiridos com o auxílio de um microscópio de infravermelho de transformada de Fourier Continuum ligado a uma bancada FTIR 6700 (Thermo Fisher, EUA) em modo de Reflexão Total Atenuada (ATR) (32 varreduras e resolução de 2 cm^{-1}).

Tabela 1: Amostras Análise UV-Vis

- (1) Óxido de grafeno;
- (2) Nanofolhas de óxido de grafeno ;
- (3) Nanofolhas de óxido de grafeno carboxilado;
- (4) Azul de metileno;
- (5) Cloreto de alumínio ftalocianina;
- (6) NanoGO-AM;
- (7) NanoGO-AlClFt.

2.7 Ultraestrutura de NanoGO

A ultraestrutura da NanoGO foi avaliada em microscópio eletrônico de transmissão (MET) JEOL JEM-1011 (JEOL, Japan). As NanoGO foram diluídas em água ultrapura para a concentração de 25%. Posteriormente, $3\ \mu\text{L}$ da solução foram transferidas para telas de cobre de 300 “mesh” (malhas), cobertas com o filme Formvar[®] 0,4%.

As nanofolhas foram analisadas em MET a 100 kV e processadas em câmera UltraScan[®] conectada ao programa Digital Micrograph 3.6.5[®] (Gatan, USA). A ultraestrutura das nanofolhas também foi analisada em microscópio eletrônico de varredura (MEV) JEOL JSM-700 1F (JEOL) a 15 kV. As nanofolhas foram diluídas em água ultrapura a concentração de 5%. Foram colocados 40 μL da solução em “stubs”, suportes de latão, previamente limpos com acetona. Após 24h, as amostras foram metalizadas com uma fina camada de ouro em Balzers SCD 050[®] Sputter Coater (Balzers Union AG, Liechtenstein) e observadas em MEV com câmera UltraScan[®] conectada ao programa Digital Micrograph 3.6.5[®] (Gatan, USA). Todas as análises foram realizadas no Laboratório de Microscopia Eletrônica-UnB.

2.8 Sistemas de Emissão de Luz de LED 660 nm e Laser IVP 808 nm

Para a irradiação do nanossistema de NanoGO-AM e condução dos experimentos de TFD e TFT, foram construídos dois dispositivos de irradiação de luz. O sistema emissor de luz de LED (Light Emitting Diode= Diodo Emissor de Luz) no comprimento de onda específico de 660 nm (vermelho escuro) e o sistema emissor de luz de laser diodo (Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation= Amplificação da Luz por Emissão Estimulada de Radiação) no comprimento de onda de IVP específico 808 nm, figura 4.

Ambos os sistemas foram projetados e construídos no Laboratório de Softwares e Instrumentação em Física do Núcleo de Física Aplicada do Instituto de Física da Universidade de Brasília pelo professor Dr. Paulo Eduardo Narcizo de Souza. Para TFD, o equipamento era composto por um LED de 660 nm modelo GP-100Wr6-G42M-Z3GL, da Green Powertech Solutions Limited. A energia foi controlada usando modulação de largura de pulso (PWM) aplicada a uma onda quadrada de 480 Hz. A temperatura foi controlada através de um refrigerador de água comercial Corsair H95, atuando como um dissipador de calor ligado ao LED de alta potência. O laser de infravermelho próximo de 808 nm foi controlado por uma fonte de alimentação DC modelo Agilent E4356A a 5,0 volts e 2,38 amperes. Em ambos os equipamentos, a calibração da irradiância foi realizada utilizando um medidor de energia e potência FIELD MAX II, item nº 1098580, número

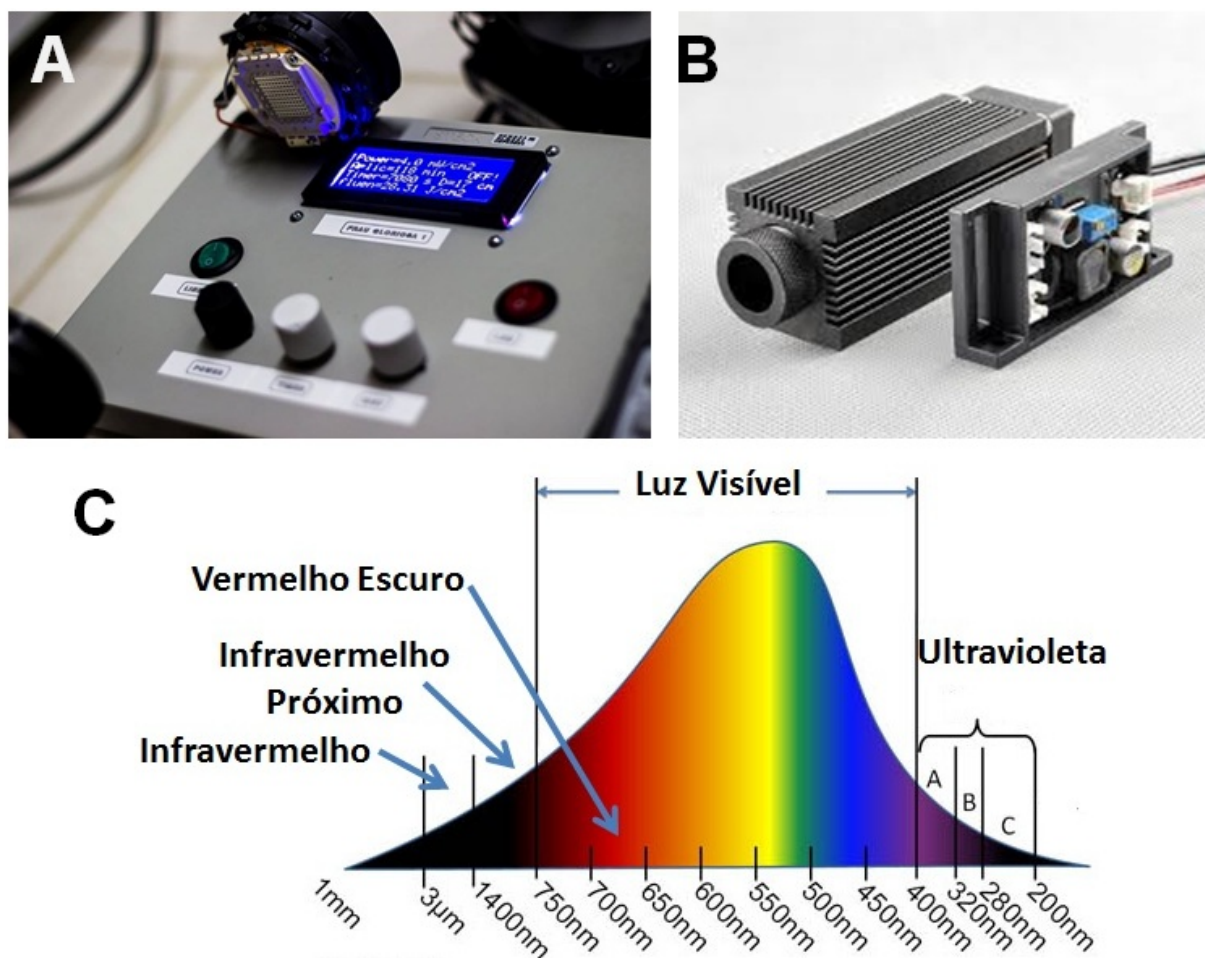


Figura 4: Sistemas de emissão luz de LED e laser.

A. Sistema emissor de luz de LED 660 nm. B. Sistema emissor de luz de laser de infravermelho próximo 808 nm. C. Espectro de absorção de luz visível. Destaque para os comprimentos de onda 660 e 808 nm..

de série 0099L11R da Coherente, obtendo dados individuais de cada ponto na faixa de aplicação, figura 5.

Para calcular a energia produzida em um determinado período de tempo por um LED, deve-se multiplicar a potência desenvolvida pelo LED em miliWatts (mW) ou Watts (W) pelo tempo de exposição em segundos. A energia do LED 660 nm $\implies 100 \text{ W} \times (60 \text{ s}) = 6000 \text{ mJ}$ ou 6 J. A partir do cálculo da energia pode-se calcular a densidade de energia (fluência) que foi aplicada em cada experimento. A fluência é medida em Joules.cm^{-2} e é determinada a partir da área que está sob irradiação. Por exemplo, se a área que está sendo irradiada pelo LED 660 nm, com energia de 6000 mJ, é de 2 cm^2 , a fluência será de $6000 \text{ mJ} / 2 \text{ cm}^2 = 3000 \text{ mJ.cm}^{-2}$ ou 3 J.cm^{-2} . O laser, diferentemente do LED, possui um



Figura 5: Medidor de energia e potência FIELD MAX II

A partir deste equipamento foram realizadas as calibrações da irradiância nos sistemas emissores de luz de LED 600 nm e luz de laser IVP 808 nm.

feixe coerente, ou seja, todas as ondas dos fótons que o compõe estão em fase. Em outras palavras, não importa a qual distância o feixe do laser está da amostra irradiada, que a energia dispersada por área será a mesma. Para calcular a energia produzida pelo laser IVP 808 nm é necessário também calcular a área do feixe. O feixe do laser é elipsóide e possui área de $0,26 \text{ cm}^2$ e a sua potência é de 2,4 W. Neste estudo, por exemplo, irradiou-se as células por 3 minutos (180 segundos), o que resultou em uma energia de $2,4 \text{ W} \times 180 \text{ s} = 432 \text{ Joules}$. A fluência aplicada por esse laser na área de $0,26 \text{ cm}^2$ foi de $1661,5 \text{ J.cm}^{-2}$ ou $1,7 \text{ kJ.cm}^{-2}$.

2.9 Avaliação da Fototerapia Mediada por NanoGO

NanoGO foi diluída a concentração de $200 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $200 \mu\text{L}$ da suspensão foram colocadas em placas de 96 poços, juntamente água deionizada, utilizada como controle.

A suspensão foi irradiada com luz de laser IVP 808 nm, a fluência de $5,5 \text{ kJ.cm}^{-2}$ por 10 minutos. A variação na temperatura da suspensão foi medida em tempo real, a cada minuto, com o auxílio de multímetro com termopar do tipo K (Minipa) e câmera térmica FLIR i40-i60 (FLIR Systems).

2.10 Avaliação da Produção de Espécies Reativas de Oxigênio (ERO) por NanoGO-AM e NanoGO-AlClFt

A produção de oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$) pelo NanoGO-AM ou NanoGO-AlClFt foi determinada a partir do método de degradação do 1,3-difenilisobenzofurano-($^1\text{O}_2$)-dependente. O reagente 1,3-difenil-isobenzofurano (DBF) é uma molécula que possui pico de absorção em $\lambda_{Max}=414 \text{ nm}$. Quando da produção de $^1\text{O}_2$, o DBF é degradado e sua absorbância diminui em relação diretamente proporcional a geração desta espécie reativa. Foram pesados 2,2 mg de DBF e, em seguida, adicionados 10 mL de etanol absoluto. A solução obtida foi colocada em banho ultrassônico, protegida da luz, por 10 minutos para uma melhor solubilização e utilizada em até duas horas no máximo. Duzentos microlitros de amostras de NanoGO carboxilado, AM e NanoGO-AM, em diversas concentrações, foram dispostos em microplacas de 96 poços para leitura em espectrofotômetro. Em seguida, foram adicionados $10 \mu\text{L}$ da solução de DBF às soluções e, sem irradiação, foi feita a leitura da absorbância em espectrofotômetro. O mesmo preparo foi conduzido para NanoGO, NanoGO-AlClFt e AlClFt. NanoGO-AM com DBF foi irradiada a cada 30 segundos (fluência de $30,00 \text{ J.cm}^{-2}$) até o tempo máximo de 10 minutos e NanoGO-AlClFt com DBF foi irradiada por 10 segundos (fluência de $3,94 \text{ J.cm}^{-2}$) até aproximadamente 3 minutos. Em seguida, foram realizadas as leituras em espectrofotômetro, figura 6. Esse procedimento foi repetido até a total estabilização da absorbância. O experimento foi realizado em triplicata e a absorbância aferida no comprimento de onda de 414 nm em espectrofotômetro SpectraMax M2 (Molecular Devices, USA) com o auxílio do programa SoftMax Pro (Molecular Devices).

Para a produção de ERO por NanoGO-AM foram utilizadas as seguintes amostras:

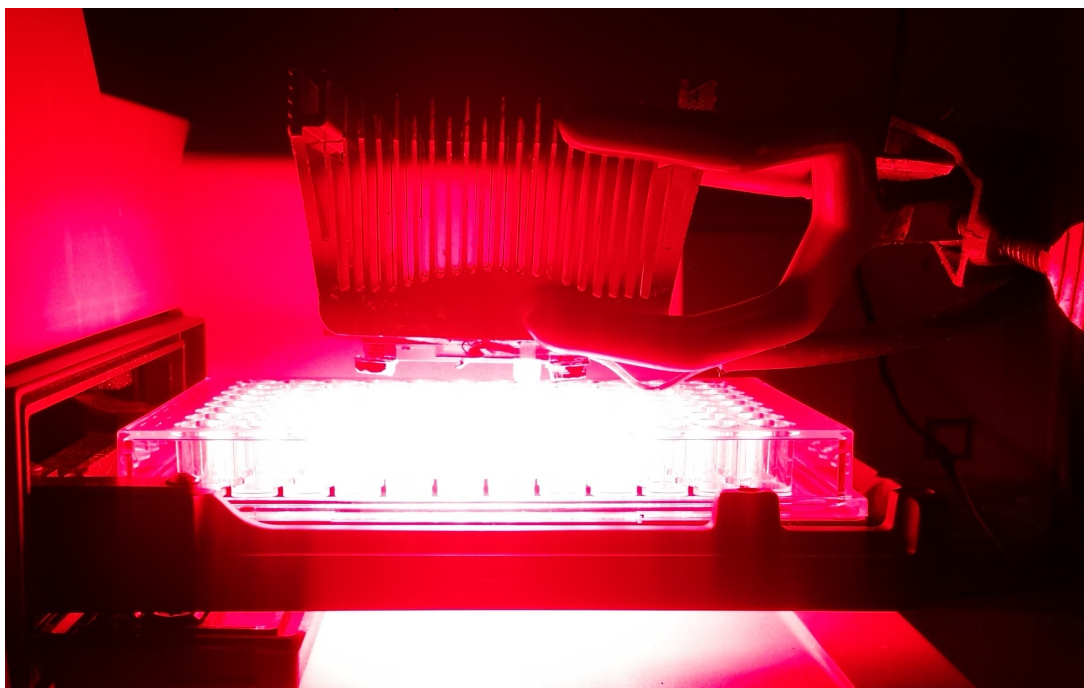


Figura 6: **Realização do ensaio de produção de espécies reativas de oxigênio.** Microplaca de 96 poços sendo irradiada por luz de LED de 660 nm por 30 segundos (fluência de $30,00 \text{ J.cm}^{-2}$).

- NanoGO carboxilado associado ao Pluronic F127 nas concentrações de 1, 2,5, 5 e $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$;
- AM nas concentrações de 1, 2,5, 5 e $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$;
- NanoGO carboxilado (+ Pluronic F127) a concentração fixa de $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e associado a 1, 2,5, 5 ou $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de AM.

Para a produção de ERO por NanoGO-AIClFt foram utilizadas as seguintes amostras:

- NanoGO associado ou não ao Pluronic F127 nas concentrações de 12,5 e $25 \mu\text{g.mL}^{-1}$;
- AIClFt em água nas concentrações de 0,039, 0,078, 0,156, 0,312, 0,624 e $1,248 \mu\text{M}$;
- NanoGO sem Pluronic F127 a concentração fixa de $12,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e associado a 0,039, 0,078, 0,156, 0,312, 0,624 ou $1,248 \mu\text{M}$ de AIClFt;

- NanoGO (+ Pluronic F127) a concentração fixa de $12,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e associado a 0,039, 0,078, 0,156, 0,312, 0,624 ou $1,248 \mu\text{M}$ de AIClFt.

2.11 Cultivo e Manutenção Celular

As linhagens NIH/3T3 (fibroblasto murino) e 4T1-Luciferase (carcinoma mamário murino) foram cultivadas em meio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) suplementado com soro fetal bovino inativado a 10% e antibiótico (100 UI.mL^{-1} penicilina e $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ streptomina) a 1%, pH 7,2. As células 4T1 e MCF-7 foram cultivadas conforme supracitado, no entanto, com meio RPMI 1640. E as células MCF-10A foram cultivadas em meio DMEM (50%)/DMEM HAM'S F12 (50%). Todas as células foram mantidas em incubadora a 37°C , 5% de CO_2 e umidade de 80%.

2.12 Ensaios de Viabilidade: Citotoxicidade e Foto-toxicidade de NanoGO-AM e NanoGO-AIClFt

Para determinação da viabilidade das células normais e tumorais (humanas e murinas) frente aos fotossensibilizadores AM e AIClFt e ao NanoGO regular e carboxilado, os seguintes grupos experimentais foram estudados:

(1) células sem tratamento (apenas com meio de cultivo), (2) células tratadas com NanoGO ou NanoGO carboxilado, (3) células tratadas com apenas AM ou apenas AIClFt. As concentrações de estudo foram determinadas com base na literatura disponível [5]. Primeiramente, as células foram tratadas com NanoGO regular e carboxilado nas concentrações de 3,1, 6,25, 12,5, 25 e $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$, AM nas concentrações de 1, 2,5, 5 e $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e AIClFt nas concentrações de 0,039, 0,078, 0,156, 0,312, 0,624 e $1,248 \mu\text{M}$. Essas células não receberam qualquer irradiação com luz de LED ou laser. Após os diferentes tratamentos, as células foram mantidas em incubadora úmida por 24 horas para permitir a captação de NanoGO, NanoGO carboxilado, AM e AIClFt.

Para determinação da viabilidade das células normais e tumorais (humanas e murinas), após efeito de TFD, TFT e TFD/TFT combinadas, induzidas pelo LED 660

nm e/ou laser infravermelho próximo 808 nm, foram estudados os seguintes grupos: (1) células sem tratamento (apenas com meio de cultivo), (2) células tratadas com AM ou AlClFt, (3) células tratadas com NanoGO ou NanoGO carboxilado e (4) células tratadas com NanoGO-AM ou NanoGO-AlClFt. Para verificar a fototoxicidade do LED e do laser sozinhos, grupos de células foram irradiados somente com LED 660 nm por 3 minutos a fluência de 30,00 J.cm⁻² ou laser IVP 808 nm por 3 minutos a fluência de 1,7 kJ.cm⁻². As células foram incubadas por mais 24 horas para verificação da viabilidade celular pós-tratamentos.

Para a realização da TFD e TFT as concentrações de trabalho escolhidas foram as de menor concentração e que apresentaram a menor citotoxicidade no escuro. Para NanoGO e NanoGO carboxilado as concentrações escolhidas foram de 12,5 µg.mL⁻¹, para AM a concentração ideal foi a de 2,5 µg.mL⁻¹ e a concentração de 0,312 µM foi a utilizada para AlClFt. Para os grupos de TFD, a irradiação ocorreu por 3 minutos a fluência de 30,00 J.cm⁻². Para os grupos de TFT, a irradiação também ocorreu por 3 minutos a fluência de 1,7 kJ.cm⁻². Para a TFD/TFT combinadas as células foram primeiramente tratadas com o LED 660 nm e posteriormente com o laser IVP 808 nm, nas mesmas condições mencionadas anteriormente. As células foram incubadas por mais 24 horas para posterior avaliação da viabilidade após os tratamentos. Foram realizados três experimentos independentes, todos em quadruplicatas (n=4).

Para a realização de todos os ensaios, 3 x 10³ células normais e tumorais, foram semeadas em microplacas de 96 poços e tratadas como descrito acima. Decorridos os tratamentos, as células foram incubadas com 150 µL de solução de meio de cultura contendo brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio (MTT) (5 mg.mL⁻¹ em 0,15 M de PBS , pH 7,4) por duas horas e meia em incubadora úmida. Removida a solução, foram adicionados 200 µL de dimetilsulfóxido para solubilização dos cristais de formazano, formados somente pelas células viáveis. A absorbância foi determinada em espectrofotômetro (SpectraMax M2, Molecular Devices, USA) utilizando o comprimento de onda de 595 nm, com o auxílio do programa SoftMax Pro (Molecular Devices).

2.13 Medição da Produção de ERO por Ressonância Paramagnética Eletrônica-RPE *In Vitro*

Preparou-se uma solução estoque de 10 mM de 1-hidroxi-3-metoxicarbonil-2,2,5,5-tetrametilpirrolidina (CMH), dissolvida em tampão Krebs HEPES contendo 25 mM de deferoxamina (DF) e 5 mM de trihidrato de dietilditiocarbamato de sódio (DETC), um quelante de ferro e outro de cobre, na devida ordem, para minimizar a oxidação do CMH por metais de transição. As soluções foram preparadas imediatamente antes dos experimentos e mantidas em gelo durante todo o decorrer dos experimentos. Para a quantificação de ERO nas células 4T1-Luciferase, 5×10^4 células foram semeadas em placas de 24 poços e mantidas em incubadora úmida durante 24 horas. Transcorrido esse tempo, as células foram tratadas e divididas nos seguintes grupos (n=3), confoeme a tabela 2:

Tabela 2: **Grupos de Tratamentos para Ensaio de Medição de ERO por RPE**

Grupos NanoGO-AM	Grupos NanoGO-AIClFt
Controle	Controle
LED 660 nm	LED 660 nm
Laser 808 nm	Laser 808 nm
NanoGO-AM	NanoGO-AIClFt
NanoGO LED 660 nm	NanoGO LED 660 nm
NanoGO Laser 808 nm	NanoGO Laser 808 nm
AM LED 660 nm	AIClFt LED 660 nm
NanoGO-AM LED	NanoGO-AIClFt LED
NanoGO-AM Laser	NanoGO-AIClFt Laser
NanoGO-AM LED/Laser	NanoGO-AIClFt LED/Laser

Foram adicionados 12 μL de CMH para atingir a concentração final de 200 μM por poço e, em seguida, foram feitas as irradiações com luz de LED 660 nm (fluência de $14,94 \text{ J}\cdot\text{cm}^{-2}$) e luz de laser IVP 808 nm (fluência de $1,7 \text{ kJ}\cdot\text{cm}^{-2}$). As placas foram incubadas por 60 min em incubadora úmida a 37 °C. Posteriormente a incubação, 450 μL do sobrenadante foram colocados em seringa de 1 mL e imediatamente congelados em nitrogênio (N_2) líquido. Todas as amostras foram armazenadas a -80 °C até que fossem realizadas as medições em espectrômetro Bruker EMXplusTM (Bruker, Alemanha).

As amostras congeladas foram transferidas das seringas para o suporte *Finger Dewer* de suprasil¹ repleto com N_2 líquido. Todas as medidas de RPE foram realizadas à

¹Materiais de sílica fundida sintética de alta pureza fabricados por hidrólise a quente de tetracloreto

temperatura de nitrogênio líquido (77 K, equivalente a -196 °C). Para a curva de calibração das medidas de ERO, foram preparadas amostras a partir de uma solução-mãe de 10 mM do padrão 3-carboxy-proxil (CP·), preparado em tampão Krebs HEPES, e diluído a concentrações de 0, 10, 50, 100, 250 e 500 μM . Exatamente 450 μL das amostras de calibração foram transferidos para seringas de 1 mL e congelados instantaneamente em N_2 líquido.

As medidas de RPE foram realizadas em um espectrômetro Bruker EMXplus de onda contínua utilizando a banda X (9 GHz), em cavidade de alta sensibilidade (ER 4119HS). Para as medidas de ERO, foi utilizada a potência de 2 mW, campo de modulação de 5 Gauss, frequência de modulação 100 kHz, tempo de varredura de 10 s. Para medida da amplitude foi utilizado o espectro da média de 5 varreduras com 200 Gauss de largura de varredura adicionados em conjunto para cada medição. As medidas foram realizadas no Laboratório de Ressonância Paramagnética Eletrônica do Instituto de Física da Universidade de Brasília-UnB.

2.14 Indução Tumoral, Terapias Fotodinâmica e Fototérmica Combinadas em Modelo Animal

Previamente à indução tumoral, as células 4T1-Luciferase foram testadas quanto a capacidade de produzir imagens de bioluminescência (IBL). A quantidade de 1×10^4 células (na passagem número três) por poço foram semeadas em microplacas de 96 poços e cultivadas em incubadora úmida a 37 °C e 5% de CO_2 por 24 horas. IBL foram produzidas pela adição de 10 μL de D-luciferina ($15 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) por poço, antecedido pela remoção ou não dos 200 μL de meio de cultivo DMEM presentes na placa. Foram adquiridas 20 IBLs, imediatamente após a adição da D-luciferina aos poços, com tempo de exposição de 60 segundos para cada imagem e campo de visão de 12,5 cm. A imagem que conteve o maior pico de emissão de bioluminescência da D-luciferina (λ emissão= 560 nm) foi selecionada para posterior análise em software Living Image[®] 4.5.5*.

Para a indução tumoral foram utilizados camundongos fêmeas BALB/c, com idade aproximada de oito semanas e massa de 21-25 gramas, fornecidos pelo biotério do
de silício (SiCl_4).

Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares-IPEN-CNEN (São Paulo). Durante a fase experimental, os animais permaneceram no biotério do Departamento de Genética e Morfologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, com ciclos de claro e escuro de 12/12 horas, ração balanceada e água *ad libitum*. Os animais foram manipulados de acordo com as diretrizes da Comissão de Ética no Uso Animal-CEUA/UnB, sob aprovação número 55692/2015, anexo 1. Os camundongos foram anestesiados com 100 μL de solução anestésica composta de ketamina (20 μL), xilasina(12 μL) e água ultrapura estéril (68 μL). Foram utilizadas agulhas de comprimento de 5 (cinco) mm e espessura de 0,25 mm. Os animais anestesiados foram acomodados em decúbito dorsal, em um ambiente asséptico, e sob microscópio estereoscópio. A papila da quinta glândula mamária inguinal do lado esquerdo foi pinçada, em ângulo reto (90°), e inoculada no ducto lactífero principal com 50 μL de meio DMEM (sem adição de soro fetal bovino) contendo 2×10^4 células da linhagem 4T1-Luciferase (células de carcinoma mamário murino modificadas para produzir bioluminescência, na passagem de número 3), conforme a figura 7. A agulha foi introduzida 1,0 mm diretamente na papila mamária, alcançando os ductos lactíferos de modo a induzir um tumor sólido ortotópico singênico.



Figura 7: Indução de tumor de células de carcinoma mamário murino em camundongos fêmeas BALB/c.

O tamanho do tumor nos animais, pré e pós-tratamentos, foi aferido com o auxílio de um paquímetro digital e calculado de acordo com a fórmula: volume = (comprimento

tumor) \times (largura tumor)²/2. Os valores obtidos foram expressos como volumes tumorais relativos $V_{final}/V_{inicial}$ ($V_{inicial}$ refere-se ao volume tumoral de quando o tratamento foi iniciado). Quinze dias após a inoculação das células tumorais, quando os tumores alcançaram o volume de aproximadamente 25 mm³, os animais foram aleatoriamente divididos em grupos experimentais de cinco animais cada ($n = 5$), conforme tabelas 3 e 4.

Tabela 3: **Grupo Experimental 1 Tratamentos NanoGO-AM**

- (1) Animais controle sadio;
- (2) Animais com tumor tratados com solução salina (PBS, pH 7,2);
- (3) Animais com tumor tratados apenas com luz de LED 660 nm;
- (4) Animais com tumor tratados apenas com luz de laser IVP 808 nm;
- (5) Animais com tumor tratados apenas com NanoGO-AM;
- (6) Animais com tumor tratados com NanoGO-AM para TFD (luz de LED 660 nm);
- (7) Animais com tumor tratados com NanoGO-AM para TFT (luz de laser IVP 808 nm);
- (8) Animais com tumor tratados com NanoGO-AM e irradiados para TFD/TFT combinadas.

Tabela 4: **Grupo Experimental 2 Tratamentos NanoGO-AIClFt**

- (1) Animais controle sadio;
- (2) Animais com tumor tratados com solução salina (PBS, pH 7,2);
- (3) Animais com tumor tratados apenas com luz de LED 660 nm;
- (4) Animais com tumor tratados apenas com luz de laser IVP 808 nm;
- (5) Animais com tumor tratados apenas com NanoGO-AIClFt;
- (6) Animais com tumor tratados com NanoGO-AIClFt para TFD (luz de LED 660 nm);
- (7) Animais com tumor tratados com NanoGO-AIClFt para TFT (luz de laser IVP 808 nm);
- (8) Animais com tumor tratados com NanoGO-AIClFt e irradiados para TFD/TFT combinadas.

Para a administração e realização dos tratamentos, os animais foram anestesiados intraperitonealmente com 100 μ L da mistura anestésica de ketamina (20 μ L)/xilazina (12 μ L)/água ultrapura estéril (68 μ L) e administrados intratumoralmente com 25 μ L de NanoGO-AM (concentração de 10 mg.kg⁻¹ de NanoGO carboxilado e 2 mg.kg⁻¹ de AM) ou NanoGO-AIClFt (concentração de 10 mg.kg⁻¹ de NanoGO e 1,2 μ M de AIClFt), conforme figura 8.

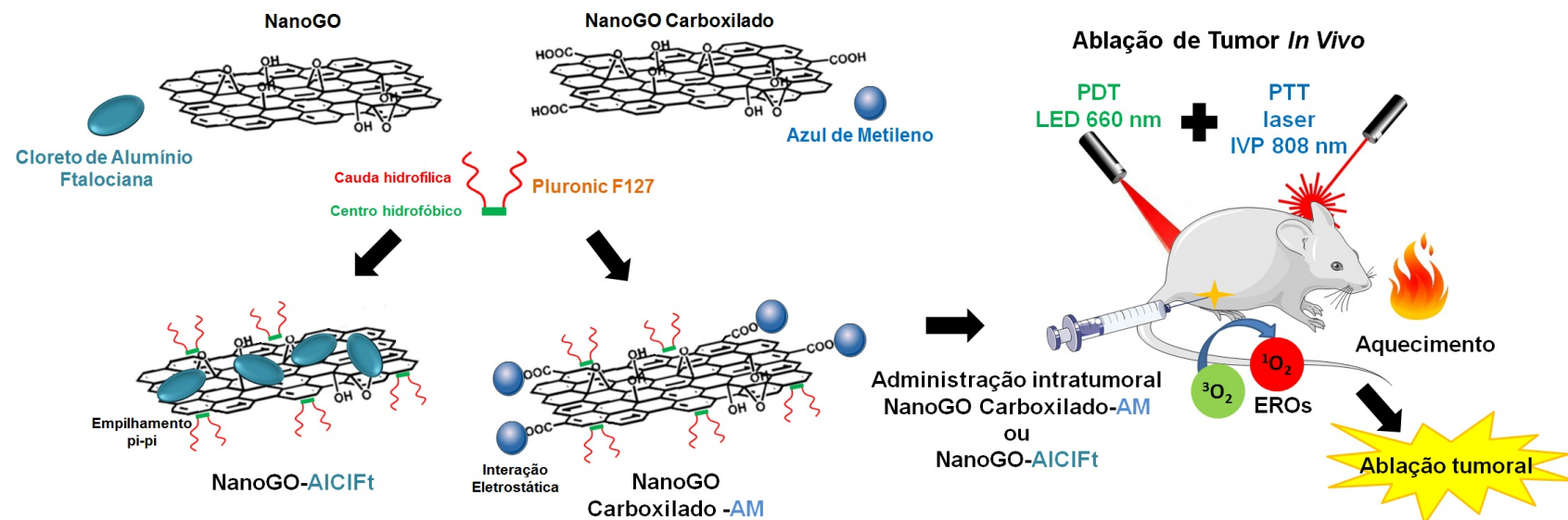


Figura 8: Ilustração da proposta de estudo com NanoGO carboxilado-AM e NanoGO-AICIFt. Foram realizadas TFD, TFT e TFD/TFT combinadas *In Vivo*.

Foram produzidas as nanofolhas de óxido de grafeno (NanoGO), e paralelamente, foram preparadas as nanofolhas de óxido de grafeno carboxilado (NanoGO). Ambas nanofolhas foram associadas ao copolímero Pluronic F127 para aumento de biocompatibilidade em sistemas biológicos. NanoGO-AICIFt foi resultado da associação de nanofolhas de óxido de grafeno ao cloreto de alumínio ftalocianina. NanoGO carboxilado-AM são nanofolhas de óxido de grafeno carboxilado associadas ao azul de metileno. AICIFt e AM são FS capazes de gerar ERO sob irradiação com luz de comprimento de onda 670 e 660 nm, respectivamente. NanoGO e NanoGO carboxilado sob luz de IVP 808 nm sofrem decaimento não-radioativo e liberam energia na forma de calor, funcionando como agentes fototérmicos. NanoGO-AICIFt e NanoGO carboxilado-AM foram nanoplateformas mediadoras da TFD, TFT e TFD/TFT combinadas em estudos *in vitro* e *in vivo* contra células humanas e murinas de carcinoma mamário. Os animais portadores de carcinoma mamário ortotópico singênico 4T1-Luciferase foram irradiados para TFD a fluência de $90,78 \text{ J.cm}^{-2}$ (10 minutos) e para TFT a fluência de $8,3 \text{ kJ.cm}^{-2}$ (15 minutos).

Dez minutos após a administração da nanoplataforma foi realizada a irradiação para TFD, TFT e TFD/TFT combinadas, esse processo foi chamado de primeiro tratamento. Foram realizados um total de três tratamentos, todos idênticos ao procedimento descrito anteriormente. Durante a irradiação para TFD e/ou TFT os animais foram cobertos com folha de papel alumínio e apenas a área do tumor foi exposta as terapias. Adicionalmente, foi feita uma proteção para a cabeça e olhos dos animais. Algodão embebido em soro fisiológico foi colocado nos olhos, de modo a evitar o ressecamento da mucosa, e uma espécie de capacete cobria a cabeça dos camundongos, a fim de evitar cegueira ocasionada pelas irradiações. Para TFD (luz de LED 660 nm) foi utilizada a fluência de $90,8 \text{ J.cm}^{-2}$ por 10 minutos, a uma distância de cinco centímetros. Na TFT, o spot de luz de laser infravermelho próximo de 808 nm foi posicionado a 15 cm de distância do camundongo e utilizada a fluência de $8,3 \text{ kJ.cm}^{-2}$ por 15 minutos. Para TFD/TFT combinadas, a irradiação para TFD foi realizada primeiro, seguida da irradiação para TFT. A TFT pode induzir variação da temperatura na área irradiada no animal, portanto, a temperatura dos sítos irradiados foi medida em tempo real por câmera térmica FLIR i40 - i60 (FLIR Systems).

2.15 Imageamento *In Vivo* em Modelo de Tumor Ortotópico Singênico Murino em IVIS[®] Lumina XR

O volume tumoral de camundongos fêmeas BALB/c, sobretudo a progressão do tumor dos animais portadores de tumor mamário ortotópico (4T1-Luciferase), foi monitorado a cada quatro dias em IVIS[®] Lumina XR Series III, figura 9. Foram produzidas imagens de bioluminescência (IBL) dos grupos de animais tratados com NanoGO-AM cinco vezes e dos grupos de animais tratados com NanoGO-AIClFt foram produzidas imagens quatro vezes durante todo o experimento. Em linhas do tempo ilustrativas, figuras 10 e 11, é possível um melhor entendimento de como o experimento foi conduzido em ambos os grupos mencionados.

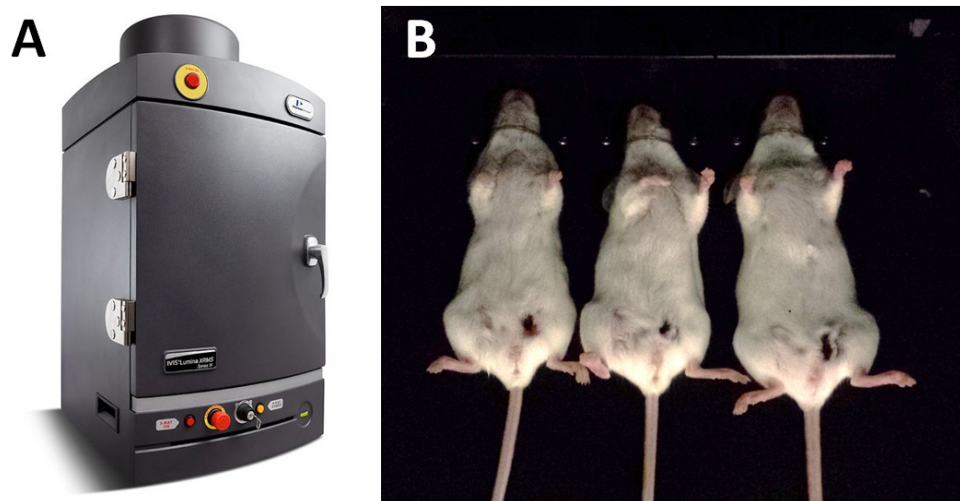


Figura 9: **Equipamento para análise de bioluminescência.**

A. Equipamento IVIS Lumina XR Series III. **B.** Camundongos fêmeas portadoras de carcinoma mamário murino bioluminescente, anestesiadas a partir da inalação de oxigênio com 1,5% de isoflurano. A ferida na quinta mama de todos os animais é resultado da terapia fototérmica mediada por NanoGO-AM.

Desenho Experimental para Quantificação da Bioluminescência Tumoral *NanoGO-Azul de Metileno*

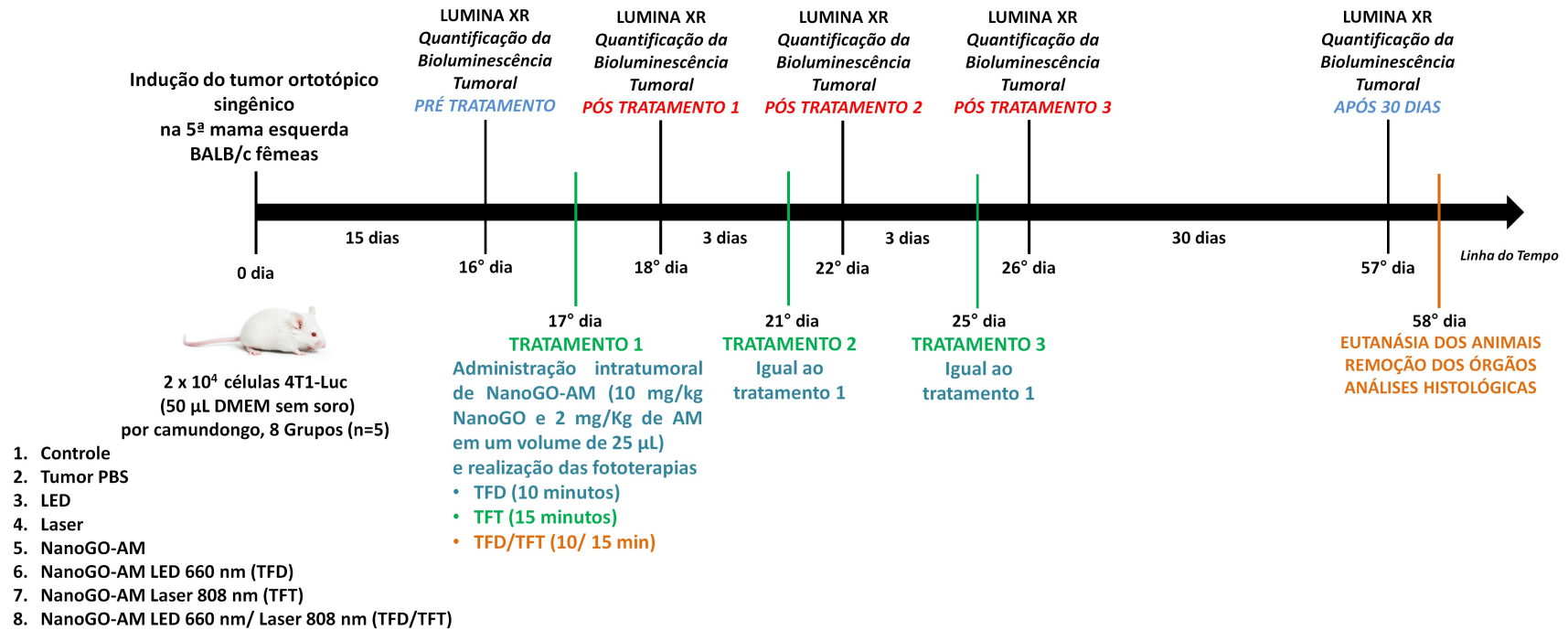


Figura 10: Esquema do desenho experimental para realização do experimento *in vivo* de fototerapias combinadas utilizando NanoGO carboxilado-AM em camundongos fêmeas portadoras do carcinoma mamário murino bioluminescente.

A distribuição de cada etapa foi dividida ao longo do período de aproximadamente 60 dias, terminando com a eutanásia dos animais. Durante todas as etapas do experimento os animais foram anestesiados intraperitonealmente com a mistura de xilasina, ketamina e água ultrapura estéril ou a partir da inalação de 1,5% de isofluorano. A irradiação para TFD foi a fluência de 90.8 J.cm^{-2} e irradiação para TFT foi a fluência de 8.3 kJ.cm^{-2} .

Desenho Experimental para Quantificação da Bioluminescência Tumoral *NanoGO-Cloreto de Alumínio Ftalocianina*

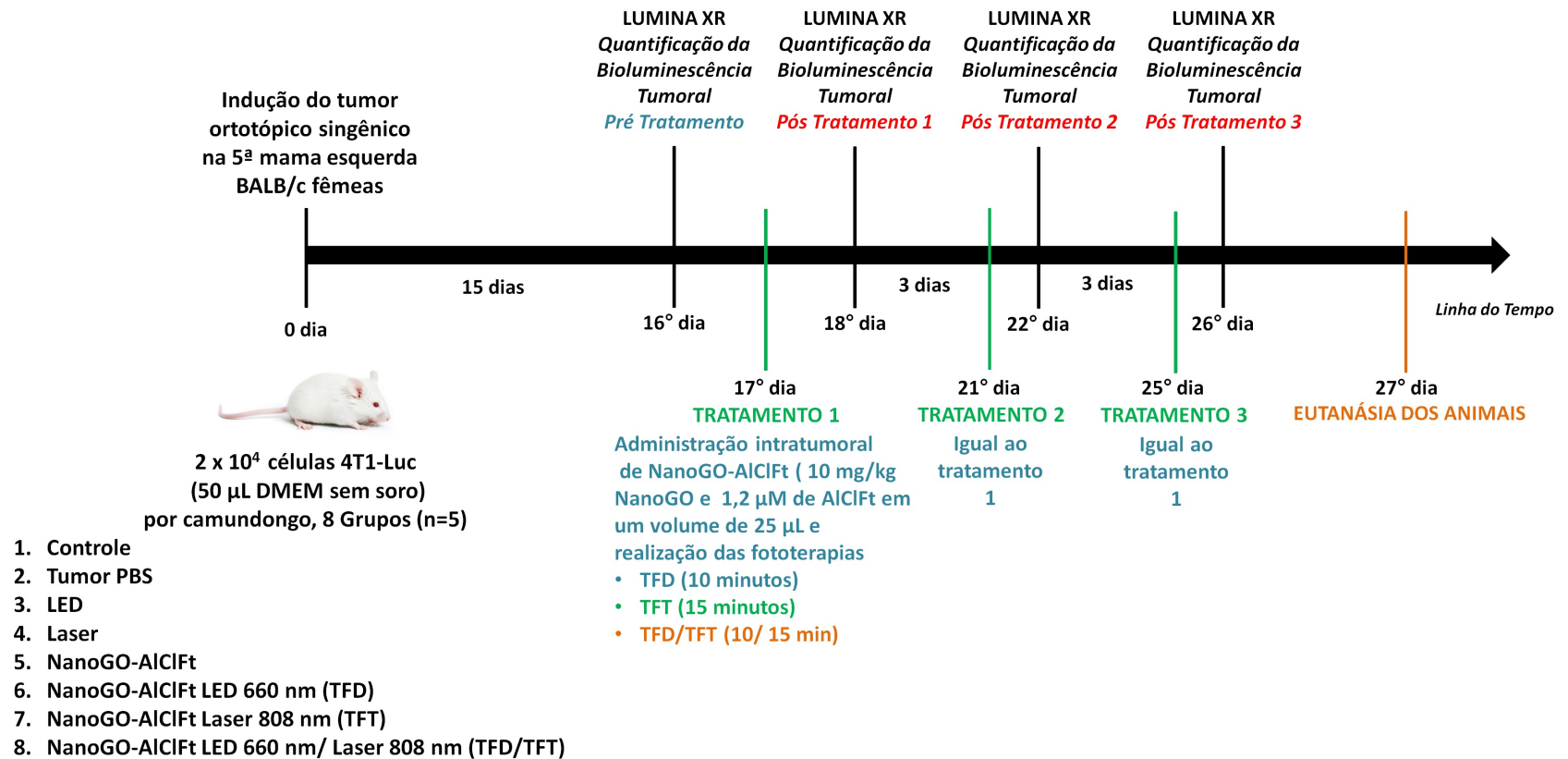


Figura 11: Esquema do desenho experimental para realização do experimento *in vivo* de fototerapias combinadas utilizando NanoGO-AICIFt em camundongos fêmeas portadoras do carcinoma mamário murino bioluminescente.

A distribuição de cada etapa foi dividida ao longo do período de aproximadamente 30 dias, terminando com a eutanásia dos animais. Durante todas as etapas do experimento os animais foram anestesiados intraperitonealmente com a mistura de xilasina, ketamina e água ultrapura estéril ou a partir da inalação de 2% de isoflurano. A irradiação para TFD foi a fluência de 90.8 J.cm⁻² e para a TFT a fluência foi de 8.3 kJ.cm⁻².

Os animais tiveram o volume tumoral aferido antes do início dos tratamentos e, depois, em intervalos de quatro em quatro dias, em equipamento para captação de bioluminescência IVIS Lumina XR (Caliper LifeSciences, USA) disponível no Laboratório de Nanobiotecnologia da Universidade de Brasília-UnB. Os animais foram anestesiados por inalação com isoflurano a 1,5% (Cristália) em oxigênio. Foram injetados intraperitonealmente em cada animal 100 μL de D-luciferina na concentração de 150 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ de animal (RediJect D-Luciferin (PerkinElmer Inc.)). Dez minutos após a administração da D-luciferina, os animais foram dispostos no equipamento em decúbito dorsal para uma melhor visualização da quinta mama do lado esquerdo. Para análise de bioluminescência, foram adquiridas 20 imagens de cada animal, com o tempo de exposição de 60 segundos cada e campo de visão de 12,5 cm. As imagens foram obtidas de modo a conter o maior pico de emissão da luciferina (λ emissão = 560 nm) com um sistema de contagem de fótons individuais correlacionado com o tempo. O cálculo da bioluminescência foi realizado levando em consideração a remoção do sinal de fundo. A bioluminescência final foi igual a um sinal de bioluminescência emitido na região de interesse (*region of interest*, ROI), menos o sinal de fundo de uma área diferente com o mesmo tamanho de ROI, (n = 5). NOTA: Durante o desenvolvimento do trabalho, a plataforma NanoGO-AM mostrou-se mais promissora, tendo prosseguido para estudos de análise histopatológica e imunohistoquímica.

2.16 Avaliação Macroscópica e Clínica de Órgãos e Tumor Obtido por Inoculação Ortotópica e Preparo para Histologia, apenas para o grupo NanoGO-AM

Foram realizadas inspeções para detecção de possíveis alterações morfológicas macroscópicas, tais como presença de nódulos, metástase, áreas de necrose, infiltrados e angiogênese nos animais utilizados neste trabalho. Em cada tumor, macroscopicamente visível ou palpável, foram averiguados sua progressão, aparência e tamanho. Para a avaliação clínica foram observados sinais clínicos como deambulação, agitação ou letargia, respiração, salivação, cianose, consumo de ração/água, de acordo com os parâmetros do

Guia para a Condução de Estudos Não Clínicos de Toxicologia e Segurança Farmacológica Necessários ao Desenvolvimento de Medicamentos [61].

Após a última análise de bioluminescência (30 dias a partir do último tratamento), os camundongos foram submetidos à eutanásia com uma solução contendo 70 μL de ketamina (100 mg.mL^{-1}) e 50 μL xilazina (20 mg.mL^{-1}). Verificada a ausência do reflexo podal, os animais foram posicionados em decúbito dorsal em bandeja de dessecação. Após assepsia do local com álcool 70%, os órgãos foram excisados. Secções dos fragmentos do tumor obtido pela inoculação ortotópica de células 4T1-Luciferase foram submetidas à análise. Instrumentos cirúrgicos estéreis foram utilizados para excisar o tecido mamário sem tumor, tecido tumoral, baço, fígado, pulmão e linfonodo sentinela (linfonodo subilíaco direito) [62]. Os planos de cortes utilizados são apresentados na tabela 5 .

Tabela 5: **Planos de Cortes de Inclusão de Órgãos em Parafina para Histologia**

Órgão/tecido	Corte	Inclusão
Tumor/mama	Longitudinal	Metade, Maior volume de contato
Mama	Sem plano de corte	Maior volume de contato
Baço	Transversal em partes	Maior volume de contato
Fígado	Lóbulo (metade maior)	Maior volume de contato
Rins	Um sem corte/corte transversal	Metade vertical e horizontal
Pulmão	Sem plano de corte	Maior volume de contato
Linfonodos subilíacos	Sem plano de corte	Maior volume de contato

Os órgãos e seus fragmentos foram lavados com soro fisiológico e, em seguida, fixados em formalina 4% tamponada. Todas as amostras foram fixadas por 72 horas com volume de fixador 20 vezes maior em relação ao tamanho da amostra. Os tecidos foram fixados com paraformaldeído 10%, desidratados em etanol, processados para coloração com hematoxilina e eosina (HE), incluídos em parafina e seccionados entre 2-5 μm de espessura em um micrótomo manual Leica RM2235 (Leica Microsystems, Nussloch, Alemanha), conforme os planos de inclusão da tabela 5. A coloração HE foi utilizada para o exame histológico de tumores primários, órgãos e eventual metástase. As secções foram analisadas e fotografadas utilizando um microscópio Olympus Vanox-T (objetiva de 40x) e câmera CCD.

2.17 Análise Imunohistoquímica de Proliferação Celular (PCNA), apenas para o grupo NanoGO-AM

Os tecidos utilizados para reações de imuno-histoquímica foram fixados em formalina a 4% e emblocados em parafina. Secções de 3 μm de tecido mamário e pulmonar de camundongo foram montadas em lâminas pré-tratadas com silane. A exposição antigênica foi obtida por tratamento por 20 min em panela a vapor com target retrieval system (DAKO, Carpenteria, CA). O bloqueio de peroxidase endógena foi realizado utilizando incubação em metanol 50%/H₂O₂ 3%. Para redução de sinais inespecíficos na reação, foi realizada incubação com leite em pó desnatado 6% em PBS (pH 7,4) por 30 min. A incubação com anticorpo monoclonal primário IgG2 anti-PCNA-proliferating cell nuclear antigen (Dako, EUA) foi realizada a 4 °C por 18 h, na diluição de 1:1300 em secções seriadas de tecido. A incubação com anticorpo secundário foi feita com EnVision-HRP (DAKO, Carpenteria, CA), seguindo as especificações do fabricante. A revelação com substrato cromogênico foi feita utilizando 3-amino-9-etil-carbazol (AEC) para anticorpos conjugados a peroxidase, controlando o tempo de exposição de acordo com o anticorpo utilizado. A contra-coloração foi feita com hematoxilina de Carazzi para anticorpos com peroxidase. Após as reações, as lâminas foram lavadas, desidratadas em bateria de etanol 50%, 80%, 95% e 100%. A exposição ao cromógeno foi monitorada em todos os experimentos, sendo interrompida simultaneamente no fragmento incubado com o anticorpo específico e em seu respectivo controle. Nas análises de PCNA, as avaliações de cada animal foram realizadas com microscopia óptica sob o aumento final de 400x. Tais análises consistiram na quantificação de células positivas por campo (0,087 mm²) e em seguida foi determinado o número médio de células/campo.

2.18 Análise Imunohistoquímica de Apoptose Celular, apenas para o grupo NanoGO-AM

A análise qualitativa e quantitativa de apoptose celular foi realizada por imunohistoquímica através da técnica TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated

digoxigenindeoxyuridine nick-end labeling, em português marcação de "nicks" por dUTP e deoxinucleotidil terminal transferase) com o kit ApopTag Plus Peroxidase in Situ Detection (Chemicon, Billerica, USA). Após desparafinização e reidratação com uma bateria de xilol-álcool, as secções foram pré-tratadas com proteinase K (20 mg.mL⁻¹, Dako) diluída em PBS 0,01 M durante 15 min à temperatura ambiente. Depois de algumas lavagens com água destilada, as lâminas foram colocadas em um bloqueio de peroxidase endógena (H₂O₂ 3%) por 10 min. Em seguida, as secções passaram por outro bloqueio, este com leite desnatado 6% em PBS (0,01 M, pH 7,4) por 30 min a 37 °C. As lâminas foram então expostas ao tampão de equilíbrio do kit por 10 s e, em seguida, incubadas com a enzima working strenght TdT do kit na câmara úmida por 1 h a 37 °C. Após esse período, as lâminas foram incubadas com o tampão de parada do kit por 10 min a temperatura ambiente. As lâminas foram então lavadas com PBS e incubadas com o conjugado anti-digoxigenina do kit por 30 min a temperatura ambiente. Finalmente, as lâminas receberam o cromógeno DAB por 30 s e, a seguir, foram contra-coradas com hematoxilina de Mayers. Uma secção renal foi incubada com 1,0 U.mL⁻¹ de DNase para controle negativo, ao passo que para o controle positivo utilizamos uma secção com tecido de baço. Para a quantificação de apoptose foram contados os núcleos positivos em dez campos diferentes, no aumento de 400 vezes.

2.19 Análise Estatística

Os dados foram analisados no programa Graphpad Prism 5.0 e submetidos a testes específicos com confiança estatística de 95% utilizando o Anova One e Two Ways, com pós-testes Tukey ou Bonferroni. Os dados foram apresentados como média ± desvio padrão. A análise imunohistoquímica foi baseada na comparação de grupos, utilizando para os cálculos o software livre R versão 3.0.2 (EUA). Inicialmente as diversas variáveis foram testadas para normalidade, como a distribuição não foi normal, foi aplicado o teste de Kruskal-Wallis para medianas, com pós-teste de Dunn. Os resultados foram apresentados como média ± erro padrão da média e foram considerados estatisticamente significativos quando o valor de $p < 0,05$.

3 *Resultados e Discussão*

3.1 NanoGO-AM e NanoGO-AlClFt: Obtenção e Caracterização

Ao NanoGO foi adsorvido o polímero Pluronic F127 e associado o FS cloreto de alumínio ftalocianina. Paralelamente, o NanoGO foi funcionalizado com a adição de grupos ácido carboxílicos e adsorção de Pluronic F127 à sua superfície, e por último, foi associado ao azul de metileno. A associação do Pluronic F127, em ambas as nanofolhas, deu-se por interação hidrofóbica [5], que significa que o poli óxido de propileno do copolímero associou-se à porção hidrofóbica do NanoGO. NanoGO apresentou-se como uma suspensão negra translúcida, figura 12A. No entanto, após a reação de carboxilação, NanoGO carboxilado apresentou a coloração um pouco mais escurecida do que o NanoGO, figura 12A. Quando da incorporação do cloreto de alumínio ftalocianina ou azul de metileno, as suspensões mantiveram-se translúcidas, mas com uma coloração negra-azulada translúcida tanto para NanoGO-AlClFt quanto para NanoGO carboxilado-AM, figura 12B.

O DH médio de NanoGO carboxilado, ao final da reação de carboxilação, foi de $254,4 \pm 5,0$ nm, IPD próximo de $0,250 \pm 0,06$ (indicando uma população de nanofolhas polidispersas) e potencial Zeta de $-43,0 \pm 1,11$ mV. O NanoGO carboxilado, após novo processo de ultrasonicação, o qual promove a redução do tamanho das nanofolhas, sofreu uma redução no DH médio para menos da metade do valor inicial. O DH médio medido foi de $102,4 \pm 1,1$ nm, sem maiores alterações no IPD e PZ. Quando da adsorção do polímero Pluronic F127 as nanofolhas, o DH médio aumentou discretamente para $122,2 \pm 3,9$ nm, seguido do aumento de IPD e diminuição do valor de PZ para $-36,5 \pm 0,9$

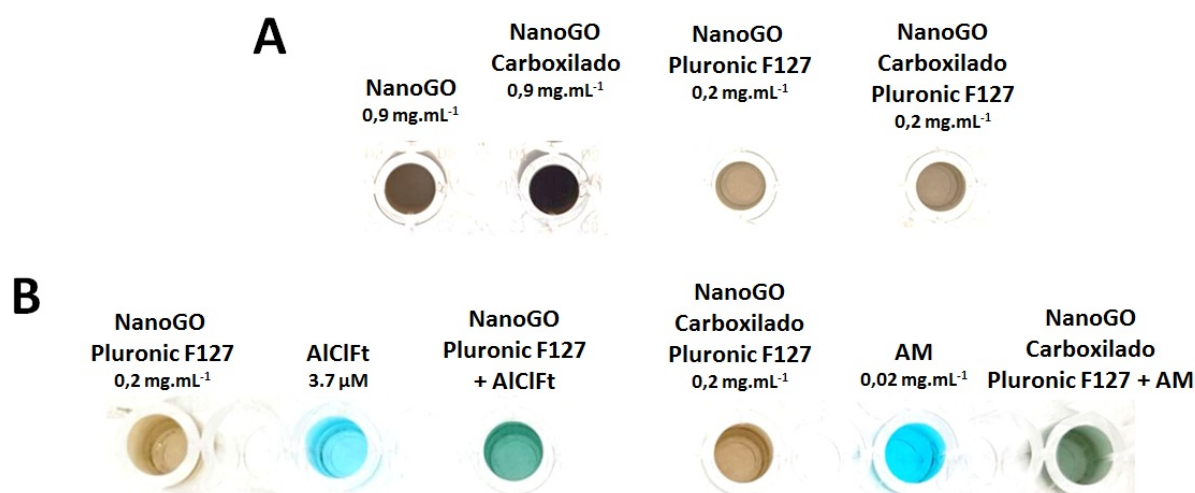


Figura 12: Aspecto final das soluções de NanoGO, NanoGO carboxilado, NanoGO-AICIFt e NanoGO-AM.

A Nanofolhas de óxido de grafeno e óxido de grafeno carboxilado em diferentes concentrações. **B**. Nanofolhas de óxido de grafeno e óxido de grafeno carboxilado associadas ao copolímero Pluronic F127 e aos fotossensibilizadores cloreto de alumínio ftalocianina e azul de metileno, respectivamente.

mV. Esse PZ menos negativo das nanofolhas deve-se, possivelmente, ao fato de o Pluronic F127 mascarar as cargas negativas na superfície e borda das nanofolhas, região na qual encontram-se os grupos ácido carboxílicos que podem estar na forma COO^- (ionizada), e portanto conferem carga mais negativa as nanofolhas. O Pluronic F127 além de melhorar a estabilidade das nanofolhas, é responsável por aumentar a solubilidade e dispersão das nanofolhas em sistemas biológicos, além de impedir a sua precipitação na presença de sais [5, 53]. Por último, em NanoGO-AM, ainda que com a adição do AM, obtiveram-se valores de DH médio ($112,5 \pm 8,4$ nm) e IPD ($0,32 \pm 0,03$) similares aos de NanoGO Pluronic F127. Apenas o PZ mais um pouco mais negativo de $-46,2 \pm 1,1$ mV mostra uma alteração causada pela adição do AM ao NanoGO carboxilado.

Os valores de DH médio e IPD para NanoGO, NanoGO com Pluronic F127 e NanoGO-Pluronic F127-AICIFt, mostram uma redução no DH médio de $209,8 \pm 1,2$ nm para $180,1 \pm 3,3$ nm após a adição do Pluronic F127, seguido de um aumento no DH médio para $220,27 \pm 2,63$ nm após a adição de AICIFt. A solução de AICIFt por si só, quando diluída em água, produz aglomerados com DH médio de $97,0 \pm 3,4$ nm. No entanto, possivelmente devido as interações hidrofóbicas e empilhamentos π - π entre NanoGO e AICIFt [52], a interação entre eles resultou em nanofolhas de DH médio similar ao da

nanofolha sem AlClFt e com IPD de $0,25 \pm 0,01$, revelando uma população de nanofolhas polidispersas.

Os DH médios das nanofolhas, IPD e PZ, encontram-se nas tabelas 6 e 7 para NanoGO-AM e NanoGO-AlClFt, respectivamente.

Tabela 6: **Propriedades de NanoGO Carboxilado e NanoGO-AM**

Amostras	DH médio (nm)	IPD	PZ (mV)
NanoGO carboxilado (primeira sonicação)	$254,4 \pm 5,0$	$0,250 \pm 0,060$	$-43,0 \pm 1,1$
NanoGO carboxilado (segunda sonicação)	$102,4 \pm 1,1$	$0,240 \pm 0,010$	$-41,7 \pm 2,7$
NanoGO carboxilado-Pluronic F127	$122,2 \pm 3,9$	$0,370 \pm 0,080$	$-36,5 \pm 0,9$
NanoGO carboxilado-Pluronic F127-AM* (filtrado membrana $0,22 \mu\text{m}$)	$112,5 \pm 8,4$	$0,320 \pm 0,030$	$-46,2 \pm 1,1$

NanoGO carboxilado= nanofolhas de óxido de grafeno carboxilado, AM= azul de metileno, DH= diâmetro hidrodinâmico, IPD= índice de polidispersão e PZ= potencial Zeta. *filtrado em membrana de poro de $0,22 \mu\text{m}$.

Tabela 7: **Propriedades de NanoGO e NanoGO-AlClFt**

Amostras	DH médio (nm)	IPD	PZ (mV)
NanoGO	$209,8 \pm 1,2$	$0,290 \pm 0,010$	$-27,0 \pm 0,7$
NanoGO-Pluronic F127	$180,1 \pm 3,3$	$0,350 \pm 0,010$	$-28,7 \pm 0,5$
NanoGO-Pluronic F127-AlClFt	$220,3 \pm 2,6$	$0,250 \pm 0,010$	$-23,7 \pm 0,5$
*AlClFt	$97,0 \pm 3,4$	$0,330 \pm 0,060$	$8,5 \pm 1,7$

NanoGO= nanofolhas de óxido de grafeno, AlClFt= cloreto de alumínio ftalocianina, DH= diâmetro hidrodinâmico, IPD= índice de polidispersão and PZ= potencial Zeta. *AlClFt forma aglomerados em solução aquosa.

A grande diferença entre os valores de PZ entre as nanofolhas de NanoGO e NanoGO carboxilado pode ser atribuída à presença dos grupos ácido carboxílico (COO^-) nas nanofolhas carboxiladas, que conferem à nanoplataforma carboxilada um PZ mais negativo. A distribuição de DH por intensidade de NanoGO-AM e NanoGO-AlClFt estão representadas nas figura 13 e 14.

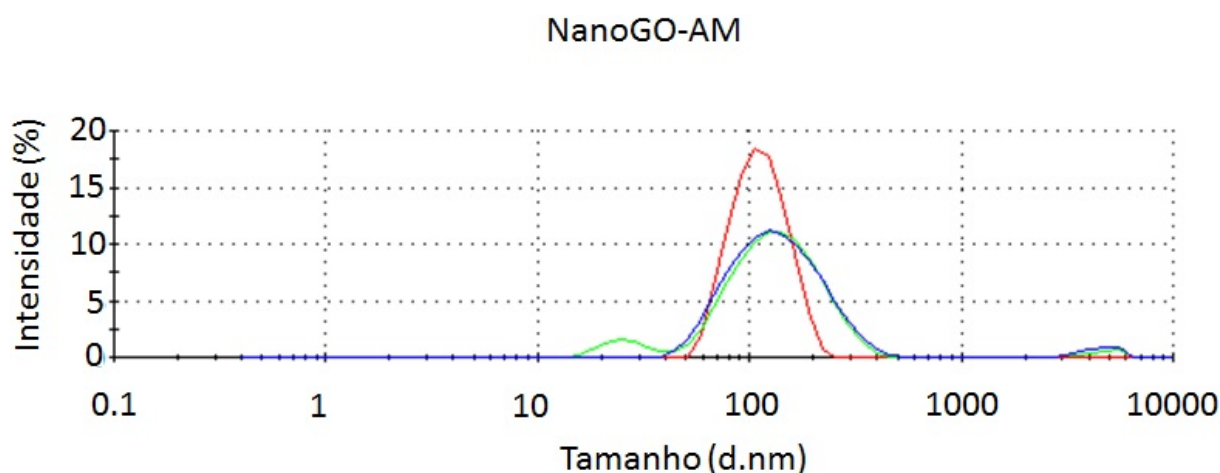


Figura 13: Distribuição de diâmetro hidrodinâmico por intensidade da suspensão de nanofolhas de óxido de grafeno carboxilado associadas ao azul de metileno. Nanofolhas polidispersas e com DH médio de $112,5 \pm 8,4$ nm e IPD de $0,320 \pm 0,030$.

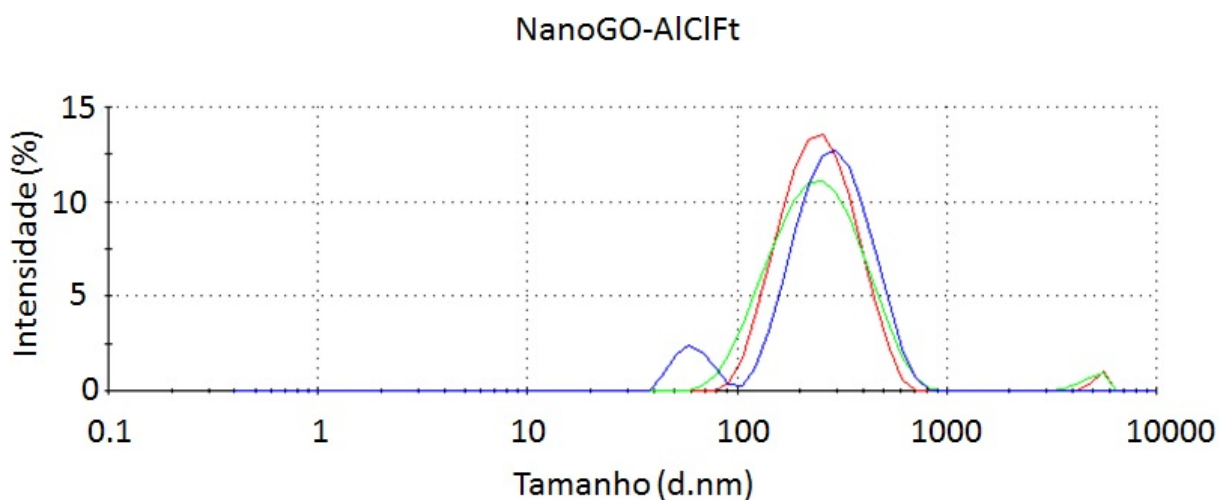


Figura 14: Distribuição de diâmetro hidrodinâmico por intensidade da suspensão de nanofolhas de óxido de grafeno associadas ao cloreto de alumínio ftalocianina. Nanofolhas polidispersas e com DH médio de $220,3 \pm 2,6$ nm e IPD de $0,250 \pm 0,010$.

3.2 FTIR e Espectroscopia do UV-Visível

As análises de FTIR revelaram que o processo de carboxilação do NanoGO foi bem-sucedido. O espectro do NanoGO (em preto) confirma a presença de diferentes grupos oxigenados hidroxila (-O-H) em alongamento a 3184 cm^{-1} , carbonila (C=O) em estiramento a 1728 cm^{-1} , aromático (C=C) em 1640 cm^{-1} , C-OH a 1423 cm^{-1} ; e C-O em alongamento a 1043 cm^{-1} . Enquanto no espectro da amostra de NanoGO, a banda

atribuída ao alongamento C=O foi pouco intensa, no espectro de NanoGO carboxilado (em vermelho) essa banda foi evidente, além de ter havido uma redução na banda C=C, indicando a redução das ligações duplas (π) para estabelecimento de novas ligações C=O, figura 15. Isso, mais uma vez, corrobora a eficácia do processo de carboxilação. Adicionalmente, os grupos carboxílicos adicionados ao NanoGO carboxilado estavam na forma ácida protonada (COOH), uma vez que a banda de estiramento de C=O atingiu picos acima de 1700 cm^{-1} [63, 64]. O grupo funcional a 2800 cm^{-1} corresponde ao modo de estiramento simétrico do grupo $-\text{CH}_2-$ no ácido cloroacético, que foi utilizado durante a reação de carboxilação para a adição de grupos ácido carboxílico ao NanoGO [65].

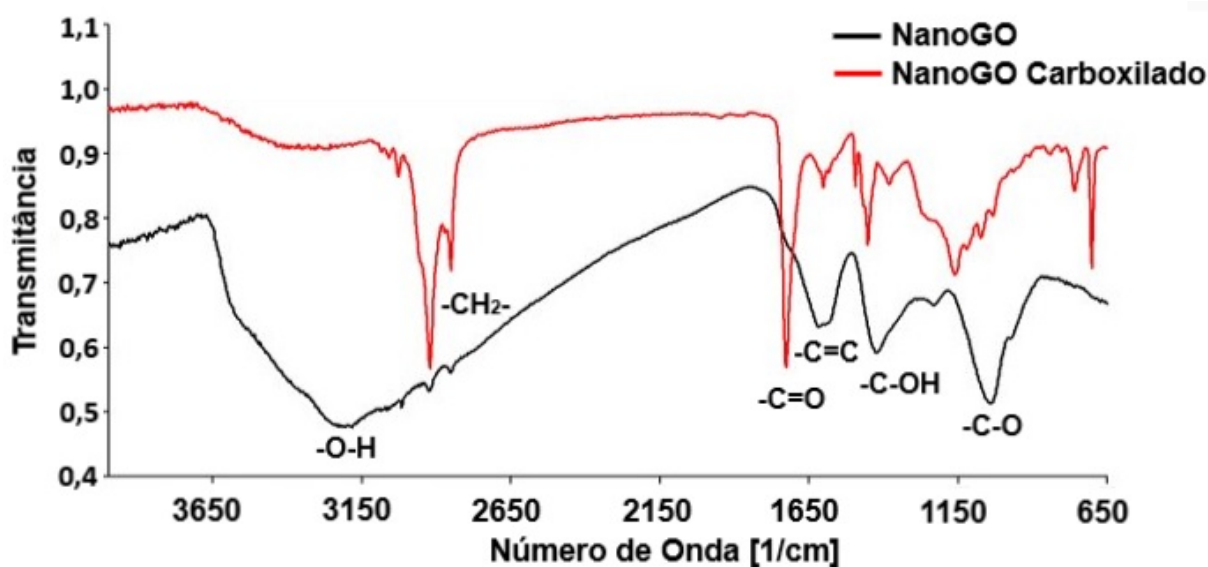


Figura 15: FTIR do NanoGO (preto) e NanoGO carboxilado (vermelho). Presença dos grupos ácido carboxílico no NanoGO carboxilado em aproximadamente 1700 cm^{-1} evidenciando a carboxilação.

Amostras de óxido de grafeno (GO), nanofolha de óxido de grafeno carboxilado (NanoGO), azul de metileno livre (AM) e NanoGO-AM apresentaram diferentes absorvâncias pela técnica de UV-Vis. Foi possível observar um deslocamento ascendente da absorção de NanoGO carboxilado em relação ao GO, possivelmente devido à redução do tamanho das folhas de GO para NanoGO carboxilado. Esse deslocamento quer dizer que o NanoGO tem uma maior capacidade de absorção na região da luz visível e na vizinhança da região de luz de infravermelho próximo. Isso pode aumentar a eficiência fototérmica

do NanoGO carboxilado, promovendo um aumento mais expressivo da temperatura do sítio alvo quando sob irradiação para TFT [59, 66]. O espectro de AM (linha azul marinho) exibiu pico característico da transição $n \rightarrow \pi^*$ a 660 nm, que também foi reproduzido no espectro da amostra NanoGO-AM (linha azul claro) e confirmou o associação bem-sucedida do AM. Houve também um deslocamento para a região do vermelho da transição $n \rightarrow \pi^*$ para 680 nm após a associação de NanoGO ao AM. Isso é provavelmente causado pela transferência de carga entre AM e NanoGO, figura 16. Em parte, a interação do azul de metileno e NanoGO carboxilado também pode se dar por interação hidrofóbica e empilhamento π - π , que é a interação do AM com as regiões aromáticas do NanoGO carboxilado [67]. Essa interação resultou na diminuição do espectro de absorção (figura 16), seguida de uma drástica diminuição do espectro de fluorescência de NanoGO-AM.

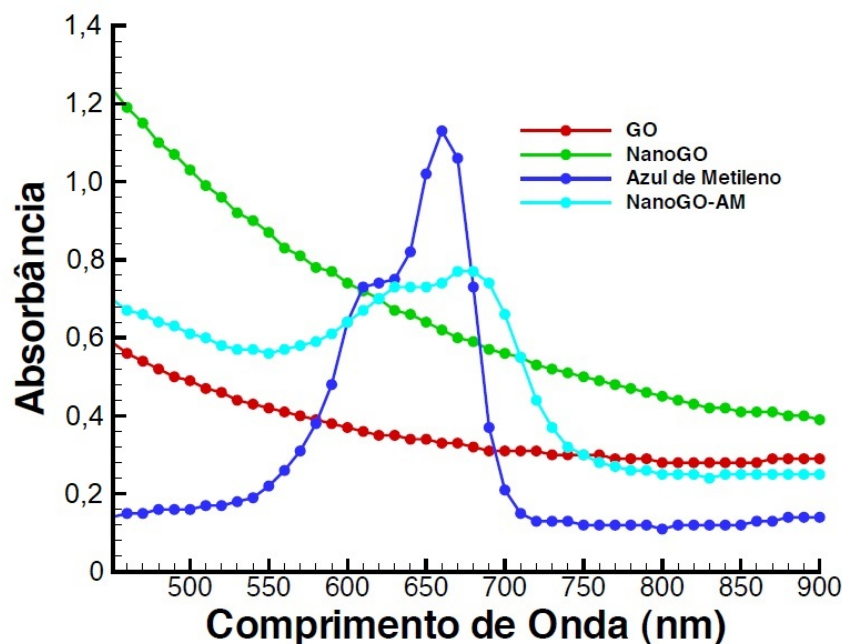


Figura 16: Espectroscopia de UV-Visível de óxido de grafeno (GO), nanofolha de óxido de grafeno carboxilado (NanoGO), azul de metileno livre (AM) e NanoGO-AM. Presença do pico de absorção próximo de 660 nm, característico do AM, na amostra de NanoGO-AM.

AM livre fluoresce em aproximadamente 692 nm, como pode ser observado na figura 17. Esse mesmo pico não pode ser observado em NanoGO carboxilado-AM, possivelmente devido as interações hidrofóbicas e o empilhamento π - π exercido pelo NanoGO em AM. O resultado dessa supressão de fluorescência do AM pelo NanoGO carboxilado pode resultar em uma menor produção de espécies reativas de oxigênio do que comparado

com o AM livre.

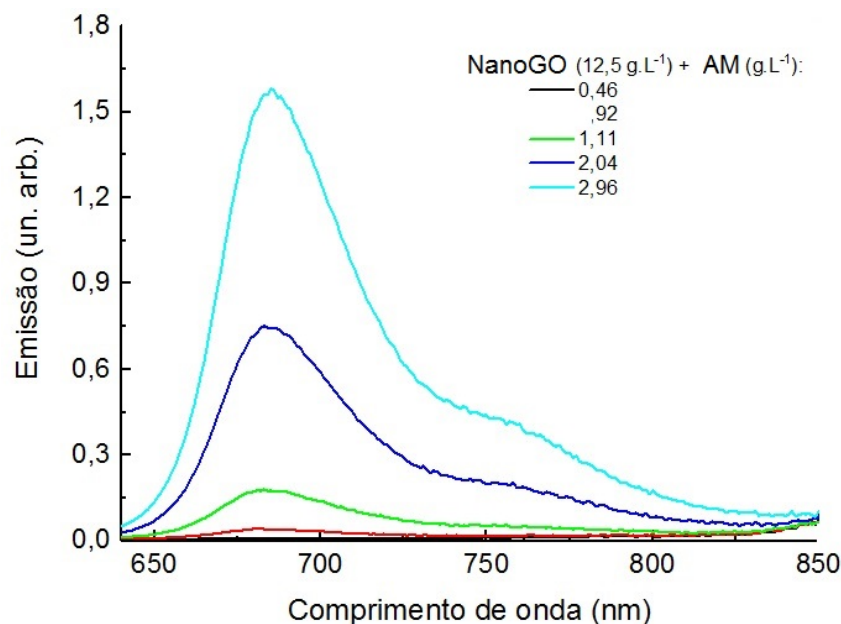


Figura 17: Espectro de fluorescência do AM em diversas concentrações com adição de nanofolhas de óxido de grafeno (concentração fixa de $12,5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). Presença do pico de emissão próximo de 690 nm, característico do AM, na amostras de NanoGO-AM.

Foi observado o λ máximo de absorção para AlClFt de 670 nm, figura 18. Com a adição da suspensão de NanoGO às suspensões de AlClFt, ocorreu a redução da intensidade das bandas de absorção entre 600 e 680 nm e o aparecimento de uma banda de absorção em 707 nm quando da adição de uma maior concentração de NanoGO, figura 18. Esse fenômeno de redução da absorção interfere diretamente na capacidade de produção de ERO por NanoGO-AlClFt. O espectro de fluorescência de NanoGO-AlClFt exibiu λ máximo de emissão em 675 nm, figura 19. Como ocorrido com o AM, AlClFt e NanoGO também interagem hidrofobicamente ou por empilhamento π - π , podendo essa alteração fotofísica na emissão de AlClFt ser causada pelo efeito de supressão de fluorescência de NanoGO.

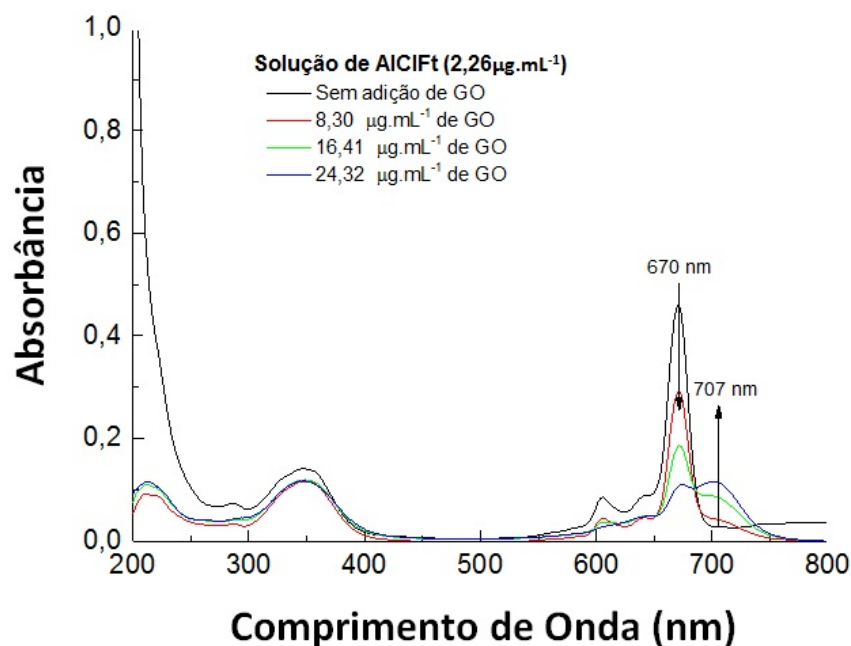


Figura 18: Espectro de absorção de AIClFt ($2,26 \mu\text{g.mL}^{-1}$) com adição de nanofolhas de óxido de grafeno em diversas concentrações.

Presença do pico de absorção próximo de 670 nm, característico do AIClFt, na amostra de NanoGO-AIClFt.

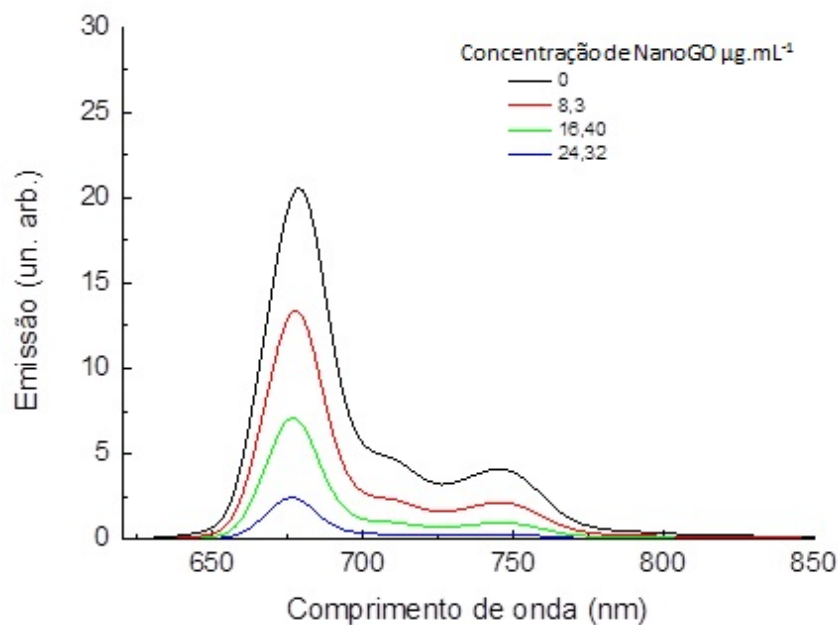


Figura 19: Espectro de fluorescência do AIClFt ($2,26 \mu\text{g.mL}^{-1}$) com adição de nanofolhas de óxido de grafeno em diversas concentrações.

Presença do pico de emissão em 675 nm, característico do AM, na amostra de NanoGO-AM.

3.3 Ultraestrutura de NanoGO

Em ambas as microscopias eletrônicas, NanoGO carboxilado exibiu o formato característico de folhas mostrado na literatura [67, 68]. Na microscopia eletrônica de transmissão foi possível visualizar apenas as nanofolhas dispostas umas em cima das outras, não ficando claro as bordas ou delimitações de cada uma, figura 20A. Podemos atribuir este fato à baixa eletrodensidade da amostra, oriunda dos elementos de baixo número atômico em sua composição como: carbono, oxigênio e hidrogênio. Na microscopia eletrônica de varredura ficou evidente o aspecto unilamelar e fino das folhas, bem como as suas delimitações e transparência, figura 20B.

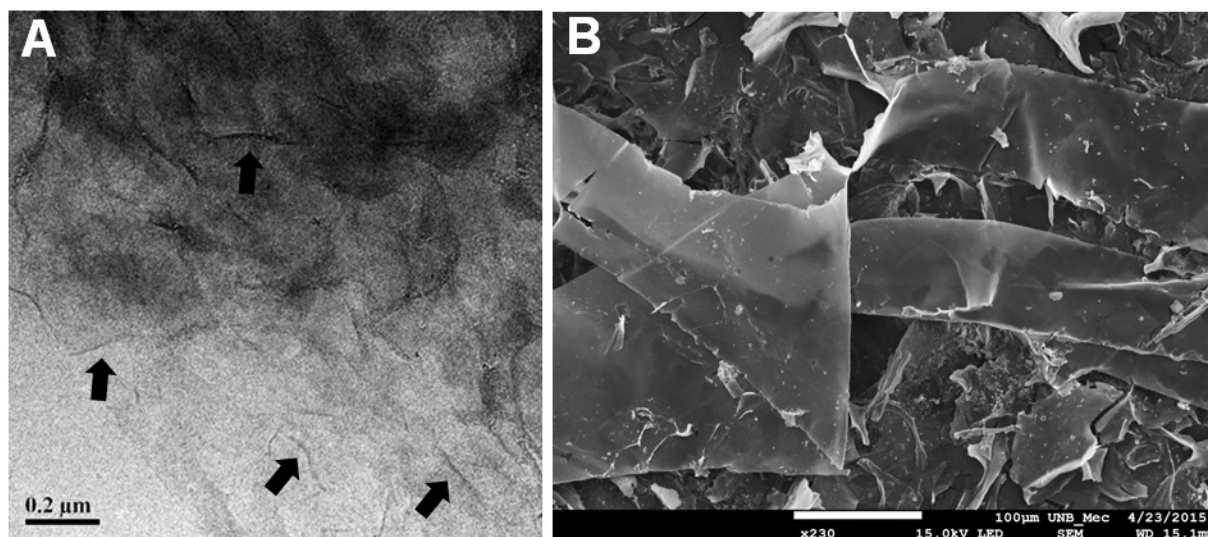


Figura 20: **Caracterização ultraestrutural das NanoGO por MET e MEV**
A. NanoGO por MET. Setas indicam as delimitações das nanofolhas, aumento de 100.000x. **B.** NanoGO por MEV, a transparência das nanofolhas estão de acordo com a sua espessura de apenas um átomo de carbono, aumento de 230 vezes.

3.4 Avaliação da Fototermia Mediada por NanoGO

As propriedades fototérmicas do óxido de grafeno já foram verificadas por outros autores [57, 69]. A amostra de água deionizada, quando irradiada com luz de laser de IVP 808 nm a fluência de $1,7 \text{ kJ.cm}^{-2}$, apresentou variação na temperatura de apenas $2,2 \text{ }^\circ\text{C}$ ($26,2 \text{ }^\circ\text{C}$ para $28,4 \text{ }^\circ\text{C}$). Enquanto em NanoGO carboxilado, na concentração de $200 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$, 10 minutos de irradiação com luz de laser IVP 808 nm aumentaram a temperatura da suspensão de NanoGO em cerca $35,6 \text{ }^\circ\text{C}$ ($26,6 \text{ }^\circ\text{C}$ para $62,2 \text{ }^\circ\text{C}$), figura 21A. O aumento da temperatura da suspensão de NanoGO carboxilado sob irradiação de luz de laser IVP 808 nm foi claramente observado pela imagem de câmera térmica por infravermelho, figura 21B. Esse aumento de temperatura alcançado está de acordo com a temperatura de hipertermia necessária para a ablação térmica de tumores, a qual deve ser acima de $47 \text{ }^\circ\text{C}$ [8, 16].

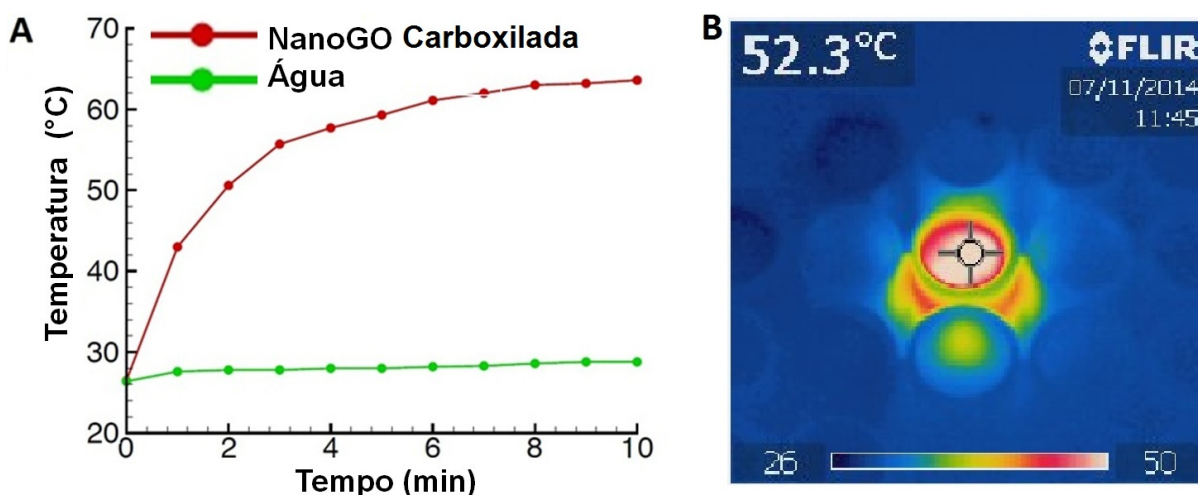


Figura 21: Avaliação da fototermia de NanoGO carboxilado durante irradiação com luz de laser IVP 808 nm.

A. Variação de temperatura de água deionizada e NanoGO quando irradiados com luz de laser IVP 808 nm a fluência de $1,7 \text{ kJ.cm}^{-2}$. **B.** Medição em tempo real da variação da temperatura por câmera térmica FLIR i40 - i60 (FLIR Systems).

3.5 Produção de Espécies Reativas de Oxigênio (ERO) por NanoGO-AM e NanoGO-AIClFt

A produção de oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$) é um passo crítico na TFD [70]. A sua produção foi indiretamente monitorada pela sonda 1,3-difenilisobenzofurano (DBF), cuja absorvância diminui enquanto são produzidas ERO [71]. Na literatura é reportada a produção de ERO intracelular por materiais derivados da família do grafeno sob irradiação em diversos comprimentos de onda [72, 73]. Neste estudo, quando sob irradiação com luz de LED 660 nm, a produção de ERO por NanoGO carboxilado superou a produção de ERO do FS azul de metileno, quando utilizado em determinadas concentrações, figura 22A e 22D. Baseado em estudo disponível com quantum dots de grafeno (QDG) irradiados com luz de laser azul de 450 nm, esse comportamento pode ser explicado pela maior presença de grupos oxigenados no NanoGO carboxilado. Em reação feita com os GQD para remover especificamente os grupos carbonila cetônica ($-\text{C}=\text{O}$), hidroxila ($-\text{OH}$) e carboxila ($\text{O}=\text{C}-\text{O}-$), foi observada a redução na produção de ERO, principalmente após a remoção dos grupos carbonila cetônica ($-\text{C}=\text{O}$) [72]. Como pôde ser observado na figura 15, o grupo carbonila está em maior concentração no NanoGO carboxilado do que no NanoGO, o que explica a maior produção de ERO por NanoGO carboxilado.

A produção de ERO por AM vem sendo explorada por diversos autores [5, 13, 30, 74, 75]. A solução de AM livre ($10 \mu\text{g.mL}^{-1}$, figura 22B) produziu uma quantidade significativa de ERO, que foi reduzida quando da associação do AM ao NanoGO carboxilado ($200 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$), figura 22C e figura 22D. Isso deve-se ao fato do óxido de grafeno funcionar como um supressor de fluorescência- *quencher*- o que acabou por interferir diretamente na capacidade do NanoGO-AM de gerar ERO [6, 76]. Essas espécies reativas são produzidas pelo corante fotoexcitado que transfere energia para o oxigênio molecular enquanto decai para o estado fundamental [77]. No entanto, grafeno e GO são conhecidos por suprimir estados excitados. Uma vez que o AM é excitado, parte de sua energia é transferida para NanoGO, diminuindo a parcela que é transferida para oxigênio e, conseqüentemente, a produção de ERO é limitada [78, 79]. Portanto, a menor produção de ERO por NanoGO-AM era esperada. O comportamento de NanoGO-AM em um ambiente biológico, tanto em células como em ensaios *in vivo*, pode permitir uma

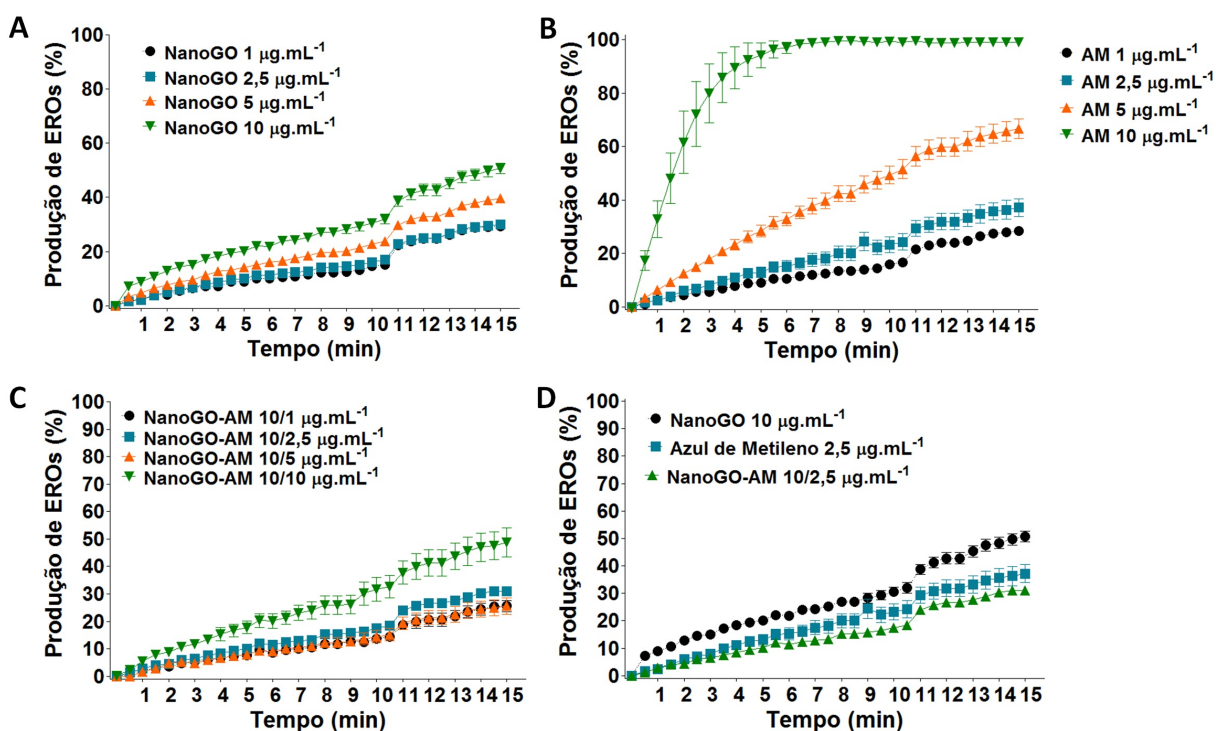


Figura 22: Produção de espécies reativas de oxigênio por NanoGO carboxilado, AM e NanoGO carboxilado-AM.

A. Produção de ERO por NanoGO, **B.** Produção de ERO por AM, **C.** Produção de ERO por NanoGO-AM (variação das concentrações de AM) e **D.** Produção de ERO por NanoGO-AM (nas concentrações próximas as que foram utilizadas no estudo *in vitro*). O NanoGO funciona como um supressor de fluorescência, o que reduziu a produção de oxigênio singlete por NanoGO-AM, quando comparado com a produção de ERO do AM livre. Durante todo o experimento foi utilizada a fluência do LED 660 nm de 30,00 J/cm².

produção de ERO muito mais elevada. Isso ocorre pela perda de interação eletrostática que o AM e NanoGO possuem em meio de pH fisiológico. Em pH 7, os grupos ácido carboxílico estão em sua forma ionizada (COO⁻), mas em ambiente ácido esses grupos são protonados (COOH) e a interação eletrostática com o AM se desfaz [5]. Todos estes achados confirmam que NanoGO-AM é uma plataforma adequada para ser utilizada para produção de ERO e indução de estresse oxidativo em células tumorais na TFD/TFT combinadas [80].

A menor produção de ERO por NanoGO com e sem Pluronic F12 (figura 23A) também pode ser explicada pelo mesmo motivo da maior produção de ERO por NanoGO carboxilado. Comparando a produção de ERO de NanoGO (25 µg.mL⁻¹) com NanoGO carboxilado (10 µg.mL⁻¹), a produção de ERO deste foi 2,5 vezes maior do que

a produção de NanoGO. De fato, a menor quantidade de grupos oxigenados no NanoGO, como pôde ser visualizado no espectro de FTIR (figura 15), interferiu de produção de ERO por NanoGO. Ainda que uma menor produção de ERO confira uma maior fotoestabilidade à NanoGO, também induz a uma menor fototoxicidade de NanoGO-AlClFt sob irradiação, como será observado *in vitro* neste trabalho [72]. AlClFt (figura 23B) exibiu uma intensa produção de ERO concentração-dependente, alcançando valores próximos de 60% a concentração de 1,248 μM , o que não era esperado. Por ser hidrofóbico, AlClFt forma aglomerados em solução aquosa, tem as suas propriedades fotofísicas alteradas, e portanto, a produção de ERO diminuída. No entanto, como a incorporação de AlClFt no NanoGO foi feita a partir de uma solução etanólica de AlClFt de 21 μM , quanto maior a concentração de AlClFt, maior a quantidade de etanol na suspensão. Isso significou uma menor formação de aglomerados e manutenção das propriedades fotofísicas [17].

Na figura 23C, NanoGO-AlClFt na ausência de Pluronic F127, apresentou produção de ERO de até 90%, mas com grandes desvios padrões. Além do que, houve a perda da produção de ERO concentração-dependente, uma vez que a maior concentração de AlClFt (1,248 μM) adicionada ao NanoGO, não promoveu a maior produção de ERO. Isso sugere um processo de auto supressão ou *self-quenching*. Essa supressão do estado excitado de AlClFt, em uma concentração superior as concentrações das demais formulações, deve-se a uma maior concentração de AlClFt em meio aquoso, resultando em uma produção de quantidade de ERO inferior [81]. Desta vez, as concentrações intermediárias de AlClFt (0,156, 0,312 e 0,624 μM) em NanoGO foram as que apresentaram a maior produção de ERO. Com a adição de Pluronic ao NanoGO, a produção de ERO apresentou valores mais próximos da média, com destaque para a maior produção de ERO pela concentração de AlClFt de 0,312 μM , que coincidentemente foi a concentração dos estudos *in vitro*. Interessantemente, a adição de AlClFt (0,312 μM) ao NanoGO (12,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), possivelmente devido à sua menor hidroflicidade, promove um efeito aditivo na produção de ERO por NanoGO-AlClFt (com e sem Pluronic F127). A produção de ERO para NanoGO (12,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, figura 23A) foi de 20% e para AlClFt (0,312 μM , figura 23B) foi de aproximadamente 30%. Somando-se os dois valores anteriores, temos o valor final da produção de ERO de 50% para NanoGO-AlClFt (12,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ / 0,312 μM , figura 23D). O AlClFt e suas variações, como a tetrasulfo ftalocianina de zinco, são conhecidos como FS eficientes na produção de ERO [6, 10, 82]. Neste trabalho, em coerência com

os demais grupos e estudos, NanoGO-AICIFt demonstrou o seu potencial como agente para utilização em fototerapias combinadas. A figura 23E apresenta a sumarização das concentrações de NanoGO, AICIFt e NanoGO-AICIFt analisadas nos ensaios *in vitro*.

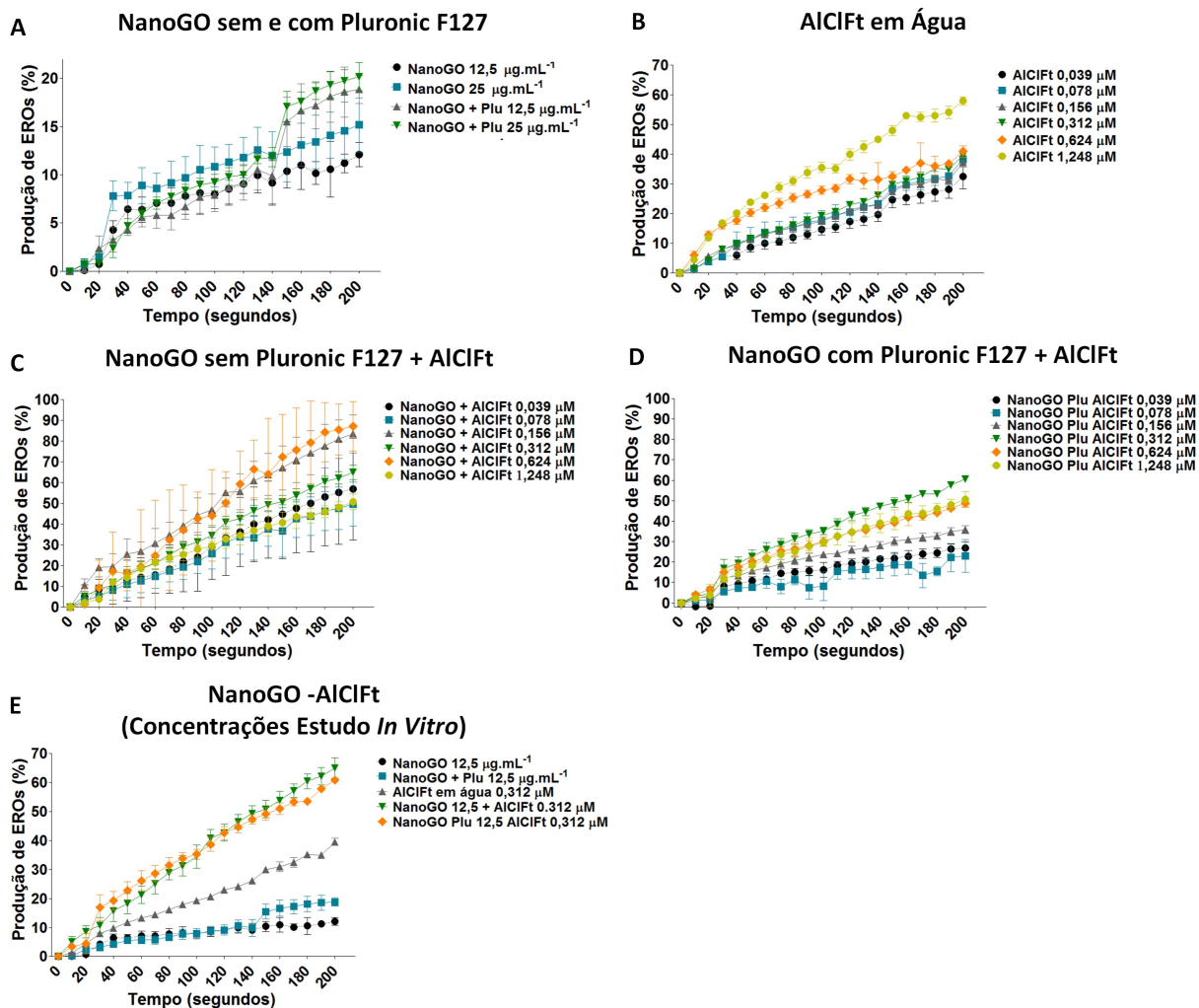


Figura 23: Produção de espécies reativas de oxigênio por NanoGO, AICIFt e NanoGO-AICIFt.

A. Produção de ERO por NanoGO com e sem o Pluronic F127, **B.** Produção de ERO por AICIFt, **C.** Produção de ERO por NanoGO ($12,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$) sem Pluronic F127- AICIFt (variação das concentrações de AICIFt), **D.** Produção de ERO por NanoGO ($12,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$) com Pluronic F127- AICIFt (variação das concentrações de AICIFt) e **E.** Produção de ERO por NanoGO-AICIFt (nas concentrações utilizadas no estudo *in vitro*). Durante todo o experimento foi utilizada a fluência do LED 660 nm de $3,94 \text{ J.cm}^{-2}$ para irradiação.

3.6 Ensaio de Viabilidade Celular

O pré-requisito básico para uso de um FS ou um agente fototérmico é que eles não sejam citotóxicos quando não irradiados [31, 83]. As citotoxicidades no escuro de NanoGO, NanoGO carboxilado, azul de metileno e cloreto de alumínio ftalocianina foram determinadas pelo ensaio de MTT. As células tumorais e normais foram tratadas durante 24 horas com NanoGO e NanoGO carboxilado nas concentrações de 3,1, 6,25, 12,5, 25, 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, AM nas concentrações 1, 2,5, 5, 10 e 20 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e AlClFt nas concentrações de 0,039, 0,078, 0,156, 0,312, 0,624 e 1,248 μM .

Os ensaios de viabilidade celular revelaram que tanto o NanoGO quanto o NanoGO carboxilado, na ausência de irradiação, apresentaram leve citotoxicidade no escuro na concentração de 12,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, figuras 24A, 25A e 26A. As viabilidades de células de linhagens não tumorais humana (MCF-10A) e murina (NIH/3T3, $p < 0,01$ para NanoGO carboxilado) estiveram próximas ou superiores a 90% quando comparadas com os controles. Já para as células tumorais, NanoGO ou NanoGO carboxilado, também na concentração de 12,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, provocaram uma redução de pouco mais de 30% na viabilidade das linhagens tumorais humana (MCF-7, $p < 0,001$) e murinas (4T1 e 4T1-Luciferase, $p < 0,01$), figuras 24A, 25A e 26A.

O azul de metileno (2,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) reduziu a viabilidade das células normais e tumorais em menos de 10%, apresentando leve toxicidade no escuro. Para NIH/3T3 e MCF-10A $p < 0,01$, figura 24B e 26B. O cloreto de alumínio ftalocianina (0,312 μM) manteve a viabilidade das células murinas 4T1-Luciferase e NIH/3T3 ($p < 0,01$) entre 90% e 100%, respectivamente, figura 25B. Nas células humanas, a viabilidade de MCF-10A foi de 90% ($p < 0,05$) e para MCF-7 foi superior a 100% ($p < 0,001$), um indício de aumento da proliferação celular devido ao tratamento, figura 26C. A maior citotoxicidade dos tratamentos para as células tumorais pode ser atribuída ao metabolismo mais rápido dessas células. O que aumenta a captação de NanoGO, NanoGO carboxilado, AM e AlClFt. Em estudo de Sahu *et al.*(2013) também foi observado uma maior captação de uma plataforma similar de NanoGO por células HeLa do que por células NIH/3T3 usando microscopia confocal [5]. Esses valores de viabilidade após o tratamento por 24 horas com NanoGO, NanoGO carboxilado, AM e AlClFt, fizeram com que essas concentrações

mencionadas fossem as escolhidas para a continuidade do estudo *in vitro*.

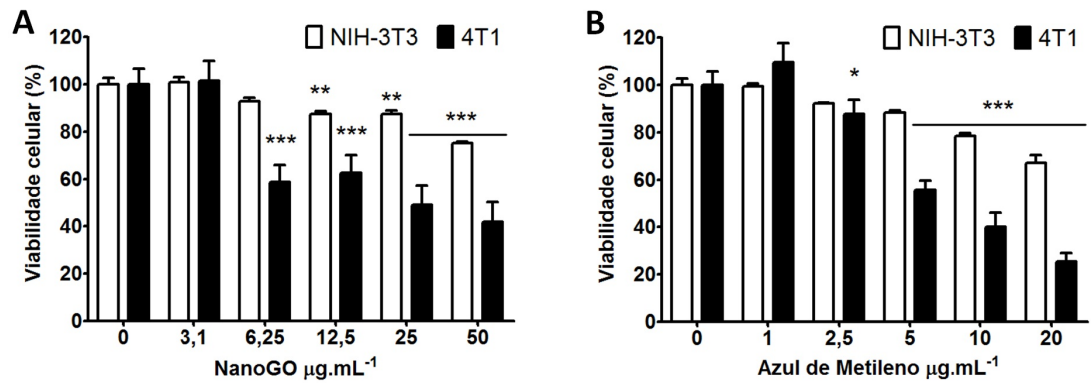


Figura 24: Citotoxicidade no escuro do NanoGO carboxilado (A) e AM livre (B) em células murinas NIH-3T3 (controle normal) e 4T1 (tumoral) após tratamento por 24 horas. Dados representam média e desvio padrão, n=4. Diferença significativa * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

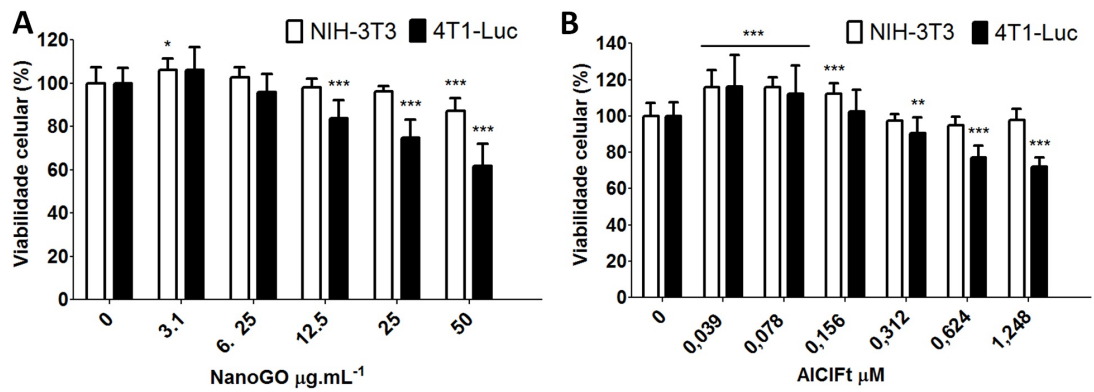


Figura 25: Citotoxicidade no escuro do NanoGO (A) e AICIFt livre (B) em células murinas NIH-3T3 (controle normal) e 4T1-Luciferase (tumoral) após tratamento por 24 horas. Dados representam média e desvio padrão, n=4. Diferença significativa * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

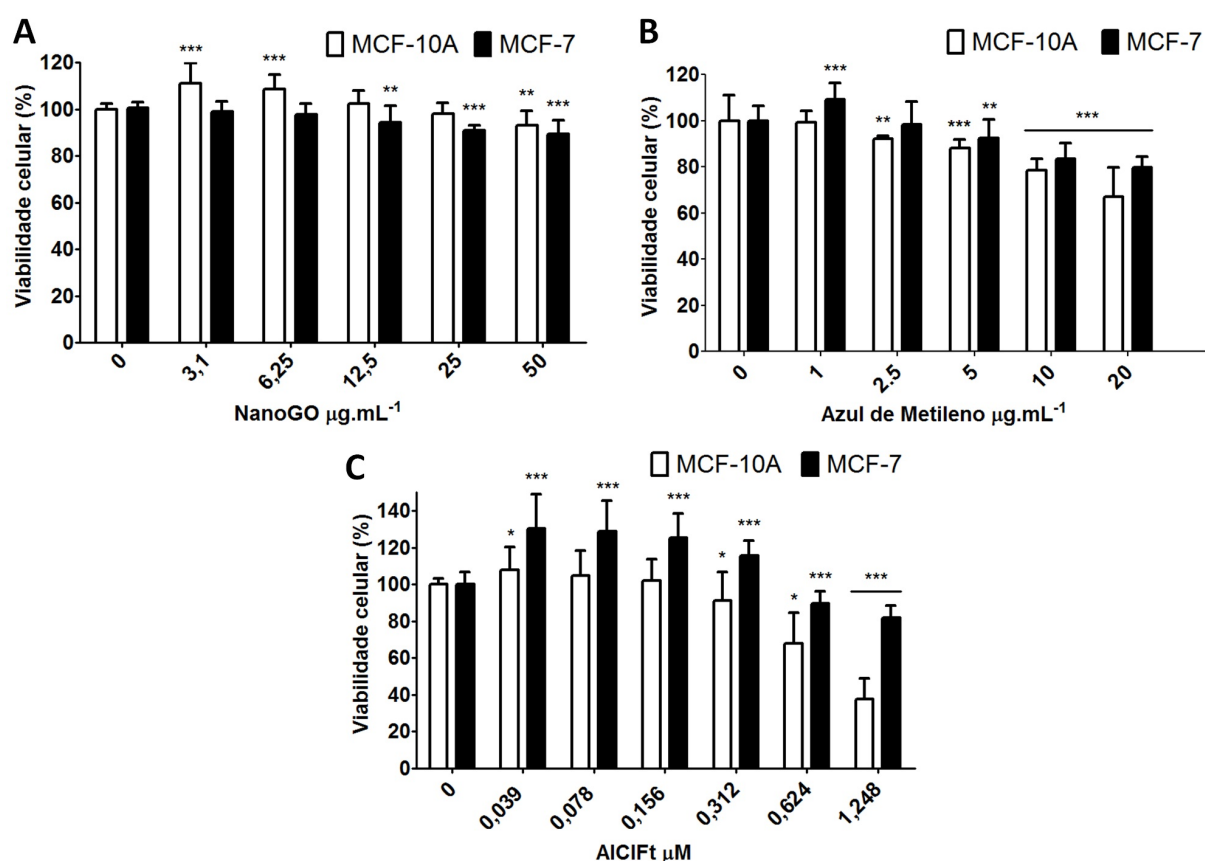


Figura 26: Citotoxicidade no escuro do NanoGO carboxilado (A), AM livre (B) e AICIFt livre (C) em células humanas MCF-10A (controle normal) e MCF-7 (tumoral) após tratamento por 24 horas.

Dados representam média e desvio padrão, $n=4$. Diferença significativa * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

Foram realizados ensaios de irradiação apenas com luz de LED 660 nm ou laser IVP 808 nm para avaliar as suas possíveis fototoxicidades frente as células estudadas. Reduções nas viabilidades poderiam ser observadas devido a efeitos térmicos, uma vez que o LED ou laser poderiam emitir calor durante a irradiação. No entanto, estes efeitos foram minimizados com a adição de sistemas de arrefecimento em ambos os dispositivos de irradiação. Embora reduções na viabilidade celular não tenham sido observadas, houve um aumento não significativo da viabilidade das células irradiadas com luz de LED 660 nm ou laser IVP 808 nm, figuras 27, 28, 29 e 30). A fotobiomodulação é um efeito no qual células sob irradiação com luz de comprimento de onda do vermelho longo ou infravermelho próximo sofrem modulação de diversas funções celulares, o que pode induzir a um aumento da proliferação celular [84].

As fototoxicidades de NanoGO-AM ($12,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ NanoGO carboxilado/ $2,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ AM) e NanoGO-AlClFt ($12,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ NanoGO / $0,312 \mu\text{M}$ AlClFt) foram investigadas por um ensaio de viabilidade utilizando células NIH/3T3, 4T1, 4T1-Luciferase, MCF-7 e MCF-10A após irradiação com luz de LED 660 nm (fluência de 30 J.cm^{-2}) e/ou luz de laser IVP 808 nm (fluência de $1,7 \text{ kJ.cm}^{-2}$), figuras 27, 28, 29 e 30).

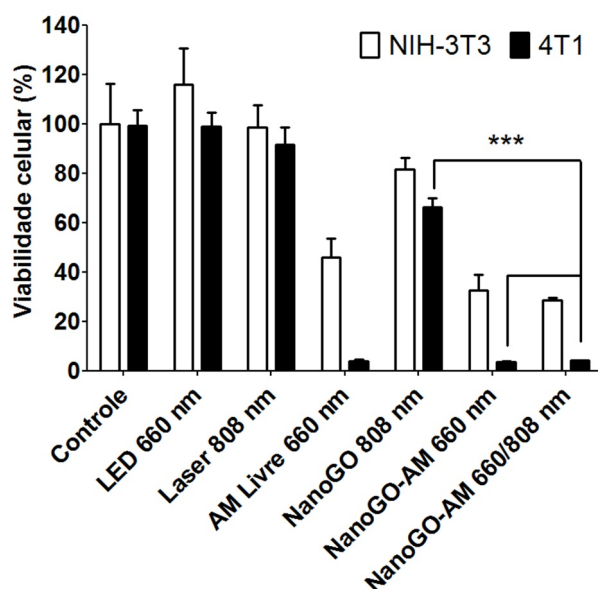


Figura 27: Fototoxicidade nas células NIH/3T3 (A) e 4T1 (B) após tratamento com NanoGO-AM por 24 horas e irradiação com luz de LED 660 nm e luz de laser IVP 808 nm. Os sistemas de emissão de LED e laser, na ausência de fotossensibilizador, não promoveram morte celular por si só. No entanto, há um aumento da viabilidade das células NIH/3T3 após a irradiação com luz de LED 660 nm. Dados representam média e desvio padrão, $n=4$. Diferença significativa *** $p < 0,001$.

A redução expressiva da viabilidade nos tratamentos com NanoGO-AM em 97% nas células 4T1 nos grupos TFD e TFD/TFT combinadas demonstrou o potencial das terapias propostas, figura 27. Valores similares de redução da viabilidade foram observados para AM livre sob irradiação com luz de LED 660 nm. Também houve uma redução da viabilidade das células MCF-7 tratadas com NanoGO-AM e irradiadas para apenas TFT de 4%, apenas TFD de 75,3% ($p < 0,001$) e TFD/TFT combinadas de 73% ($p < 0,001$). No entanto, não houve diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$) entre as duas últimas terapias e AM livre para TFD apenas (redução na viabilidade de 85,6%). Estes resultados mostraram que a eficiência fotodinâmica do azul de metileno foi preservada quando associado com NanoGO carboxilado, ainda que não tenha havido um efeito combinado das duas terapias. Com isso, ainda assim ele foi capaz de produzir espécies reativas de

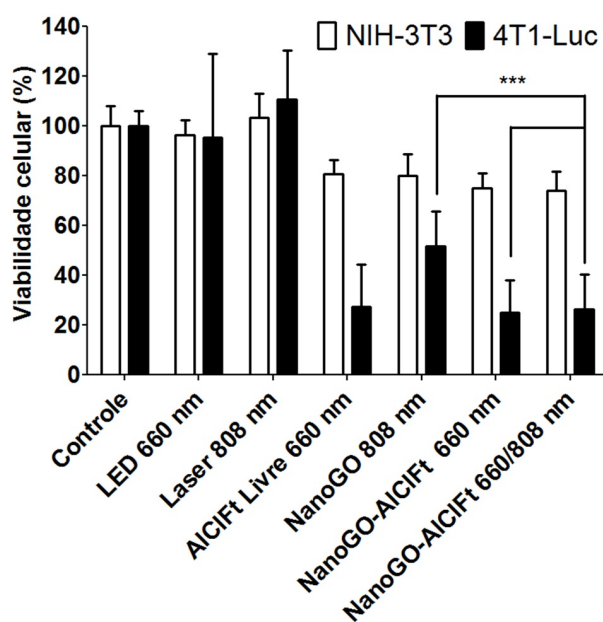


Figura 28: Fototoxicidade nas células NIH/3T3 (A) e 4T1-Luciferase (B) após tratamento com NanoGO-AlClFt por 24 horas e irradiação com luz de LED 660 nm e luz de laser IVP 808 nm.

Aumento da viabilidade das células 4T1-Luciferase após a irradiação com luz de LED 660 nm e luz de laser IVP 808 nm. Dados representam média e desvio padrão, n=4. Diferença significativa *** $p < 0,001$.

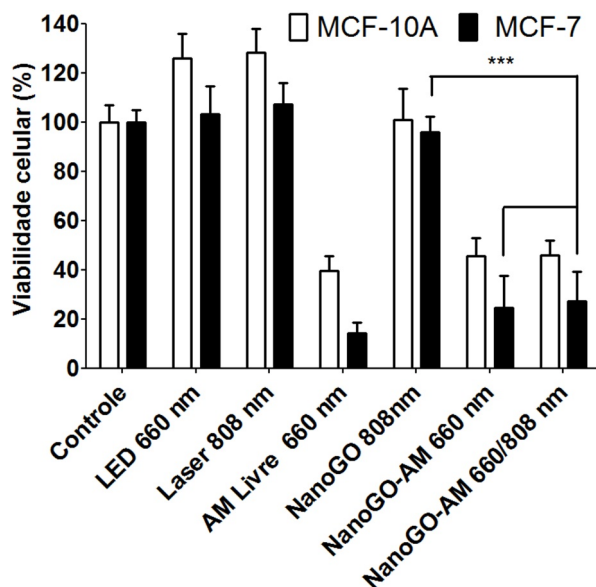


Figura 29: Fototoxicidade nas células MCF-10A (A) e MCF-7 (B) após tratamento com NanoGO-AM por 24 horas e irradiação com luz de LED 660 nm e luz de laser IVP 808 nm.

Aumento da viabilidade das células MCF-10A após a irradiação com luz de LED 660 nm e luz de laser IVP 808 nm. Dados representam média e desvio padrão, n=4. Diferença significativa *** $p < 0,001$.

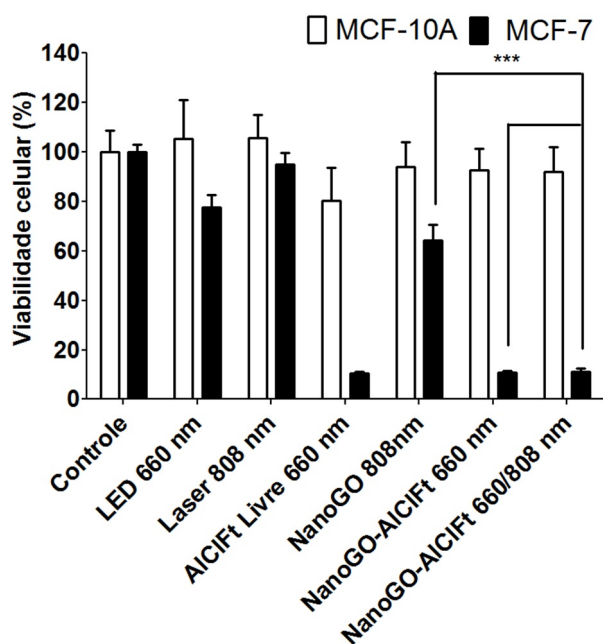


Figura 30: Fototoxicidade nas células MCF-10A (A) e MCF-7 (B) após tratamento com NanoGO-AlClFt por 24 horas e irradiação com luz de LED 660 nm e luz de laser IVP 808 nm.

Aumento da viabilidade das células MCF-10A após a irradiação com luz de LED 660 nm e luz de laser IVP 808 nm (aumento mais discreto). Dados representam média e desvio padrão, n=4. Diferença significativa *** $p < 0,001$.

oxigênio, promover estresse oxidativo e induzir morte celular. Para a linhagem MCF-10A, os tratamentos mencionados também exerceram forte impacto na viabilidade que orbitou em valores médios de 21% para os grupos nos quais os tratamentos envolviam TFD, mostrando uma maior sensibilidade dessas células aos tratamentos. Para a plataforma NanoGO-AlClFt os resultados foram semelhantes, mas como uma maior manutenção da viabilidade das células normais, NIH/3T3 ou MCF-10A, figuras 28 e 30. A viabilidade esteve em valores médios de 74,5%.

Em estudo realizado por Sahu *et al.* (2013), os autores encontraram uma diferença estatisticamente significativa entre a TFD ($p < 0,01$) e a TFT isoladas ($p < 0,05$) quando comparadas com TFD/TFT combinadas, mostrando o efeito sinérgico na redução da viabilidade com as duas terapias combinadas [5]. Mesmo não tendo encontrado resultado similar ao estudo mencionado, os resultados obtidos ainda assim são importantes, uma vez que neste estudo uma redução na viabilidade das células por NanoGO-AM, tão expressiva quanto a redução causada por AM livre, não era esperada. Devido à baixa

produção de ERO pela nanoplateforma conforme figura 22D, não esperavam-se valores de morte celular iguais tanto para AM livre quanto para AM associado a NanoGO carboxilado. A alta eficiência na produção de ERO da plataforma NanoGO-AM pode ser o resultado da protonação dos grupos COO^- em NanoGO carboxilado, sob a influência do ambiente intracelular mais ácido (pH 5,0) e posterior "liberação" do AM. Cessada a interação eletrostática entre AM e NanoGO carboxilado, a supressão da fluorescência deixa de acontecer e a capacidade do AM em produzir ERO é reestabelecida.

No que diz respeito a TFT apenas, em nenhum dos tratamentos realizados, com as duas diferentes plataformas de NanoGO ou NanoGO carboxilado, foram encontrados valores de viabilidade inferiores a 50%. A menor eficiência da TFT pode estar relacionada à menor concentração de NanoGO utilizada quando comparado com o resultado do aquecimento de NanoGO carboxilado a $200 \mu\text{g.mL}^{-1}$, figura 21. Para aumentar os efeitos da TFT uma alternativa tem sido o uso de laser pulsado ao invés de uma onda contínua. As interações elétron-fônon são responsáveis pela conversão da energia absorvida pelo agente fototérmico em calor. Durante o intervalo entre um pulso de laser e outro, um maior tempo de relaxamento elétron-fônon é alcançado e, portanto, uma maior eficiência na produção de calor. Isso resultaria até mesmo em uma redução da potência do laser utilizado [12]. Como mostrado por Tong *et al.* (2007), o tratamento de células que super expressavam folato com nano bastões de ouro associados ao folato, provocou a formação de bolhas na membrana plasmática, que foi alcançada com laser contínuo na potência de 6 mW, enquanto que para laser pulsado foi necessário apenas 0,75 mW de potência [85].

3.7 Medição da Produção de ERO por Ressonância Paramagnética Eletrônica-RPE *In Vitro*

A produção de ERO, exposta na forma de concentração de ERO em μM , mostra o grande potencial das duas nanoplateformas estudadas. Ainda que a produção de ERO de ambas as nanoplateformas tenha sido o suficiente para provocar morte celular nas linhagens NIH-3T3 e 4T1-Luc, a produção de ERO μM por NanoGO-AM superou a produção de NanoGO- AlCl_3Ft em aproximadamente 8 vezes, comparando os grupos para TFD de cada nanoplateforma, figura 31. Analisando apenas os grupos que foram irradiados para

TFD e tratados com AM e NanoGO-AM, foi observada uma diferença estatisticamente significativa na produção de ERO entre a célula normal e tumoral ($p < 0,001$). Possivelmente, essa maior produção de ERO pela célula tumoral deve-se a maior captação das nanoplateformas por essas células. No entanto, comparando AM livre TFD e NanoGO-AM TFD não houve diferença estatística entre os grupos, indicando que a capacidade de produzir ERO do AM de metileno foi preservada mesmo que em associação com o NanoGO, reforçando a hipótese de que o AM é liberado do NanoGO carboxilado quando em meio mais ácido e deixa de sofrer supressão de fluorescência.

Quanto a NanoGO-AICIFt, observamos uma maior diferença estatisticamente significativa na produção de ERO entre a TFD sozinha e TFD/TFT combinadas ($p < 0,001$), figura 31. TFD/TFT combinadas produzem aproximadamente 1,4 vezes mais ERO do que TFD sozinha. Esse dado permite hipotetizar se o NanoGO também está produzindo ERO sob irradiação com luz de laser IVP 808 nm, o que precisa ser melhor investigado. A produção de ERO entre AICIFt TFD e NanoGO-AICIFt também não é estatisticamente significativa, indicando a manutenção das propriedades fotofísicas de AICIFt mesmo na presença de NanoGO.

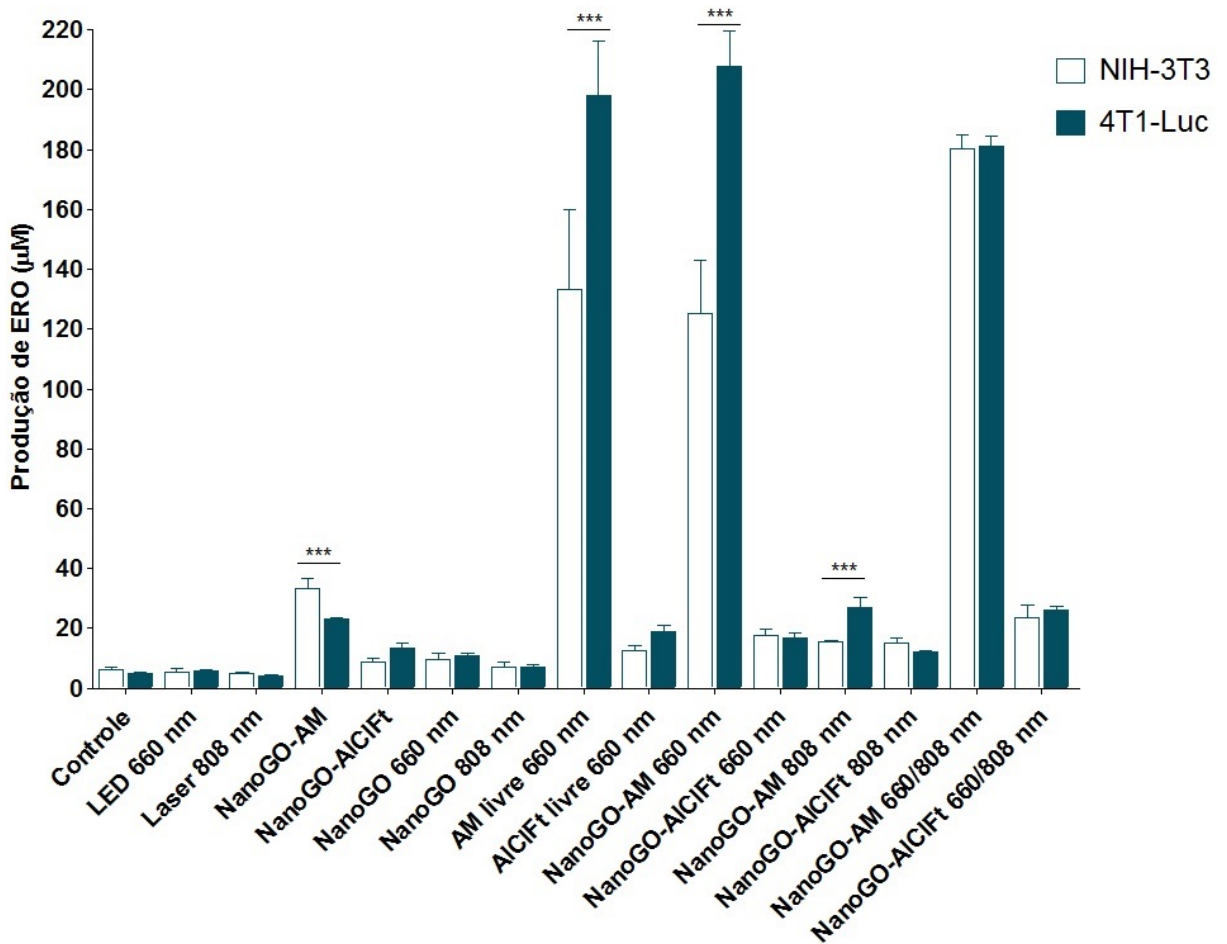


Figura 31: Produção de ERO medidas por RPE nas célula 4T1-Luciferase após tratamento com NanoGO-AM (A), NanoGO-AICIFt (B) e irradiação com luz de LED 660 nm e luz de laser IVP 808 nm.

Dados representam média e desvio padrão, n=3. Diferença significativa *** $p < 0,001$.

3.8 Terapia Fotodinâmica e Fototérmica *In Vivo*

Os tratamentos foram iniciados 15 dias após a indução tumoral, com tumores com volume aproximado de 25 mm³. Para TFD, os animais foram irradiados com luz de LED 660 nm (fluência 90,78 J.cm⁻², 10 minutos) e para TFT, com luz de laser infravermelho próximo 808 nm (fluência de 8,3 kJ.cm⁻², 15 minutos). Na TFD/TFT combinadas os animais foram irradiados com o LED, seguido da irradiação pelo laser, figura 32.

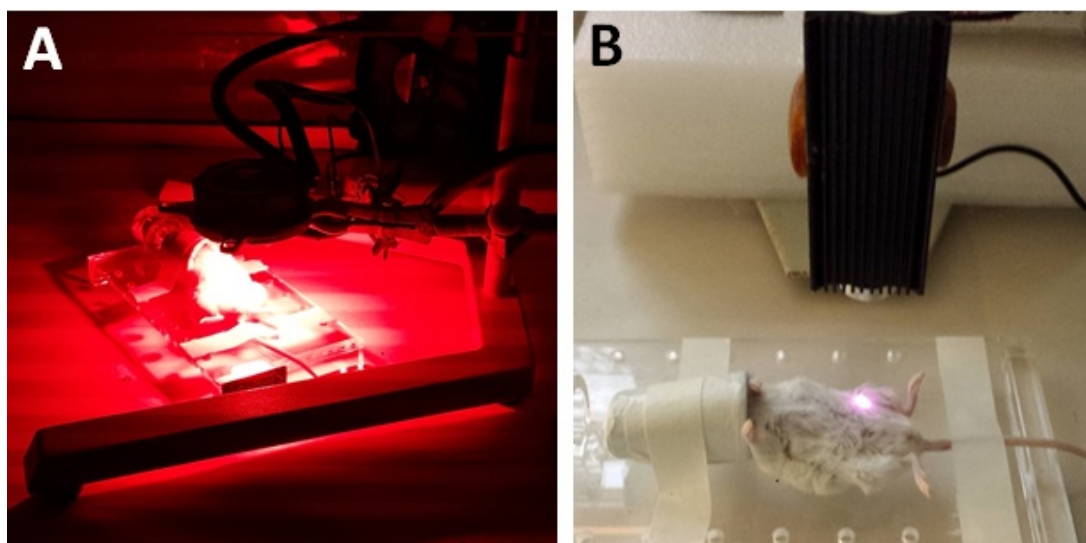


Figura 32: Irradiação para terapia fotodinâmica (A) e fototérmica (B) *In Vivo*. Os animais foram anestesiados e irradiados para TFD a fluência de 90,78 J.cm⁻² (10 minutos) e para TFT a fluência de 8,3 kJ.cm⁻² (15 minutos). Na imagem não é mostrado, mas apenas a área do tumor foi irradiada.

Câmera infravermelha foi utilizada para registrar o aumento de temperatura em tempo real no local do tumor durante a irradiação com luz de IVP 808 nm de camundongos tratados com solução salina, NanoGO-AM e NanoGO-AIClFt. Quando o animal foi tratado intratumoralmente com PBS e irradiado, a variação de temperatura foi de apenas 2 °C, figura 33A. Em camundongos, onde não houve extravasamento dos 25 µL de NanoGO-AM ou NanoGO-AIClFt durante a administração intratumoral para os tecidos proximais, atingiram-se altas temperaturas entre 58-80 °C, alcançando até 100 °C, como mostrado na figura 33C. Por outro lado, quando as nanoplatatformas pareciam estar menos concentradas no local do tumor, atingiam-se temperaturas de 42-50 °C durante a irradiação com luz de laser IVP 808 nm, figura 33B.

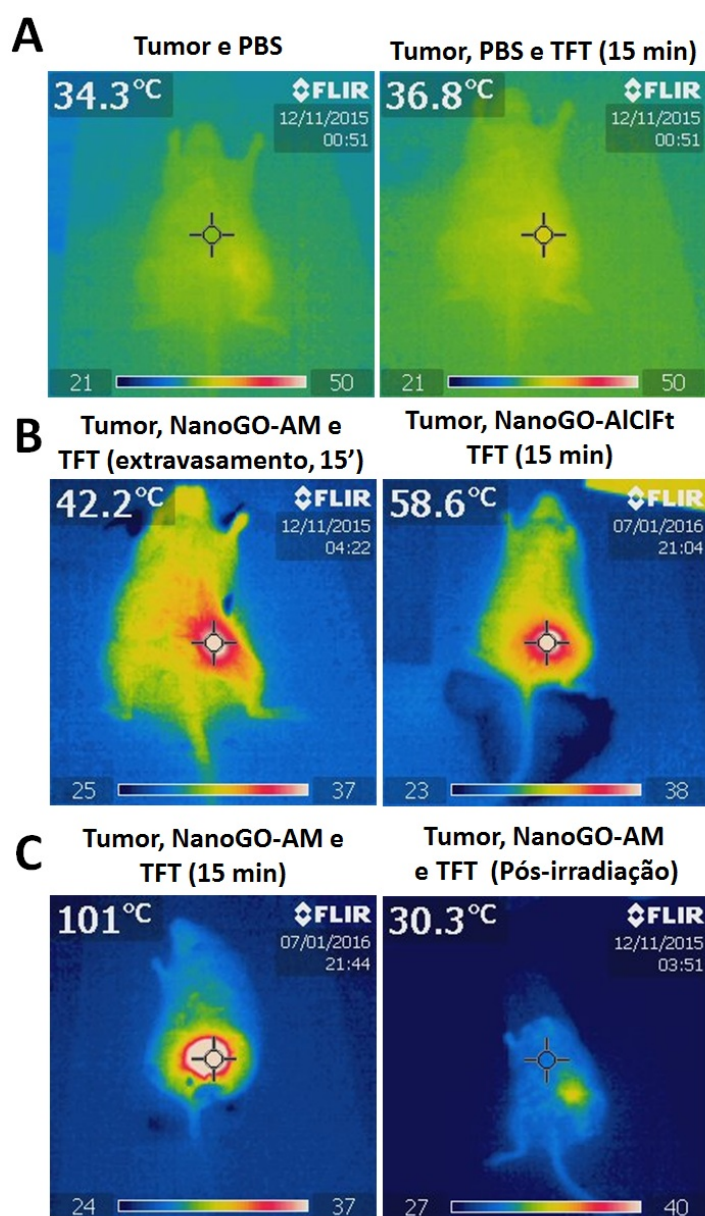


Figura 33: Imagens por câmera térmica dos animais durante a irradiação com o sistema de laser IVP 808 nm a fluência de $8,3 \text{ kJ.cm}^{-2}$.

A. Discreta variação na temperatura no sítio irradiado do animal tratado apenas com PBS, **B.** Fototerapia apenas nos animais tratados com NanoGO-AM ou NanoGO-ALCIFt e irradiados com luz de laser IVP 808 nm e **C.** Fototerapia nos animais tratados com NanoGO-AM e irradiados com luz de laser IVP 808 nm e animais após a irradiação.

Possivelmente, devido à natureza sólida dos tumores, às vezes a administração das nanoplateformas não era idealmente realizada. De toda forma, verificou-se a capacidade do NanoGO ou NanoGO carboxilado de desempenhar o papel tanto de um carreador dos

fotosensibilizadores AM ou AlClFt, como o de atuar como agente fototérmico, atingindo temperaturas superiores a 47 °C, ideais para ablação tumoral [8].

A via intratumoral de administração escolhida para este estudo foi uma tentativa de superar as desvantagens da injeção intravenosa via veia caudal, como a captação pelo sistema reticuloendotelial, pouco tempo de circulação sanguínea e biodisponibilidade [86]. Além disso, como sugerido por Huang *et al.*(2014), a via de administração preferida para fototerapias é a intratumoral, porque concentra o agente fotodinâmico/fototérmico em uma área específica, concentrando seus efeitos [87]. Além do que, essa via de administração evita o acúmulo de NanoGO nos pulmões, o que resultaria em edema pulmonar e formação de granuloma, como mostrado em outro estudo no qual foi realizada administração I.V. [86]. Houve o surgimento de uma ferida relacionada à queima causada pela irradiação nos animais dos grupos que receberam TFT no dia seguinte ao tratamento, figura 34.

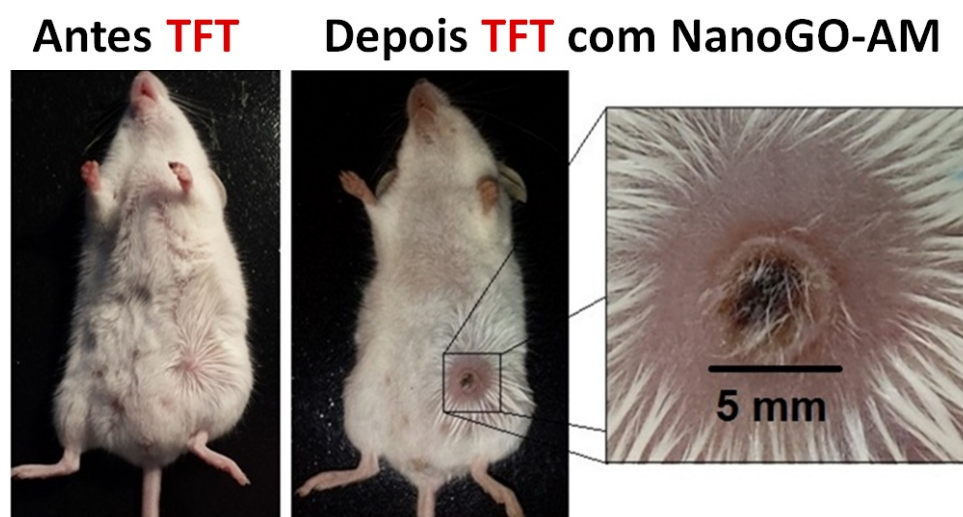


Figura 34: Aspecto da ferida após a realização da terapia fototérmica com NanoGO-AM e irradiação com luz laser IVP 808 nm.

Local do tumor antes e após a terapia fototérmica, aspecto da ferida um dia após a irradiação com luz laser IVP 808 nm. O tecido cicatricial mede 5 milímetros.

Em alguns camundongos, a TFD causou um processo inflamatório no local da irradiação com o surgimento de secreção. Nos grupos TFD/TFT combinadas, a TFT pareceu auxiliar no processo de cura e cicatrização da ferida, promovendo a cauterização do ferimento. Durante todo o período do estudo não foi observada significativa variação do peso dos animais. Ao longo dos tratamentos houve a morte de nove animais. No entanto, essas mortes são provavelmente devido a progressão tumoral, não podendo ser

inteiramente atribuídas aos tratamentos realizados, uma vez que nenhum dos animais dos grupos TFD/TFT combinadas, tanto para NanoGO-AM e NanoGO-AICIFt, sucumbiram a óbito.

3.9 Imageamento, Progressão Tumoral e Metástase

O tumor de carcinoma mamário murino (4T1) é conhecido na literatura por seu grande potencial metastático e agressividade. As células 4T1-Luciferase em camundongos são capazes de reproduzir o carcinoma de mama humano em relação ao crescimento tumoral e metástase, representando um modelo animal para a fase IV do carcinoma de mama humano [88–91]. Além disso, neste estudo, as células 4T1-Luciferase foram utilizadas como uma ferramenta para imageamento, uma vez que emitem bioluminescência, que foi coletada para monitorar a progressão do tumor e rastrear a eficiência do tratamento [92]. A luciferina é uma substância com um grupo prostético heterocíclico, complexada a albumina, encontrada em vagalumes e outros animais que, na presença de ATP e enzima luciferase, se torna luminescente. A bioluminescência originada pela degradação da D-luciferina é oriunda da emissão de fótons no comprimento de onda 560 nm. Os picos de bioluminescência, escala de cores quentes e frias nas imagens, mostram as regiões nas quais se encontram o tumor. As células 4T1-Luciferase foram testadas para verificar a produção de bioluminescência e ilustram a intensidade da bioluminescência alcançada em cada poço conforme figura 35.

Na figura 36, são observados os grupos controles e tratados para as TFD, TFT e TFD/TFT combinadas, mediadas por NanoGO-AM, antes do início dos tratamentos. As imagens foram colocadas na mesma escala, para que durante a análise, os tumores de menor bioluminescências não aparecessem subestimados devido aos altos valores de intensidade de outros tumores. Portanto, como isso ocorrerá ao longo dessas análises, além de terem sido organizados de forma quantitativa, os dados também podem ser vistos em gráficos de bioluminescência total. Ainda na figura 36, podemos observar que o tamanho e intensidade de bioluminescência do tumor do animal número três, do grupo TFD apenas, é mais expressivo do que os dos demais animais. Isso pode ser causado por erros na técnica de indução tumoral. A agulha é deslocada acidentalmente no ducto mamário e as

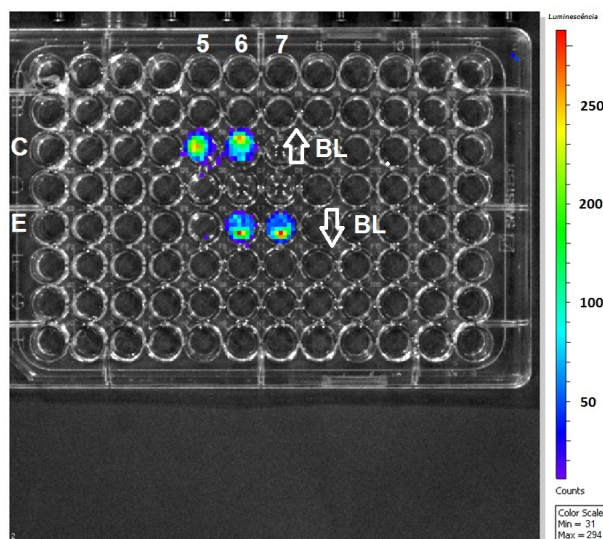


Figura 35: **Imagem de bioluminescência de células 4T1-Luciferase.**

Imagem em IVIS Lumina de células 4T1-Luciferase após adição de 10 μL de D-luciferina por poço. Nos poços da linha C da microplaca de 96 poços, o meio de cultivo DMEM foi removido e adicionados 10 μL de D-luciferina por poço, concentração de 15 mg.mL^{-1} . Nos poços da linha E da placa, o meio de cultivo DMEM foi mantido e adicionados 10 μL de D-luciferina por poço, concentração de $0,7 \text{ mg.mL}^{-1}$. A maior concentração de D-luciferina nos poços da linha C resultaram em uma maior BL.

células não são injetadas somente na região do ductal. Ou, a agulha perfura a cavidade peritoneal e acaba por dar origem a um tumor na região abdominal do animal.

Em comparação com a TFD ou TFT isoladamente, o ensaio *in vivo* demonstrou o efeito sinérgico proporcionado por NanoGO-AM nas TFD/TFT combinadas para o tratamento de camundongos BALB/c fêmeas portadoras de tumor de células 4T1-Luciferase, figura 36. Enquanto nos resultados *in vitro* podem ter sido levantadas questões sobre a necessidade da associação das nanofolhas de óxido de grafeno ao azul de metileno, uma vez que não havia significância estatística entre os valores de viabilidade das células tratadas para TFD/TFT combinadas mediadas por NanoGO-AM em comparação com apenas AM livre em TFD, no estudo *in vivo* as nanofolhas de óxido de grafeno (em NanoGO-AM) foram determinantes para o sucesso da TFD/TFT combinadas. A partir da combinação das duas terapias houve ablação tumoral total, com controle da proliferação do tumor logo após o primeiro tratamento e ausência de recidiva durante 30 dias de acompanhamento após o último tratamento, figura 37A. Outro dado interessante, que pode ser observado ainda na mesma figura, é a bioluminescência total para o grupo TFD/TFT combinadas (após o tratamento número três) 63 vezes menor do que os grupos apenas TFD ou ape-

NanoGO-AM

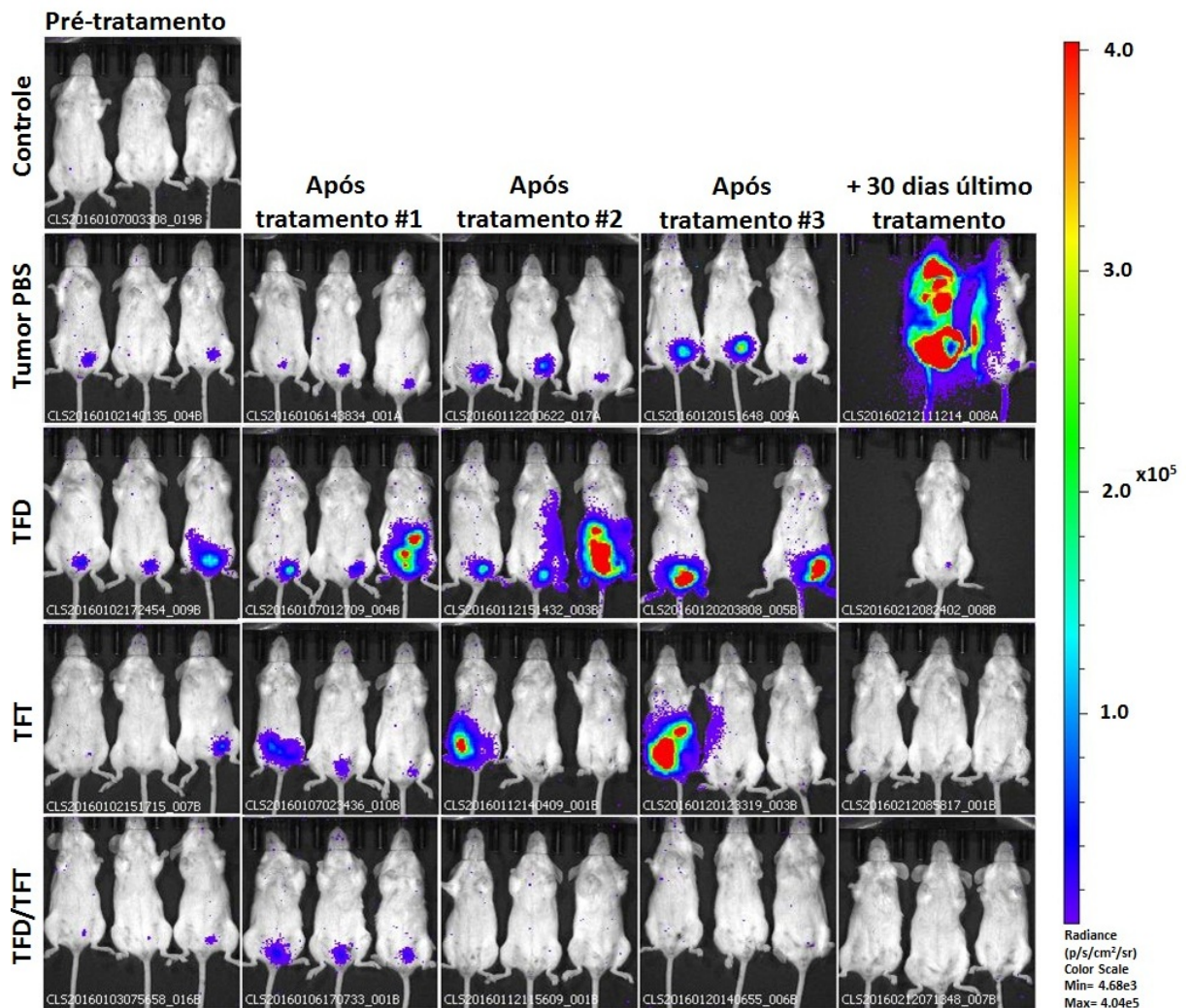


Figura 36: Imagens de bioluminescência de camundongos BALB/c antes do início dos tratamentos com NanoGO-AM e irradiação, n=5.

Grupos experimentais de animais não portadores e portadores de tumor antes do início dos tratamentos para TFD, TFT e TFD/TFT combinadas, n=5.

nas TFT. Na figura 38, estão dispostos os grupos controles positivos para os tratamentos apenas irradiação com luz de LED 660 nm (dois animais vivos), apenas luz de laser IVP 808 nm (quatro animais vivos) e administração de NanoGO-AM apenas (5 animais vivos). Ao final dos experimentos tivemos a seguinte sobrevivência para os grupos controle sadio (5 animais), tumor PBS (4 animais), tumor NanoGO-AM apenas TFD (2 animais), tumor NanoGO-AM apenas TFT (4 animais) e tumor NanoGO-AM TFD/TFT combinadas (5

animais). Os animais vivos, ao final dos tratamentos, foram listados na tabela 8.

Tabela 8: **Grupos experimentais- Animais vivos**

Grupo G1: Controle Sadios (5 animais);
Grupo G2: Tumor + Salina (4 animais);
Grupo G3: Tumor + LED 660 nm (2 animais);
Grupo G4: Tumor + Laser IVP 808 nm (4 animais);
Grupo G5: Tumor + NanoGO-AM (5 animais);
Grupo G6: Tumor + NanoGO-AM + TFD (apenas 2 animais);
Grupo G7: Tumor + NanoGO-AM + TFT (4 animais);
Grupo G8: Tumor + NanoGO-AM + TFD + TFT (5 animais);

Os animais dos grupos tratados com luz de LED 660 nm apresentaram uma maior proliferação tumoral, baseado nas imagens de bioluminescência. Já foi exposto por outros autores que o tratamento com luz do espectro vermelho entre 630-1000 nm modula inúmeras funções celulares, exercendo a fotobiomodulação. Esse efeito tem resultados positivos como aceleração da cura de feridas, recuperação de tecido cardíaco que sofreu injúria por isquemia e degeneração atenuada de nervo óptico danificado por melhorar a produção e metabolismo de energia mitocondrial [84, 93]. Esse mesmo mecanismo pode provocar um aumento na proliferação das células normais e tumorais. Um aumento na proliferação celular pode contribuir para uma amplificação da agressividade do tumor e, com isso, facilitar a sua migração para os demais órgãos. Na figura 37B observam-se os volumes tumorais relativos para os diversos tratamentos com valor de $p < 0,001$ ao se comparar a TFD/TFT combinadas com as mesmas terapias isoladas. Em C, temos a análise da variação do peso corporal dos animais ao longo dos tratamentos. O grupo TFD/TFT combinadas sofre a maior variação no peso corporal, mas com recuperação de peso para os valores próximos ao do início dos tratamentos. Provavelmente isto se deve ao estresse de receber duas terapias combinadas, quando comparada com a variação de peso corporal nos demais grupos.

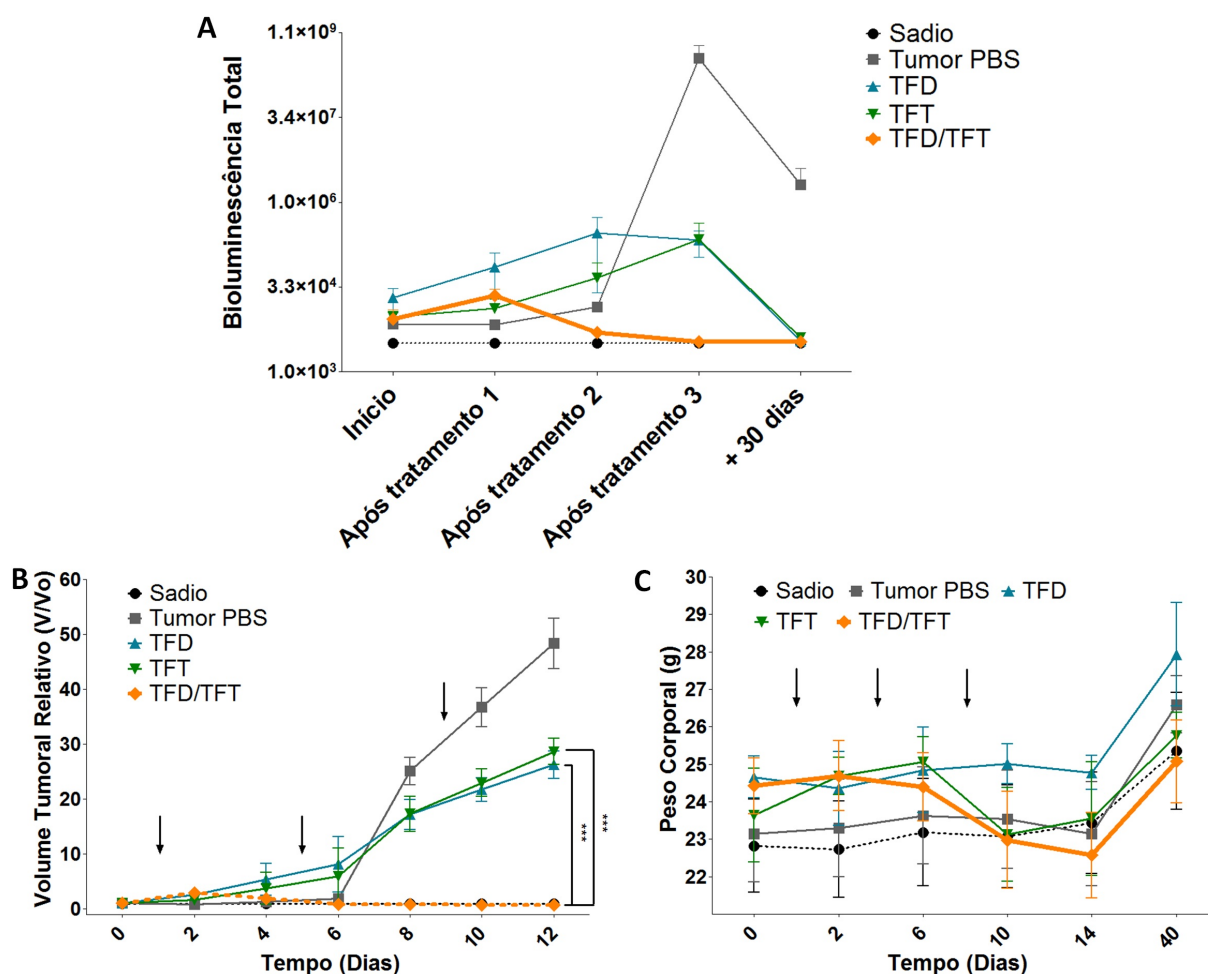


Figura 37: Representação gráfica dos dados de bioluminescência, volume tumoral relativo e peso corporal de camundongos BALB/c durante tratamento com NanoGO-AM e irradiação, $n=5$.

A. Bioluminescência total, B. volume tumoral relativo e C. peso corporal. Foi notável o expressivo aumento do volume tumoral nos grupos que não receberam tratamento ou nos grupos nos quais as terapias fotodinâmica e fototérmica foram realizadas de forma isolada. As setas indicam os momentos nos quais as terapias foram realizadas. Diferença significativa *** $p < 0,001$.

Mesmo no grupo TFD/TFT combinadas, no qual os animais receberam duas terapias, sofrendo um maior estresse, os camundongos sobreviveram até 30 dias após o último tratamento sem reincidência do tumor e com a ausência de metástases em órgãos principais como fígado, pulmões e baço. O mesmo não ocorreu com os animais dos outros grupos, que apresentaram pelo menos um órgão afetado por metástase e sucumbiram ao óbito. Atribuímos essas observações ao aumento de temperatura causado pela irradiação com laser IVP 808 nm na presença de NanoGO-AM, que pode ter promovido mudanças na

permeabilidade dos vasos e tecidos, aumentando o fluxo sanguíneo no local e atenuando parcialmente a hipóxia [8, 94, 95]. Isso pode ter levado a uma maior oxigenação tecidual e a uma maior produção de ERO no tecido quando sob irradiação por luz de LED 660 nm. Uma vez que a produção de ERO depende da quantidade de oxigênio disponível no tecido, essa mudança na permeabilidade vascular pode resultar em remissão tumoral e prevenção de metástases como observado [8]. Todos os camundongos foram tratados um total de três vezes a cada quatro dias, e a bioluminescência foi coletada em cada dia seguinte ao tratamento. Para o grupo TFD/TFT combinadas, após o primeiro tratamento, houve diminuição no sinal de bioluminescência. Enquanto que nos outros grupos o sinal aumentou ao longo do tempo, indicando um aumento do tamanho do tumor.

Resultados similares puderam ser observados para NanoGO-AIClFt. Na figura 39 estão expostos os grupos experimentais controles e tratados para as TFD, TFT e TFD/TFT combinadas, mediadas por NanoGO-AIClFt, antes do início dos tratamentos. Na mesma figura, o animal número dois do grupo TFD apresenta tumor mais bioluminescente do que os animais dos demais grupos. Esse desenvolvimento avançado do tumor pode impedir o sucesso da terapia nesse animal. Quanto maior o tumor, mais periférica é a vascularização e maiores as chances de heterogeneidade de suprimento de oxigênio. Como a TFD necessita de oxigênio tissular para a produção de oxigênio singleto, neste animal a terapia pode não atingir todo o seu potencial.

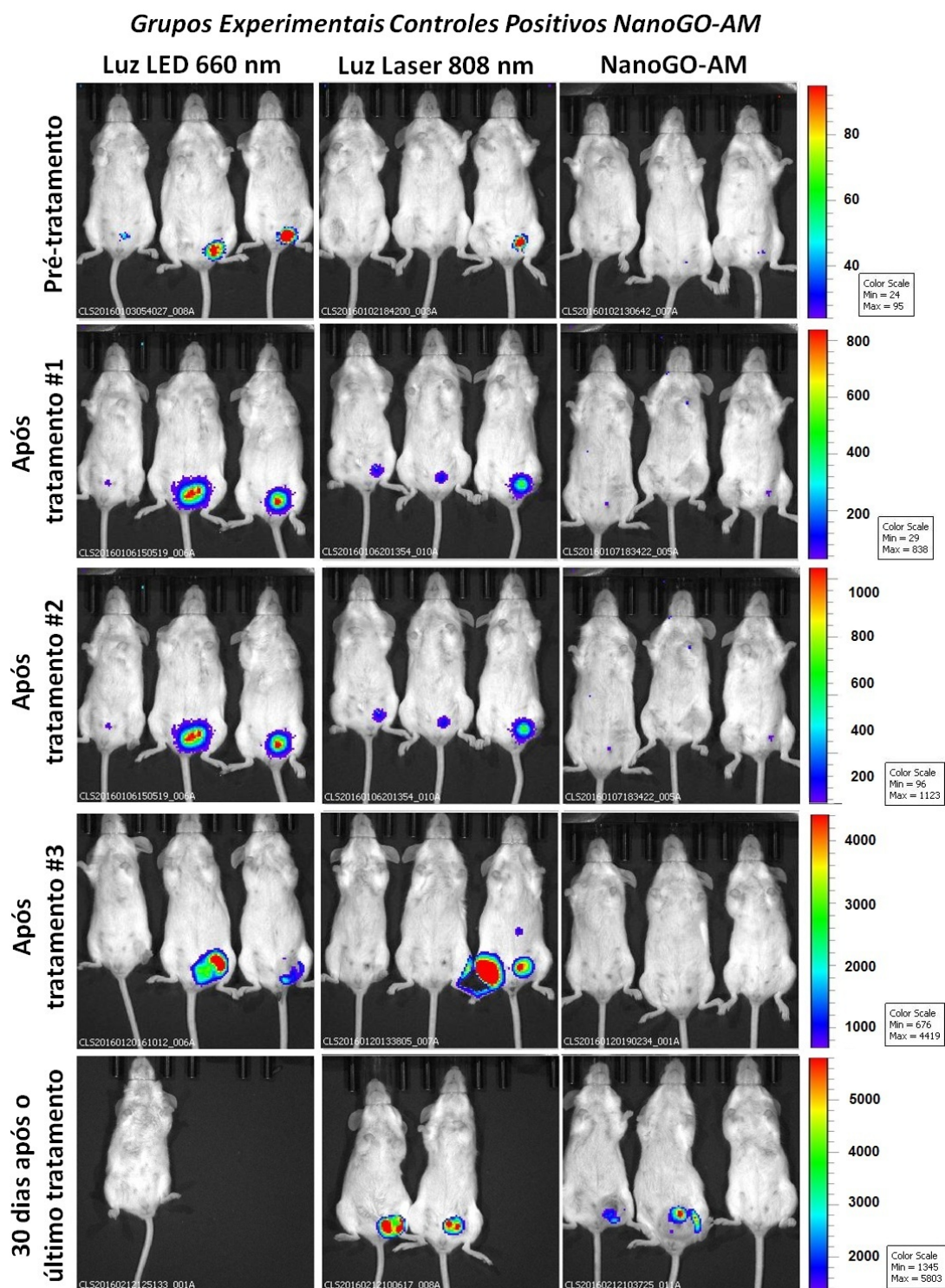


Figura 38: Imagens de bioluminescência de camundongos do grupo apenas luz LED 660 nm, luz de laser IVP 808 nm e NanoGO-AM (sem irradiação), n=5. Grupos experimentais de animais portadores de tumor ao longo dos tratamentos.

NanoGO-AICIFt

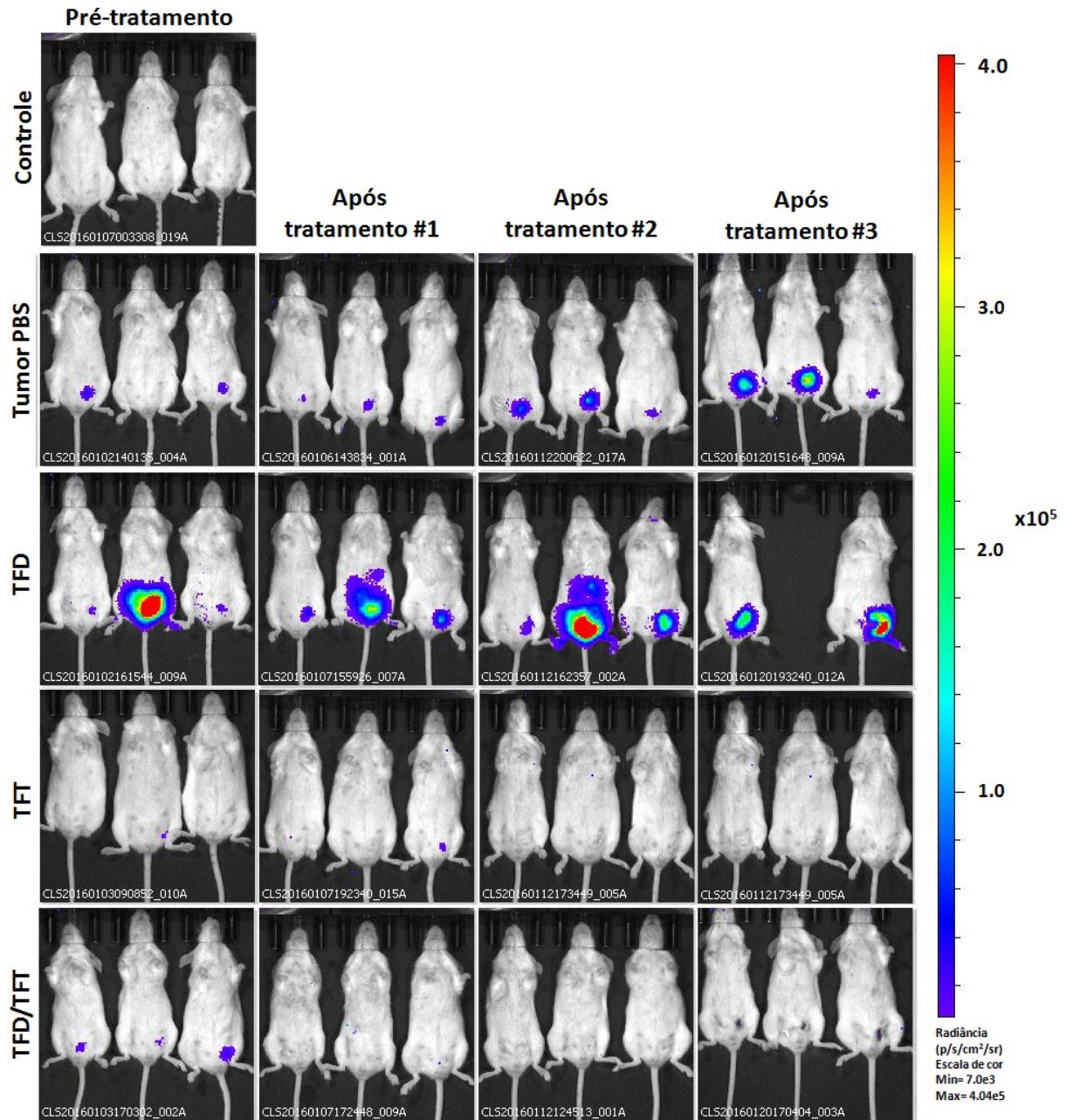


Figura 39: Imagens de bioluminescência de camundongos BALB/c antes do início dos tratamentos com NanoGO-AICIFt e irradiação. Grupos experimentais de animais não portadores e portadores de tumor antes do início dos tratamentos para TFD, TFT e TFD/TFT combinadas, n=5.

Os animais do grupo TFD com NanoGO-AIClFt apresentaram um maior desenvolvimento do tumor, figura 39 e figura 40A. Provavelmente, devido a um incidente na indução tumoral, os animais do grupo TFD apresentaram níveis de bioluminescência até 10000 vezes maiores do que os demais grupos, figuras 40A. Na figura 40B, um aumento torna possível a visualização dos grupos tumor PBS, TFT TFD/TFT combinadas. As TFT e TFD/TFT combinadas no grupo de NanoGO-AIClFt não foram capazes de promover ablação tumoral total, mas apenas o controle da progressão tumoral e aumento do volume tumoral. Isso pode indicar que a concentração de AIClFt utilizada foi insuficiente para a ablação total do tumor, sendo necessário futuros ajustes de dose. O tratamento para o grupo TFD exibiu grande eficiência na ablação tumoral, uma vez que reduziu os valores de bioluminescência no primeiro tratamento em aproximadamente 1000 vezes, figura 40A. Os valores do volume tumoral relativo na figura 40C mostra o crescimento exponencial do grupo tumor PBS, grupo que não recebe tratamento. Na figura 40D são visíveis as alterações no peso corporal dos animais devido a progressão tumoral. Por último a representação em IBL dos grupos controle tratados com apenas luz de LED 660 nm, luz de laser IVP 808 nm e plataforma de NanoGO-AIClFt, a figura 41.

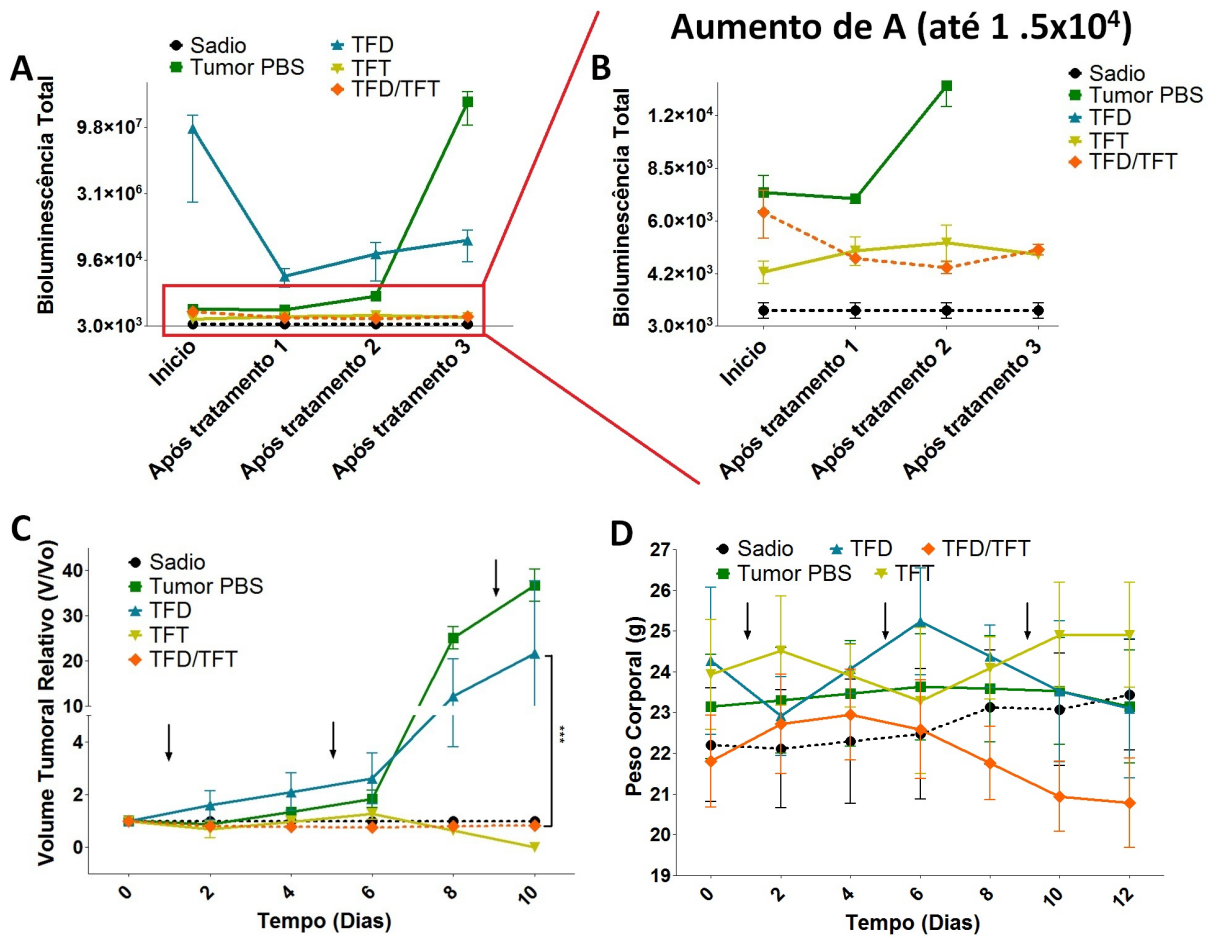


Figura 40: Representação gráfica dos dados de bioluminescência, volume tumoral relativo e peso corporal de camundongos BALB/c durante tratamento com NanoGO-AIClFt e irradiação, n=5.

A. Bioluminescência total, B. aumento da região em vermelho de A., C. volume tumoral relativo e D. peso corporal. As setas indicam os momentos nos quais as terapias foram realizadas. Diferença significativa *** $p < 0,001$.

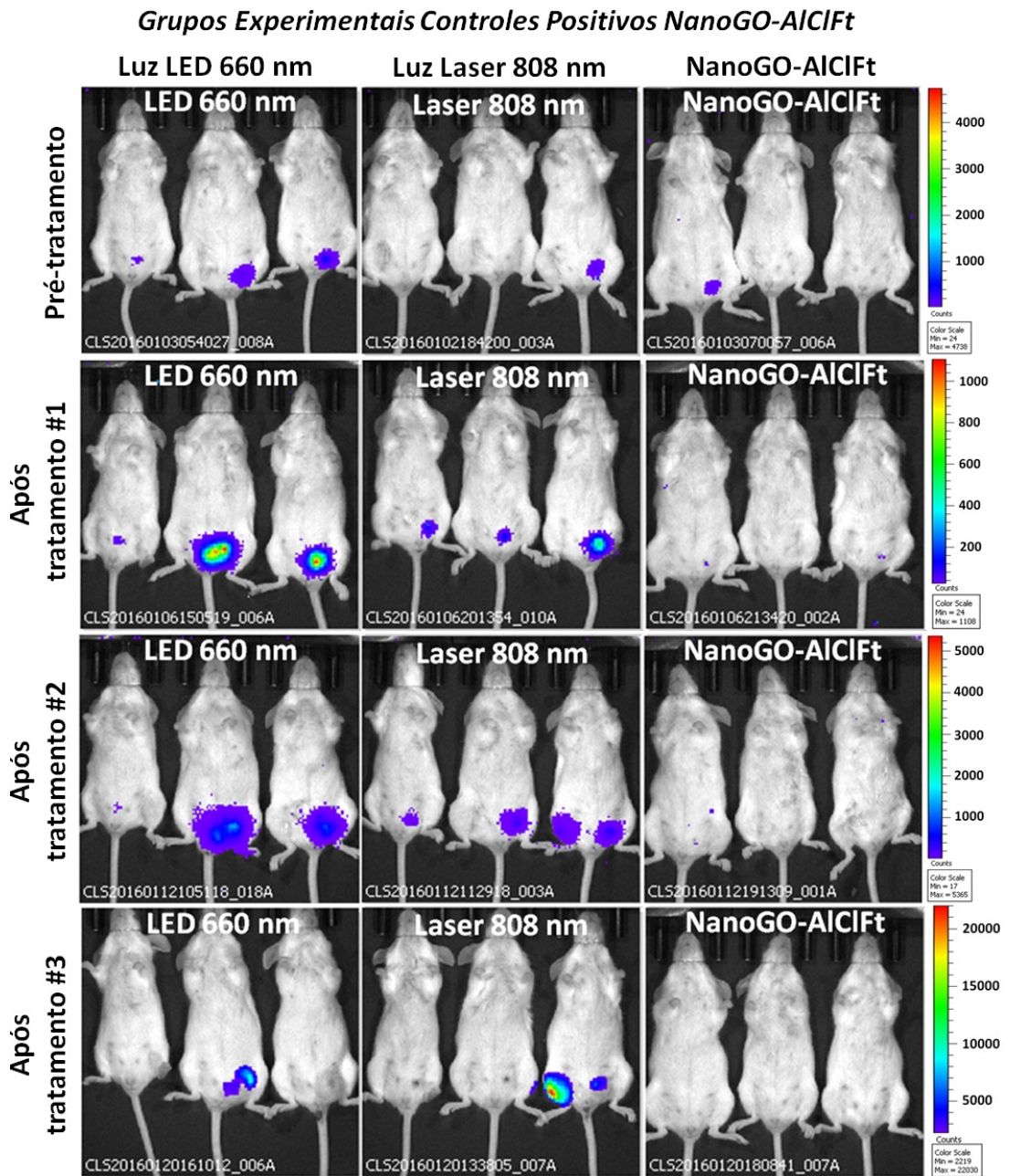


Figura 41: Imagens de bioluminescência de camundongos do grupo apenas luz LED 660 nm, luz de laser IVP 808 nm e NanoGO-AICIFt (sem irradiação), n=5. Grupos experimentais de animais portadores de tumor ao longo dos tratamentos.

3.10 Avaliação Macroscópica e Clínica de Órgãos e Tumor Obtido por Inoculação Ortotópica, apenas para o grupo NanoGO-AM

Foram observadas alterações morfológicas que sugeriam metástase pulmonar em um animal do grupo de TFD e TFT combinadas, mas que não foi confirmada em análises histológicas. Dentro do mesmo grupo houve um caso de esplenomegalia e outro de hepatomegalia. No entanto, foi observada a ausência de tumor no animais. Tumores de 16 mm de comprimento por 16 mm de largura puderam ser observados em animais do grupo tumor + NanoGO-AM, figura 42A e 42B. Em diversos animais que receberam tratamento com NanoGO-AM foi observado o possível acúmulo da formulação no linfonodo sentinela, conforme pode ser visualizado na figura 42C e 42D. O linfonodo sentinela é o nódulo linfático que primeiro recebe a drenagem de um tumor [96]. Devido a administração de NanoGO-AM ter sido intratumoral, pequenas porções de NanoGO-AM, podem estar presentes nesse linfonodo. No grupo de animais controle sadios, nenhum dos animais apresentava tumor ou recebeu NanoGO-AM, no entanto, um animal apresentou hepatomegalia. No grupo tumor NanoGO-AM TFT um animal com tumor, morto, exibiu fenômenos abióticos consecutivos transformativos (autólise, putrefação, maceração, mumificação e saponificação), e hepatomegalia. Um dos animais do grupo tumor+laser apresentou tumor no mediastino (sugestão de metástase). Os animais do grupo tumor PBS apresentavam metástases no fígado, baço, pulmão e, em dois animais, esplenomegalia. Os casos de esplenomegalia têm ocorrência em estudos pré-clínicos e clínicos do uso do azul de metileno. Em relato de Hejtmancik *et al.* (2002), em um caso fatal de envenenamento severo por nitrobenzeno em humano, foi administrado AM na paciente a concentração de 2 mg.kg^{-1} (12-12 horas, via oral) para reversão de metahemoglobinemia. Essa foi a mesma concentração utilizada na administração intratumoral de NanoGO-AM neste estudo. Quatro dias após o início do tratamento a paciente veio a óbito e permaneceu inexplicável a ocorrência de esplenomegalia [97]. Em outro estudo com animais, o AM foi administrado por gavagem as concentrações de 0, 25, 50, 100 e 200 mg.kg^{-1} . Durante o estudo que durou 1, 6 e 13 semanas, o tratamento com AM resultou em formação de metahemoglobina e dano oxidativo nos glóbulos vermelhos, causando uma anemia regenerativa, além de uma variedade

de alterações bioquímicas secundárias a lesões de eritrócitos [37].

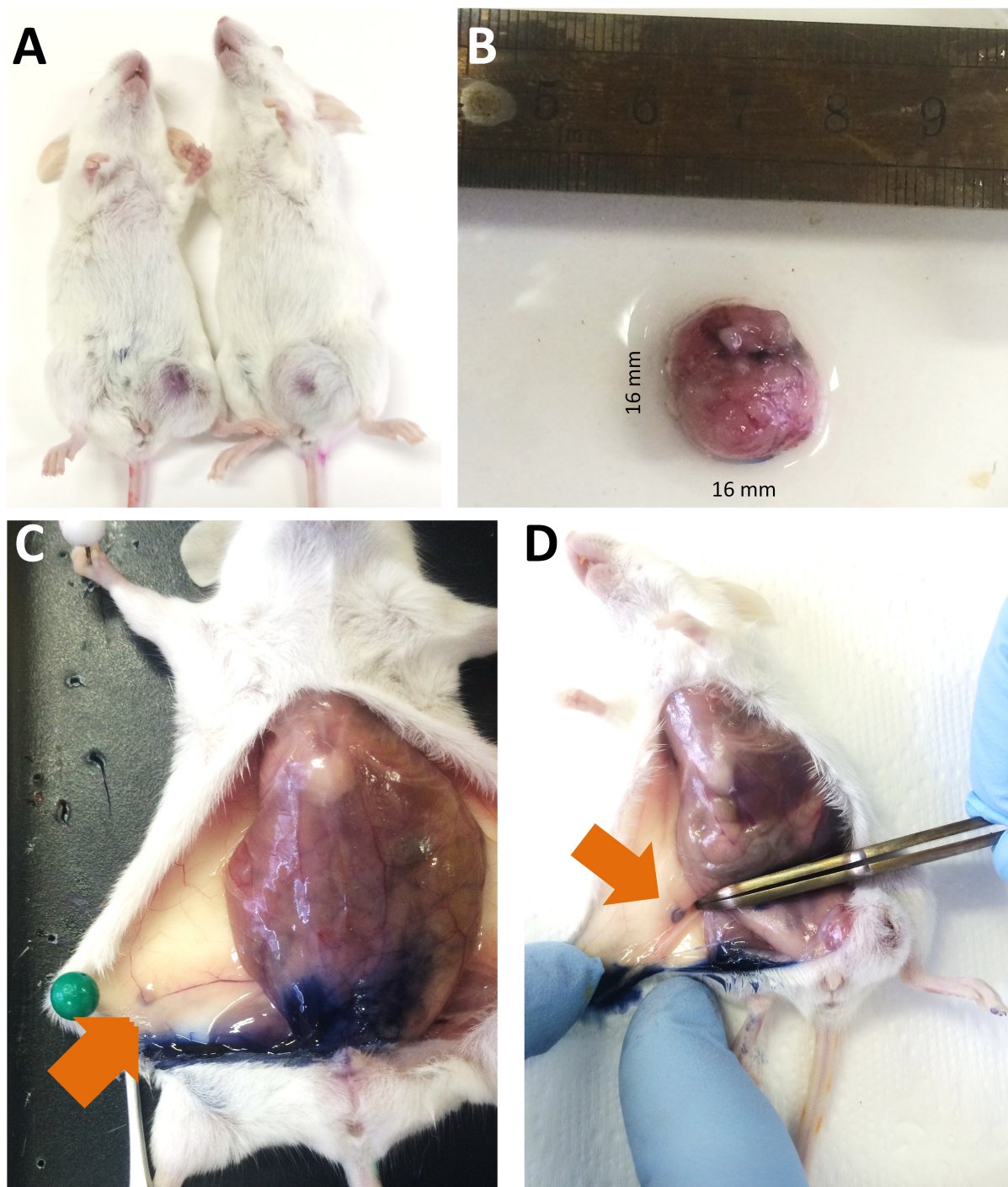


Figura 42: Avaliação macroscópica e clínica dos animais após a eutanásia. **A.** Animais do grupo tumor+NanoGO-AM, presença de tumor, **B.** Tumor de mama retirado de animal do grupo tumor+NanoGO-AM, **C.** e **D.** As setas indicam o possível acúmulo da nanoplateforma NanoGO-AM no linfonodo sentinela dos animais de diferentes grupos.

Foram tratados ratos e camundongos, no entanto os camundongos pareceram mais sensíveis ao desenvolvimento de anemia. A esplenomegalia foi evidente em todos os camundongos tratados e nos ratos tratados com 100 e 200 mg.kg⁻¹ na necropsia. O aumento do peso do baço nos animais esteve relacionada com a dose de AM administrado em ambas as espécies. Demais experimentos revelaram aumento da hematopoiese esplênica em todos os grupos de tratamento de camundongos e em ratos a partir da dose de 50 mg.kg⁻¹. Por fim, alguns camundongos apresentaram aumento da taxa de hematopoiese no fígado (o que pode levar a hepatomegalia), mas apenas nas doses de tratamento mais elevadas (100 e 200 mg.kg⁻¹). O conjunto de achados levam ao diagnóstico de desenvolvimento de anemia hemolítica [37]. No entanto, esses parâmetros não foram estudados neste trabalho. A ocorrência de hepatomegalia inclusive no grupo controle desse estudo, torna difícil de relacioná-la como resultado dos tratamentos aplicados nos animais.

3.11 Análise Histológica, apenas para o grupo NanoGO-AM

Conforme mencionado na seção 3.9 *Imageamento, Progressão Tumoral e Metástase*, foi demonstrado que a linhagem celular 4T1-Luciferase tem comportamento metastático semelhante à linhagem celular 4T1 parental. Esta estabelece metástase nos ossos, pulmões, fígado e cérebro, órgãos primariamente afetados no carcinoma de mama humano [88]. Resultados similares foram observados neste trabalho. Análises histológicas mostraram tumor na mama e metástases no fígado, baço e pulmões, figuras 43, 44, 45 e 46. No local do tumor de mama, observou-se uma perda completa do padrão tecidual, com invasão angiolinfática apenas no grupo de TFD, figura 43. No entanto, nenhum dos grupos apresentou metástase nos linfonodos satélites, figura 47. Sendo a metástase nos demais órgãos possivelmente causada pelo extravasamento de células através dos vasos sanguíneos. Os rins não apresentaram metástase e nem alterações histológicas em nenhum dos grupos tratados 48.

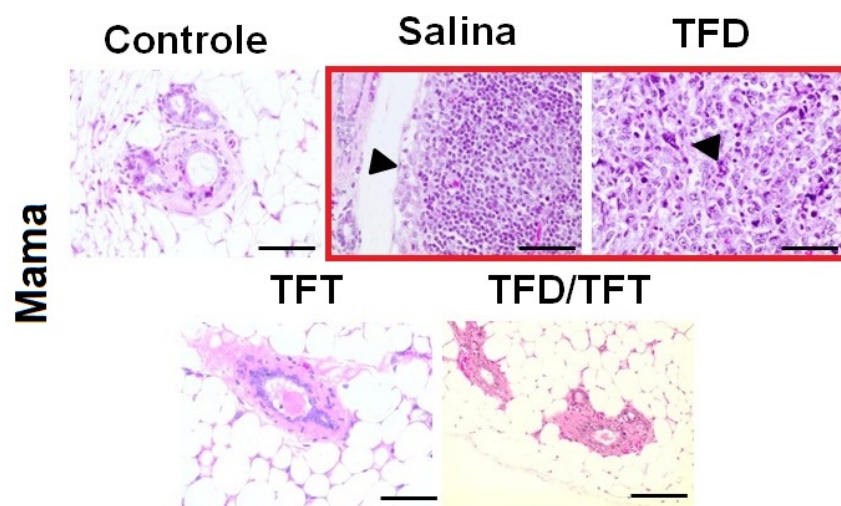


Figura 43: Presença ou ausência de tumor na mama e ablação tumoral por TFT sozinha e terapias TFD/TFT combinadas.

As cabeças de seta indicam tumor na mama (aumento de 40 vezes, barra de escala = 100 μ m).

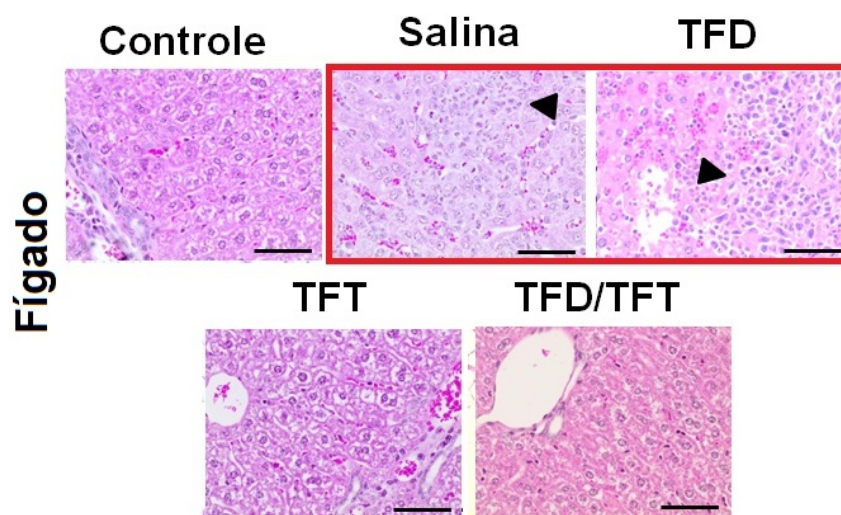


Figura 44: Prevenção de metástase no fígado no grupo TFT sozinha e terapias TFD/TFT combinadas.

As cabeças de seta indicam metástase no órgão (aumento de 40 vezes, barra de escala = 100 μ m).

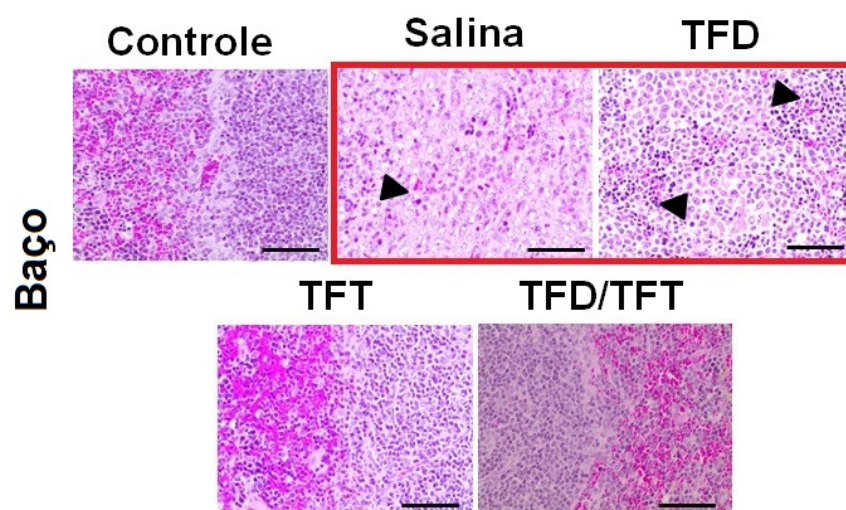


Figura 45: Prevenção de metástase no baço no grupo TFT sozinha e terapias TFD/TFT combinadas.

As cabeças de seta indicam tumor na mama ou metástase em diferentes órgãos (aumento de 40 vezes, barra de escala = 100 μm).

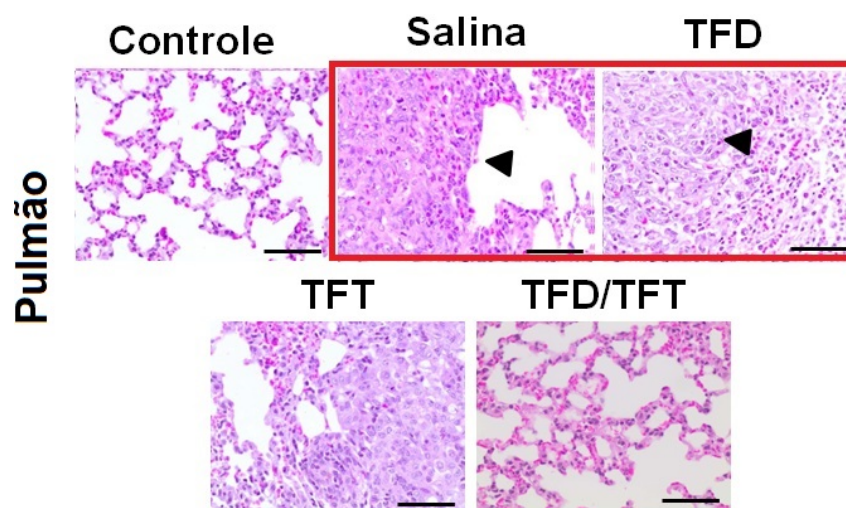


Figura 46: Prevenção de metástase no pulmão apenas no grupo das terapias TFD/TFT combinadas.

As cabeças de seta indicam metástase nos órgãos (aumento de 40 vezes, barra de escala = 100 μm).

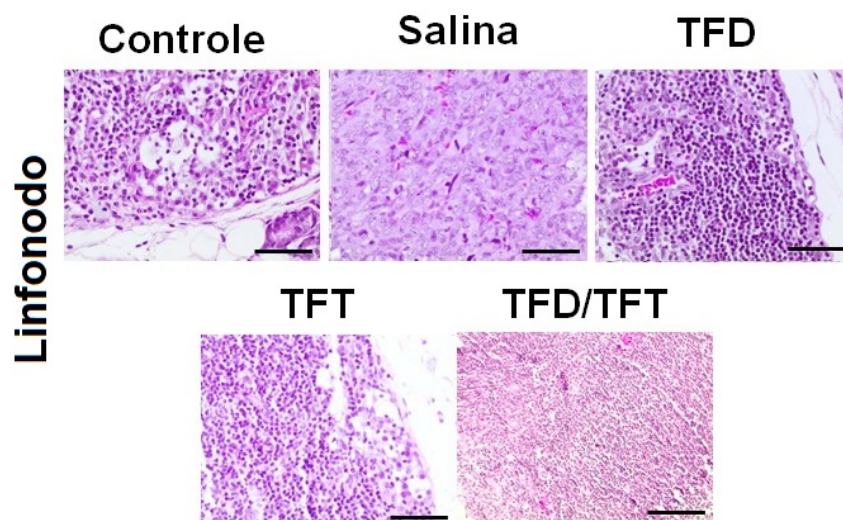


Figura 47: Ausência de metástase nos linfonodos dos animais dos grupos controle ou tratados com TFD ou TFT e terapias TFD/TFT combinadas. Aumento de 40 vezes, barra de escala = 100 μ m.

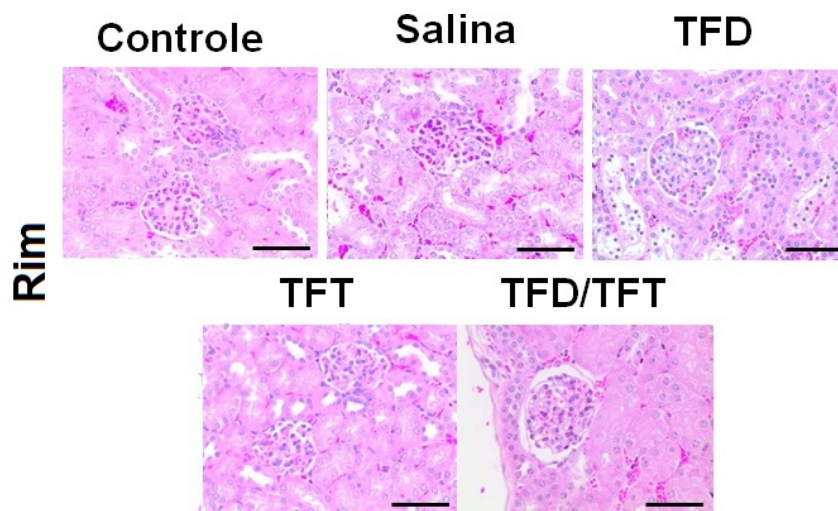


Figura 48: Ausência de metástase nos rins dos animais dos grupos controle ou tratados com TFD ou TFT e terapias TFD/TFT combinadas. Aumento de 40 vezes, barra de escala = 100 μ m.

Neste estudo, a TFD/TFT combinadas promoveram ablação do tumor primário e interromperam sua progressão. Além disso, a ocorrência de metástase pareceu impedida após a administração combinada das fototerapias. Contrariamente, o grupo controle salina e TFD apresentaram metástases avançadas no fígado, baço e pulmões, figuras 44, 45 e 46. O tratamento para TFT mostrou-se eficiente na ablação tumoral, ainda que com o indicativo de metástase pulmonar devido à presença de um tumor sólido de 2 mm, não

mostrado. Os grupos TFD, TFT e TFD/TFT combinadas apresentaram necrose difusa no local do tumor, o que pode ser um sinal de eficácia da terapia [11].

3.12 Análise Imunohistoquímica de Proliferação e Apoptose Celular, apenas para o grupo NanoGO-AM

Para verificar a não ocorrência de metástase no grupo NanoGO-AM TFD/TFT combinadas, conforme observado nas imagens de bioluminescência (figura 36), gráfico de bioluminescência total (figura 37A) e análise histológica (figuras 43, 44, 45, 46, 47 e 48), lâminas histológicas foram tratadas para a possível imunodeteção de células apoptóticas (TUNEL) e células em proliferação (PCNA). Na figura 49A, as células amarronzadas marcadas para TUNEL revelaram diferentes níveis de células apoptóticas para os diversos grupos. No grupo controle salina, a presença de células apoptóticas pode indicar um processo de hipóxia, seguido do bloqueio da produção de ATP, dano mitocondrial irreversível e liberação de citocromo C. A hipóxia é um fenômeno presente nos tumores sólidos, que comumente também apresentam uma heterogeneidade no suprimento de oxigênio e nutrientes, devido a vascularização deficiente [98]. Uma vez que, foi mostrado anteriormente o caráter sólido dos tumores induzidos neste estudo, o resultado de células positivas para apoptose no grupo controle salina, vai ao encontro do que é exposto na literatura [99,100]. Níveis expressivos de células apoptóticas foram observadas nos grupos apenas TFD ou apenas TFT. Há uma perda do padrão do tecido, comparado com o controle salina, e os núcleos das células parecem comprimidos e deformados, figura 49A. Resultados semelhantes puderam ser observados em estudo com modelo murino portador de tumor de células de melanoma tratadas com clorofila encapsulada em pluronic F68 como agente fotodinâmico e fototérmico [101]. O grupo TFD/TFT combinadas pode não ter apresentado marcação para células apoptóticas pela completa ablação tumoral, seguida de recuperação do local irradiado durante o período de 30 dias de acompanhamento após a última terapia combinada.

Em estudo com células de melanoma maligno, em modelo murino, a TFD com o AM foi capaz de inibir em 75% a expressão de PCNA, ou seja, a proliferação celu-

lar. Foram alcançadas reduções no volume tumoral de 99% e de 75% no peso tumoral, quando comparado com as células controle [14]. Esse estudo corrobora os resultados obtidos a partir da TFD/TFT combinadas com NanoGO-AM, os quais mostram a redução de células marcadas para PCNA, figura 49B. Embora houvessem células positivamente imunomarcadas para PCNA nos grupos tumor PBS (salina), apenas TFD e apenas TFT, na mama e nos pulmões essas células positivas para PCNA foram encontradas mesmo no tecido do animal controle sadio, figura 49B primeira coluna.

De acordo com o teste estatístico realizado, não houve significância estatística ($p>0,05$) entre os grupos ou nas diferentes técnicas ou órgãos estudados. No entanto, ficou claro que a quantidade de células coradas de marrom no grupo TFD/TFT combinadas foi menor do que nos grupos controle salina, TFD e TFT apenas, resultando em um aspecto visual semelhante ao grupo controle para mama, mesmo para técnicas TUNEL ou PCNA.

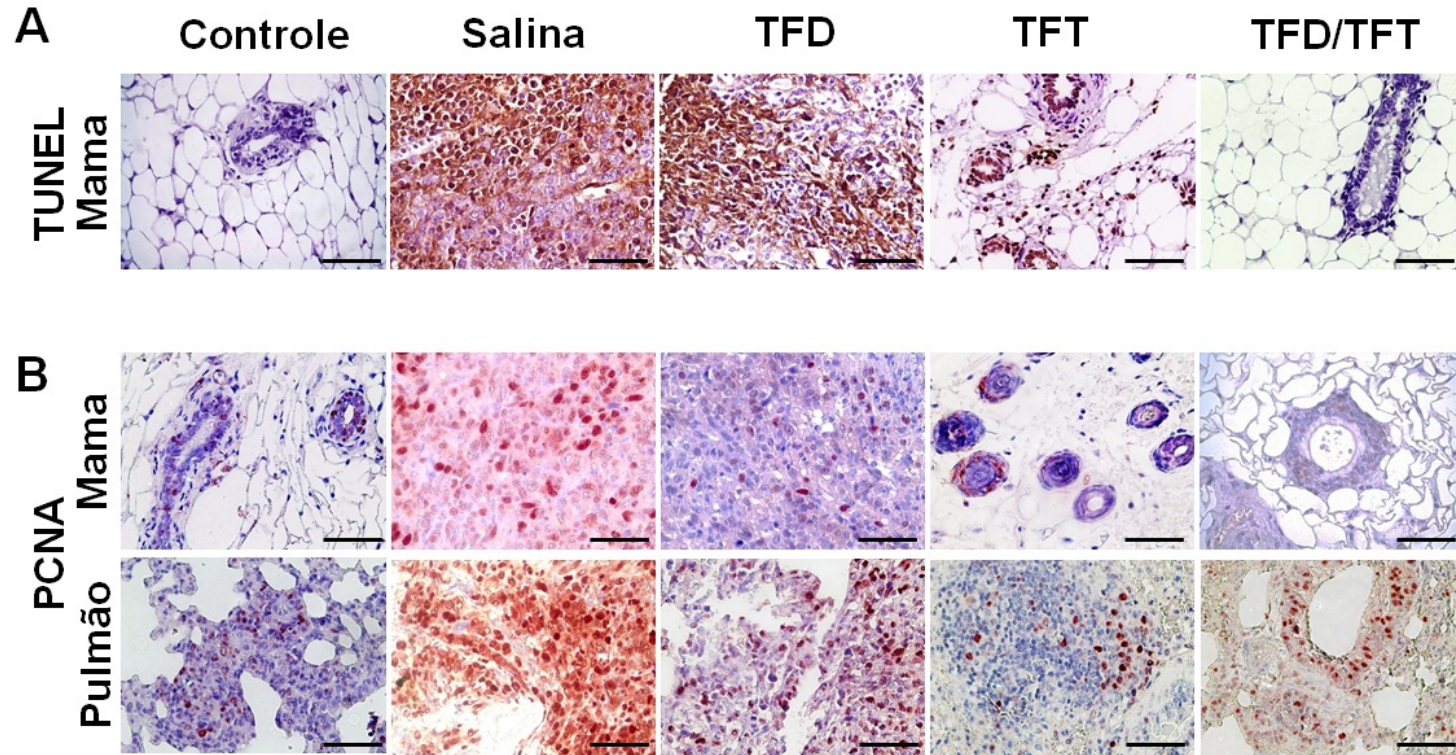


Figura 49: Detecção *in situ* da apoptose pela coloração de TUNEL no tecido mamário controle e tumoral, e imunolocalização de células positivas para PCNA nos tecidos de mama e pulmão 30 dias após o último tratamento com as fototerapias.

As células coradas de marrom representam células TUNEL e PCNA positivas. **A.** Para TUNEL, realizado apenas no tecido mamário, essas células positivas podem ser observadas principalmente no grupo controle salina, sem uma marcação expressiva de células para o grupo TFD/TFT combinadas. **B.** As células marcadas com antígeno nuclear de células em proliferação foram encontradas nos pulmões, mesmo no tecido controle. O tecido mamário apresentou maior marcação no grupo controle salina e menor nos grupos tratados com TFD, TFT e TFD/TFT combinadas. Aumento de 400x, barra de escala = 100 μ m. Não houve significância estatística entre os grupos ($p > 0,05$).

4 Conclusão

- Foi possível formular e caracterizar as nanofolhas de óxido de grafeno carboxilado com Pluronic F127 associadas ao fotossensibilizador hidrofílico azul de metileno (NanoGO-AM);
- Também foi possível formular e caracterizar as nanofolhas de óxido de grafeno com Pluronic F127 associadas ao fotossensibilizador hidrofóbico cloreto de alumínio ftalocianina (NanoGO-AlClFt);
- Obtiveram-se nanofolhas de óxido de grafeno polidispersas e estáveis, mesmo na presença dos fotossensibilizadores. O λ máximo de absorção para NanoGO-AM e NanoGO-AlClFt foi de 680 nm e 670 nm, respectivamente;
- NanoGO foi capaz de eficientemente converter luz de laser de IVP 808 nm em calor, promovendo aumento da temperatura em até 35,6 °C, mostrando-se um agente fototérmico adequado para realização de TFT;
- Confirmou-se a produção de ERO por NanoGO-AM e NanoGO-AlClFt, através de duas técnicas diferentes, sendo uma delas *in vitro*, revelando que a associação dos fotossensibilizadores às nanofolhas de óxido de grafeno não interferiu na capacidade deles em produzirem ERO e, por consequência, induzirem morte celular;
- NanoGO ou NanoGO carboxilado, na concentração de 12,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e tempo de incubação de 24 horas, apresentaram leve citotoxicidade no escuro em linhagens não tumorais humana (MCF-10A) e murina (NIH/3T3), alcançando valores de viabilidade próximos ou maiores do que 90%;

- No entanto, NanoGO ou NanoGO carboxilado, também na concentração de $12,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e tempo de incubação de 24 horas, provocaram uma redução de pouco mais de 30% na viabilidade das linhagens tumorais humana (MCF-7) e murinas (4T1 e 4T1-Luciferase);
- AM apresentou leve citotoxicidade, menos de 10% de redução na viabilidade, em linhagens humanas tumoral (MCF-7) e não tumoral (MCF-10A) e em linhagens murinas tumorais (4T1 e 4T1-Luciferase) e não tumoral (NIH/3T3) na concentração de $2,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e tempo de incubação de 24 horas;
- AlClFt apresentou leve citotoxicidade, menos de 10% de redução na viabilidade, em linhagens humanas tumoral (MCF-7) e não tumoral (MCF-10A) e em linhagens murinas tumorais (4T1 e 4T1-Luciferase) e não tumoral (NIH/3T3) na concentração de $0,312 \mu\text{M}$ e tempo de incubação de 24 horas;
- Após irradiação para TFD/TFT combinadas, a plataforma de NanoGO-AM (nas concentrações de $12,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de NanoGO e $2,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de AM, tempo de incubação de 24 horas) foi capaz de induzir morte de mais de 90% das células tumorais;
- A plataforma NanoGO-AlClft (nas concentrações de $12,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de NanoGO e $0,312 \mu\text{M}$ de AlClft, tempo de incubação de 24 horas) também foi capaz de promover morte significativa de células tumorais quando irradiada, alcançando valores de viabilidade entre 10% e 30%. Enquanto as viabilidades de células humana e murina não tumorais, mesmo após o tratamento com a nanoplataforma por 24 horas e irradiação, mantiveram-se acima de 80%;
- Foi possível observar o potencial de NanoGO-AM *in vivo* em mediar as TFD, TFT ou TFD/TFT combinadas. A total remissão do tumor de mama (4T1-Luciferase) ortotópico singênico nos camundongos fêmeas BALB/c, sem reincidência, mesmo 30 dias após o término dos tratamentos, revela NanoGO-AM como um promissor dispositivo de efeito sinérgico para realização da TFD e TFT, e potencial tratamento do carcinoma mamário;
- Apenas nos animais nos quais foram realizadas as terapias combinadas, com o uso de

NanoGO-AM, foi alcançada a prevenção de metástases no fígado e pulmões, órgãos tradicionalmente acometidos na metástase do carcinoma mamário humano. Com isso, reforça-se o efeito sinérgico das duas terapias combinadas;

- Confirmou-se que NanoGO-AIClFt *in vivo* também foi capaz de mediar as TFD e/ou TFT. No entanto, foi alcançada apenas a ablação parcial do tumor de mama, não sendo possível verificar a ocorrência ou não de reincidência, como mostrado para os grupos tratados com NanoGO-AM.

5 *Perspectivas*

- Torna-se necessário a repetição do estudo *in vivo* com NanoGO-AIClFt para uso em TFD/TFT combinadas. O uso de uma nova dose de AIClFt, ajustada para garantir uma maior eficácia na ablação do tumor, pode promover NanoGO-AIClFt a uma plataforma candidata para o tratamento do carcinoma mamário;
- Realizar nova análise clínica e histopatológica para verificar se há reincidência tumoral em estudo *in vivo* com NanoGO-AIClFt, alterando-se a concentração de AIClFt para melhores resultados;
- Realizar estudo dos padrões bioquímicos para ambos os grupos NanoGO-AM e NanoGO-AIClFt, após administração das nanoplateformas e realização das fototerapias;
- Estudar o papel do sistema imunológico na TFD e TFT combinadas mediadas por NanoGO-AM e NanoGO-AIClFt.

Referências

- [1] Rebecca L Siegel and Ahmedin Jemal Miller, Kimberly D. Cancer statistics, 2017. *CA Cancer J Clin*, 67(1):7–30, 2017.
- [2] Anil Khanal, Minh-Phuong Ngoc Bui, and Seong S Seo. Microgel-encapsulated methylene blue for the treatment of breast cancer cells by photodynamic therapy. *Journal of breast cancer*, 17(1):18–24, 2014.
- [3] Ana Maria Gonzalez-Angulo, Flavia Morales-Vasquez, and Gabriel N Hortobagyi. Overview of resistance to systemic therapy in patients with breast cancer. *Breast Cancer Chemosensitivity*, pages 1–22, 2007.
- [4] Yao Lv, Lei Tao, SW Annie Bligh, Huihui Yang, Qixia Pan, and Limin Zhu. Targeted delivery and controlled release of doxorubicin into cancer cells using a multi-functional graphene oxide. *Materials Science and Engineering C*, 59:652–660, 2016.
- [5] Abhishek Sahu, Won Il Choi, Jong Hyun Lee, and Giyoong Tae. Graphene oxide mediated delivery of methylene blue for combined photodynamic and photothermal therapy. *Biomaterials*, 34(26):6239–6248, 2013.
- [6] Yinghui Wang, Hengguo Wang, Dapeng Liu, Shuyan Song, Xiao Wang, and Hongjie Zhang. Graphene oxide covalently grafted upconversion nanoparticles for combined nir mediated imaging and photothermal/photodynamic cancer therapy. *Biomaterials*, 34(31):7715–7724, 2013.
- [7] Yan Li, Haiqing Dong, Yongyong Li, and Donglu Shi. Graphene-based nanovehicles for photodynamic medical therapy. *International Journal of Nanomedicine*, 10:2451, 2015.
- [8] Jaber Beik, Ziaeddin Abed, Fatemeh S Ghoreishi, Samira Hosseini-Nami, Saeed Mehrzadi, Ali Shakeri-Zadeh, and S Kamran Kamrava. Nanotechnology in hyperthermia cancer therapy: From fundamental principles to advanced applications. *Journal of Controlled Release*, 235:205–221, 2016.
- [9] Dennis EJGJ Dolmans, Dai Fukumura, and Rakesh K Jain. Photodynamic therapy for cancer. *Nature reviews cancer*, 3(5):380–387, 2003.

- [10] Olena Taratula, Canan Schumann, Tony Duong, Karmin L. Taylor, and Oleh Taratula. Dendrimer-encapsulated naphthalocyanine as a single agent-based theranostic nanoplatform for near-infrared fluorescence imaging and combinatorial anticancer phototherapy. *Nanoscale*, 7:3888–3902, 2015.
- [11] Dange Wang, Zhiai Xu, Haijun Yu, Xianzhi Chen, Bing Feng, Zhirui Cui, Bin Lin, Qi Yin, Zhiwen Zhang, Chunying Chen, et al. Treatment of metastatic breast cancer by combination of chemotherapy and photothermal ablation using doxorubicin-loaded dna wrapped gold nanorods. *Biomaterials*, 35(29):8374–8384, 2014.
- [12] Laura C Kennedy, Lissett R Bickford, Nastassja A Lewinski, Andrew J Coughlin, Ying Hu, Emily S Day, Jennifer L West, and Rebekah A Drezek. A new era for cancer treatment: Gold-nanoparticle-mediated thermal therapies. *Small*, 7(2):169–183, 2011.
- [13] Fei Yan, Yan Zhang, Kyu S Kim, Hsiang-Kuo Yuan, and Tuan Vo-Dinh. Cellular uptake and photodynamic activity of protein nanocages containing methylene blue photosensitizing drug. *Photochemistry and photobiology*, 86(3):662–666, 2010.
- [14] M Wagner, ER Suarez, TR Theodoro, CDAS Machado Filho, MFM Gama, JP Tardivo, FM Paschoal, and MAS Pinhal. Methylene blue photodynamic therapy in malignant melanoma decreases expression of proliferating cell nuclear antigen and heparanases. *Clinical and experimental dermatology*, 37(5):527–533, 2012.
- [15] Luis Alexandre Muehlmann, Mosar Corrêa Rodrigues, João Paulo Figueiró Longo, Mônica Pereira Garcia, Karen Rapp Py-Daniel, Aline Bessa Veloso, Paulo Eduardo Narciso de Souza, Sebastião William da Silva, and Ricardo Bentes Azevedo. Aluminium-phthalocyanine chloride nanoemulsions for anticancer photodynamic therapy development and in vitro activity against monolayers and spheroids of human mammary adenocarcinoma mcf-7 cells. *Journal of nanobiotechnology*, 13(1):36, 2015.
- [16] Olena Taratula, Mehulkumar Patel, Canan Schumann, Michael A Naleway, Addison J Pang, Huixin He, and Oleh Taratula. Phthalocyanine-loaded graphene nanoplatform for imaging-guided combinatorial phototherapy. *International journal of nanomedicine*, 10:2347, 2015.
- [17] Fatemeh Ghani, Juliane Kristen, and Hans Riegler. Solubility properties of unsubstituted metal phthalocyanines in different types of solvents. *Journal of Chemical and Engineering Data*, 57(2):439–449, 2012.
- [18] Claudine A Robertson, D Hawkins Evans, and Heidi Abrahamse. Photodynamic therapy (pdt): a short review on cellular mechanisms and cancer research applications for pdt. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 96(1):1–8, 2009.

- [19] M Wang and M Thanou. Targeting nanoparticles to cancer. *Pharmacological Research*, 62(2):90–99, 2010.
- [20] Mayra S Artiles, Chandra Sekhar Rout, and Timothy S Fisher. Graphene-based hybrid materials and devices for biosensing. *Advanced drug delivery reviews*, 63(14):1352–1360, 2011.
- [21] ACM American Cancer Society. Cancer facts & figures 2017. *Atlanta: American Cancer Society*, 2017.
- [22] Douglas Hanahan and Robert A Weinberg. Hallmarks of cancer: the next generation. *cell*, 144(5):646–674, 2011.
- [23] Anirban Sen Gupta. Nanotechnology applications in diagnosis and treatment of metastasis. *Nanomedicine*, 9(10):1517–1529, 2014.
- [24] INCA. Instituto nacional do câncer, estimativa 2016- incidência de câncer no brasil. *Ministério da Saúde*, 2017.
- [25] NIH-National Institute of Health. What you need to know about breast cancer. *National Cancer Institute- NCI*.
- [26] Robert A Smith, Kimberly S Andrews, Durado Brooks, Stacey A Fedewa, Deana Manassaram-Baptiste, Debbie Saslow, Otis W Brawley, and Richard C Wender. Cancer screening in the united states, 2017: A review of current american cancer society guidelines and current issues in cancer screening. *CA: a cancer journal for clinicians*, 67(2):100–121, 2017.
- [27] Mi Kyung Yu, Jinho Park, and Sangyong Jon. Targeting strategies for multifunctional nanoparticles in cancer imaging and therapy. *Theranostics*, 2(1):3, 2012.
- [28] Nagesh Kolishetti, Shanta Dhar, Pedro M Valencia, Lucy Q Lin, Rohit Karnik, Stephen J Lippard, Robert Langer, and Omid C Farokhzad. Engineering of self-assembled nanoparticle platform for precisely controlled combination drug therapy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(42):17939–17944, 2010.
- [29] Che-Ming Jack Hu and Liangfang Zhang. Nanoparticle-based combination therapy toward overcoming drug resistance in cancer. *Biochemical pharmacology*, 83(8):1104–1111, 2012.
- [30] Israel Silman, Esther Roth, Aviv Paz, Mathilde M Triquigneaux, Marilyn Ehrenshaft, Yechun Xu, Valery L Shnyrov, Joel L Sussman, Leesa J Deterding, Yacov Ashani, et al. The specific interaction of the photosensitizer methylene blue with acetylcholinesterase provides a model system for studying the molecular consequences of photodynamic therapy. *Chemico-biological interactions*, 203(1):63–66, 2013.

- [31] Maria C DeRosa and Robert J Crutchley. Photosensitized singlet oxygen and its applications. *Coordination Chemistry Reviews*, 233:351–371, 2002.
- [32] Thomas J Dougherty. Photodynamic therapy of cancer. In *OE/Fiber LASE'88*, pages 2–7. International Society for Optics and Photonics, 1989.
- [33] Thomas J Dougherty, Charles J Gomer, Barbara W Henderson, Giulio Jori, David Kessel, Mladen Korbelik, Johan Moan, and Qian Peng. Photodynamic therapy. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 90(12):889–905, 1998.
- [34] Tatsuki Okuno, Shigeki Kato, Yuriko Hatakeyama, Junnosuke Okajima, Shigenao Maruyama, Maya Sakamoto, Shiro Mori, and Tetsuya Kodama. Photothermal therapy of tumors in lymph nodes using gold nanorods and near-infrared laser light. *Journal of controlled release*, 172(3):879–884, 2013.
- [35] Jingyi Chen, Danling Wang, Jiefeng Xi, Leslie Au, Andy Siekkinen, Addie Warsen, Zhi-Yuan Li, Hui Zhang, Younan Xia, and Xingde Li. Immuno gold nanocages with tailored optical properties for targeted photothermal destruction of cancer cells. *Nano letters*, 7(5):1318–1322, 2007.
- [36] JA Jaffey, MR Harmon, NA Villani, EK Creighton, GS Johnson, U Giger, and JR Dodam. Long-term treatment with methylene blue in a dog with hereditary methemoglobinemia caused by cytochrome b5 reductase deficiency. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 2017.
- [37] MR Hejtmancik, MJ Ryan, JD Toft, RL Persing, PJ Kurtz, and RS Chhabra. Hematological effects in f344 rats and b6c3f1 mice during the 13-week gavage toxicity study of methylene blue trihydrate. *Toxicological Sciences*, 65(1):126–134, 2002.
- [38] Xiaoxiao He, Xu Wu, Kemin Wang, Bihua Shi, and Luo Hai. Methylene blue-encapsulated phosphonate-terminated silica nanoparticles for simultaneous in vivo imaging and photodynamic therapy. *Biomaterials*, 30(29):5601–5609, 2009.
- [39] Jiemin Guan, Xiaoping Lai, Xinna Wang, Albert Wingnang Leung, Hongwei Zhang, and Chuanshan Xu. Photodynamic action of methylene blue in osteosarcoma cells in vitro. *Photodiagnosis and photodynamic therapy*, 11(1):13–19, 2014.
- [40] Donovan Tucker, Yujiao Lu, and Quanguang Zhang. From mitochondrial function to neuroprotection-an emerging role for methylene blue. *Molecular Neurobiology*, pages 1–17, 2017.
- [41] Wei Tang, Hao Xu, Edwin J Park, Martin A Philbert, and Raoul Kopelman. Encapsulation of methylene blue in polyacrylamide nanoparticle platforms protects its photodynamic effectiveness. *Biochemical and biophysical research communications*, 369(2):579–583, 2008.

- [42] Sasidharan Swarnalatha Lucky, Khee Chee Soo, and Yong Zhang. Nanoparticles in photodynamic therapy. *Chemical reviews*, 115(4):1990–2042, 2015.
- [43] Anna Zielichowska, Jolanta Saczko, Arnold Garbiec, Magda Dubińska-Magiera, Joanna Rossowska, Paweł Surowiak, Anna Choromańska, Małgorzata Daczewska, Julita Kulbacka, and Hermann Lage. The photodynamic effect of far-red range phthalocyanines (alpc and pc green) supported by electroporation in human gastric adenocarcinoma cells of sensitive and resistant type. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 69:145–152, 2015.
- [44] Cristiano Ceron Jayme, Italo Rodrigo Calori, and Antonio Claudio Tedesco. Spectroscopic analysis of aluminum chloride phthalocyanine in binary water/ethanol systems for the design of a new drug delivery system for photodynamic therapy cancer treatment. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 153:178–183, 2016.
- [45] Artur M Pinto, Inês C Goncalves, and Fernão D Magalhães. Graphene-based materials biocompatibility: a review. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 111:188–202, 2013.
- [46] Yanwu Zhu, Shanthi Murali, Weiwei Cai, Xuesong Li, Ji Won Suk, Jeffrey R Potts, and Rodney S Ruoff. Graphene and graphene oxide: synthesis, properties, and applications. *Advanced materials*, 22(35):3906–3924, 2010.
- [47] Hong Ying Mao, Sophie Laurent, Wei Chen, Omid Akhavan, Mohammad Imani, Ali Akbar Ashkarran, and Morteza Mahmoudi. Graphene: promises, facts, opportunities, and challenges in nanomedicine. *Chemical reviews*, 113(5):3407–3424, 2013.
- [48] K. S. Novoselov, A. K. Geim, S. V. Morozov, D. Jiang, Y. Zhang, S. V. Dubonos, I. V. Grigorieva, and A. A. Firsov. Electric field effect in atomically thin carbon films. *Science*, 306(5696):666–669, 2004.
- [49] Kai Yang, Yingjie Li, Xiaofang Tan, Rui Peng, and Zhuang Liu. Behavior and toxicity of graphene and its functionalized derivatives in biological systems. *Small*, 9(9-10):1492–1503, 2013.
- [50] G Y Chen, DW P Pang, S M Hwang, H Y Tuan, and Y C Hu. A graphene-based platform for induced pluripotent stem cells culture and differentiation. *Biomaterials*, 33(2):418–427, 2012.
- [51] Liming Zhang, Jingguang Xia, Qinghuan Zhao, Liwei Liu, and Zhijun Zhang. Functional graphene oxide as a nanocarrier for controlled loading and targeted delivery of mixed anticancer drugs. *Small*, 6(4):537–544, 2010.

- [52] Zhuang Liu, Joshua T Robinson, Xiaoming Sun, and Hongjie Dai. Pegylated nano-graphene oxide for delivery of water-insoluble cancer drugs. *Journal of the American Chemical Society*, 130(33):10876–10877, 2008.
- [53] Kian Ping Loh, Qiaoliang Bao, Priscilla Kailian Ang, and Jiayang Yang. The chemistry of graphene. *Journal of Materials Chemistry*, 20(12):2277–2289, 2010.
- [54] Jingwen Li, Zhonglin Lyv, Yanli Li, Huan Liu, Jinkui Wang, Wenjun Zhan, Hong Chen, Huabing Chen, and Xinming Li. A theranostic prodrug delivery system based on pt (iv) conjugated nano-graphene oxide with synergistic effect to enhance the therapeutic efficacy of pt drug. *Biomaterials*, 51:12–21, 2015.
- [55] Muhammad Sajid Hamid Akash and Kanwal Rehman. Recent progress in biomedical applications of pluronic (pf127): pharmaceutical perspectives. *Journal of Controlled Release*, 209:120–138, 2015.
- [56] Elena V Batrakova and Alexander V Kabanov. Pluronic block copolymers: evolution of drug delivery concept from inert nanocarriers to biological response modifiers. *Journal of Controlled Release*, 130(2):98–106, 2008.
- [57] Kai Yang, Shuai Zhang, Guoxin Zhang, Xiaoming Sun, Shuit-Tong Lee, and Zhuang Liu. Graphene in mice: ultrahigh in vivo tumor uptake and efficient photothermal therapy. *Nano letters*, 10(9):3318–3323, 2010.
- [58] William S Hummers Jr and Richard E Offeman. Preparation of graphitic oxide. *Journal of the American Chemical Society*, 80(6):1339–1339, 1958.
- [59] Wen Zhang, Zhouyi Guo, Deqiu Huang, Zhiming Liu, Xi Guo, and Huiqing Zhong. Synergistic effect of chemo-photothermal therapy using pegylated graphene oxide. *Biomaterials*, 32(33):8555–8561, 2011.
- [60] Marcos A Gross, Maria JA Sales, Maria AG Soler, Marcelo A Pereira-da Silva, Mauro FP da Silva, and Leonardo G Paterno. Reduced graphene oxide multilayers for gas and liquid phases chemical sensing. *Rsc Advances*, 4(34):17917–17924, 2014.
- [61] Gerência de Avaliação de Segurança e Eficácia-GESEF ANVISA. Guia para a condução de estudos não clínicos de toxicologia e segurança farmacológica necessários ao desenvolvimento de medicamentos. *ANVISA*, 2(1):1–48, 2013.
- [62] Wim Van den Broeck, Annie Derore, and Paul Simoens. Anatomy and nomenclature of murine lymph nodes: Descriptive study and nomenclatory standardization in balb/cannrl mice. *Journal of immunological methods*, 312(1):12–19, 2006.
- [63] Tonghao Liu, Yanhui Li, Qiuju Du, Jiankun Sun, Yuqin Jiao, Guangming Yang, Zonghua Wang, Yanzhi Xia, Wei Zhang, Kunlin Wang, et al. Adsorption of methylene blue from aqueous solution by graphene. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 90:197–203, 2012.

- [64] Xin Ting Zheng, Xiao Qing Ma, and Chang Ming Li. Highly efficient nuclear delivery of anti-cancer drugs using a bio-functionalized reduced graphene oxide. *Journal of colloid and interface science*, 467:35–42, 2016.
- [65] Rana Imani, Shahriar Hojjati Emami, and Shahab Faghihi. Synthesis and characterization of an octaarginine functionalized graphene oxide nano-carrier for gene delivery applications. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 17(9):6328–6339, 2015.
- [66] Omid Akhavan and Elham Ghaderi. Graphene nanomesh promises extremely efficient in vivo photothermal therapy. *Small*, 9(21):3593–3601, 2013.
- [67] Peng Huang, Cheng Xu, Jing Lin, Can Wang, Xiansong Wang, Chunlei Zhang, Xuejiao Zhou, Shouwu Guo, and Daxiang Cui. Folic acid-conjugated graphene oxide loaded with photosensitizers for targeting photodynamic therapy. *Theranostics*, 1:240, 2011.
- [68] Hejiang Zhou, Bo Zhang, Jiajia Zheng, Meifang Yu, Teng Zhou, Kai Zhao, Yanxia Jia, Xingfa Gao, Chunying Chen, and Taotao Wei. The inhibition of migration and invasion of cancer cells by graphene via the impairment of mitochondrial respiration. *Biomaterials*, 35(5):1597–1607, 2014.
- [69] Jingqin Chen, Hongyu Liu, Chubiao Zhao, Guiqi Qin, Gaina Xi, Tan Li, Xiaoping Wang, and Tongsheng Chen. One-step reduction and pegylation of graphene oxide for photothermally controlled drug delivery. *Biomaterials*, 35(18):4986–4995, 2014.
- [70] RR Allison, HC Mota, Vanderlei Salvador Bagnato, and CH Sibata. Bio-nanotechnology and photodynamic therapy-state of the art review. *Photodiagnosis and photodynamic therapy*, 5(1):19–28, 2008.
- [71] Pingyu Zhang, Jinquan Wang, Huaiyi Huang, Bole Yu, Kangqiang Qiu, Juanjuan Huang, Shutao Wang, Lei Jiang, Gilles Gasser, Liangnian Ji, et al. Unexpected high photothermal conversion efficiency of gold nanospheres upon grafting with two-photon luminescent ruthenium (ii) complexes: A way towards cancer therapy? *Biomaterials*, 63:102–114, 2015.
- [72] Ya Zhou, Hanjun Sun, Faming Wang, Jinsong Ren, and Xiaogang Qu. How functional groups influence the ros generation and cytotoxicity of graphene quantum dots. *Chemical Communications*, 53(76):10588–10591, 2017.
- [73] U Waiwijit, W Kandhavivorn, B Oonkhanond, T Lomas, D Phokaratkul, A Wisitsoraat, and A Tuantranont. Cytotoxicity assessment of mda-mb-231 breast cancer cells on screen-printed graphene-carbon paste substrate. *Colloids and surfaces B: Biointerfaces*, 113:190–197, 2014.
- [74] M Wojtoniszak, D Rogińska, B Machaliński, M Drozdziak, and E Mijowska. Graphene oxide functionalized with methylene blue and its performance in singlet oxygen generation. *Materials Research Bulletin*, 48(7):2636–2639, 2013.

- [75] Nasim Kashef, Mahboobeh Akbarizare, and Seyed Kamran Kamrava. Effect of sub-lethal photodynamic inactivation on the antibiotic susceptibility and biofilm formation of clinical staphylococcus aureus isolates. *Photodiagnosis and photodynamic therapy*, 10(4):368–373, 2013.
- [76] Wenjun Miao, Gayong Shim, Sangbin Lee, Soondong Lee, Yearn Seong Choe, and Yu-Kyoung Oh. Safety and tumor tissue accumulation of pegylated graphene oxide nanosheets for co-delivery of anticancer drug and photosensitizer. *Biomaterials*, 34(13):3402–3410, 2013.
- [77] Xuefeng Yan, Gang Niu, Jing Lin, Albert J Jin, Hao Hu, Yuxia Tang, Yujie Zhang, Aiguo Wu, Jie Lu, Shaoliang Zhang, et al. Enhanced fluorescence imaging guided photodynamic therapy of sinoporphyrin sodium loaded graphene oxide. *Biomaterials*, 42:94–102, 2015.
- [78] Kai Yang, Jianmei Wan, Shuai Zhang, Bo Tian, Youjiu Zhang, and Zhuang Liu. The influence of surface chemistry and size of nanoscale graphene oxide on photothermal therapy of cancer using ultra-low laser power. *Biomaterials*, 33(7):2206–2214, 2012.
- [79] Teng Zhou, Bo Zhang, Peng Wei, Yipeng Du, Hejiang Zhou, Meifang Yu, Liang Yan, Wendi Zhang, Guangjun Nie, Chunying Chen, et al. Energy metabolism analysis reveals the mechanism of inhibition of breast cancer cell metastasis by peg-modified graphene oxide nanosheets. *Biomaterials*, 35(37):9833–9843, 2014.
- [80] Vanesa C Sanchez, Ashish Jachak, Robert H Hurt, and Agnes B Kane. Biological interactions of graphene-family nanomaterials: an interdisciplinary review. *Chemical research in toxicology*, 25(1):15–34, 2011.
- [81] Bruno Henrique Vilsinski, Adriana Passarella Gerola, Junior Adalberto Enumo, Katieli da Silva Souza Campanholi, Paulo Cesar de Souza Pereira, Gustavo Braga, Noboru Hioka, Elza Kimura, André Luiz Tessaro, and Wilker Caetano. Formulation of aluminum chloride phthalocyanine in pluronic p-123 and f-127 block copolymer micelles: Photophysical properties and photodynamic inactivation of microorganisms. *Photochemistry and photobiology*, 91(3):518–525, 2015.
- [82] K Maduray, A Karsten, B Odhav, and T Nyokong. In vitro toxicity testing of zinc tetrasulfophthalocyanines in fibroblast and keratinocyte cells for the treatment of melanoma cancer by photodynamic therapy. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 103(2):98–104, 2011.
- [83] Jiangwei Tian, Lin Ding, Quanbo Wang, Yaoping Hu, Li Jia, Jun-Sheng Yu, and Huangxian Ju. Folate receptor-targeted and cathepsin b-activatable nanoprobe for in situ therapeutic monitoring of photosensitive cell death. *Analytical chemistry*, 87(7):3841–3848, 2015.

- [84] Kristina D Desmet, David A Paz, Jesse J Corry, Janis T Eells, Margaret TT Wong-Riley, Michele M Henry, Ellen V Buchmann, Mary P Connelly, Julia V Dovi, Huan Ling Liang, et al. Clinical and experimental applications of nir-led photobiomodulation. *Photomedicine and Laser Therapy*, 24(2):121–128, 2006.
- [85] Ling Tong, Yan Zhao, Terry B Huff, Matthew N Hansen, Alexander Wei, and J-X Cheng. Gold nanorods mediate tumor cell death by compromising membrane integrity. *Advanced Materials*, 19(20):3136–3141, 2007.
- [86] Kai Yang, Hua Gong, Xiaoze Shi, Jianmei Wan, Youjiu Zhang, and Zhuang Liu. In vivo biodistribution and toxicology of functionalized nano-graphene oxide in mice after oral and intraperitoneal administration. *Biomaterials*, 34(11):2787–2795, 2013.
- [87] Xiaohua Huang, Xianghong Peng, Yiqing Wang, Yuxiang Wang, Dong M Shin, Mostafa A El-Sayed, and Shuming Nie. A reexamination of active and passive tumor targeting by using rod-shaped gold nanocrystals and covalently conjugated peptide ligands. *ACS nano*, 4(10):5887–5896, 2010.
- [88] Kai Tao, Min Fang, Joseph Alroy, and G Gary Sahagian. Imagable 4t1 model for the study of late stage breast cancer. *BMC cancer*, 8(1):228, 2008.
- [89] Beth A Pulaski and Suzanne Ostrand-Rosenberg. Mouse 4t1 breast tumor model. *Current protocols in immunology*, pages 20–2, 2001.
- [90] Beth A Pulaski, David S Terman, Saleem Khan, Eric Muller, and Suzanne Ostrand-Rosenberg. Cooperativity of staphylococcal aureus enterotoxin b superantigen, major histocompatibility complex class ii, and cd80 for immunotherapy of advanced spontaneous metastases in a clinically relevant postoperative mouse breast cancer model. *Cancer research*, 60(10):2710–2715, 2000.
- [91] Beth A Pulaski and Suzanne Ostrand-Rosenberg. Reduction of established spontaneous mammary carcinoma metastases following immunotherapy with major histocompatibility complex class ii and b7. 1 cell-based tumor vaccines. *Cancer research*, 58(7):1486–1493, 1998.
- [92] Zhenhua Hu, Yawei Qu, Kun Wang, Xiaojun Zhang, Jiali Zha, Tianming Song, Chengpeng Bao, Haixiao Liu, Zhongliang Wang, Jing Wang, et al. In vivo nanoparticle-mediated radiopharmaceutical-excited fluorescence molecular imaging. *Nature communications*, 6, 2015.
- [93] Damien P Kuffler. Photobiomodulation in promoting wound healing: a review. *Regenerative medicine*, 11(1):107–122, 2016.
- [94] Manuel Bañobre-López, Antonio Teijeiro, and Jose Rivas. Magnetic nanoparticle-based hyperthermia for cancer treatment. *Reports of Practical Oncology & Radiotherapy*, 18(6):397–400, 2013.

- [95] Dev Kumar Chatterjee, Parmeswaran Diagaradjane, and Sunil Krishnan. Nanoparticle-mediated hyperthermia in cancer therapy. *Therapeutic delivery*, 2(8):1001–1014, 2011.
- [96] Seok Seon Kang, Boo-Kyung Han, Eun Young Ko, Jung-Hee Shin, Eun Yoon Cho, Jeong Eon Lee, Seok Jin Nam, and Jung-Hyun Yang. Methylene blue dye-related changes in the breast after sentinel lymph node localization. *Journal of Ultrasound in Medicine*, 30(12):1711–1721, 2011.
- [97] Alok Gupta, Nirdesh Jain, Avinash Agrawal, Arjun Khanna, and Manish Gutch. A fatal case of severe methaemoglobinemia due to nitrobenzene poisoning. *Emerg Med J*, 29(1):70–71, 2012.
- [98] JP Steinbach, H Wolburg, A Klumpp, H Probst, and M Weller. Hypoxia-induced cell death in human malignant glioma cells: energy deprivation promotes decoupling of mitochondrial cytochrome c release from caspase processing and necrotic cell death. *Cell death and differentiation*, 10(7):823, 2003.
- [99] AE Greijer and E Van der Wall. The role of hypoxia inducible factor 1 (hif-1) in hypoxia induced apoptosis. *Journal of clinical pathology*, 57(10):1009–1014, 2004.
- [100] Ataman Sendoel and Michael O Hengartner. Apoptotic cell death under hypoxia. *Physiology*, 29(3):168–176, 2014.
- [101] Maoquan Chu, Haikuo Li, Qiang Wu, Fangjie Wo, and Donglu Shi. Pluronic-encapsulated natural chlorophyll nanocomposites for in vivo cancer imaging and photothermal/photodynamic therapies. *Biomaterials*, 35(29):8357–8373, 2014.

Anexo 1

Aprovação do Comitê de Ética no

Uso Animal-UnB



Universidade de Brasília

Instituto de Ciências Biológicas
Comissão de Ética no Uso Animal

Brasília, 14 de outubro de 2015.



DECLARAÇÃO

Declaramos que o projeto intitulado "ENTREGA DE AZUL DE METILENO OU CLORETO DE ALUMÍNIO-FALOCIANINA MEDIADA POR NANOFOLHA DE ÓXIDO DE GRAFENO PARA TERAPIAS FOTODINÂMICA E FOTOTÉRMICA COMBINADAS NO TRATAMENTO DE CARCINOMA MAMÁRIO HUMANO IN VITRO E IN VIVO.", UnBDoC n.º 55692/2015, sob responsabilidade da Professora Sônia Nair Bão foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) da Universidade de Brasília. Este projeto foi aprovado para utilização de *Camundongo BALB/c: 60* e *Camundongo Nude: 60*. A presente aprovação é válida pelo período de 01/07/2015 a 01/07/2016.

Prof. Dra. Paula Diniz Galera
Coordenadora da CEUA



*Este documento se restringe à avaliação ética do projeto supracitado e não substitui outras licenças e permissões que porventura se façam necessárias.

Anexo2

Artigo Aceito para Publicação

Journal of Nanobiotechnology

RESEARCH

Nanographene Oxide-Methylene Blue as Phototherapies Platform for Breast Tumor Ablation and Metastasis Prevention in a Syngeneic Orthotopic Murine Model

Mayara Simonelly Costa dos Santos, Ana Luisa Gouvêa, Ludmilla David de Moura, Leonardo Giordano Paterno, Paulo Eduardo Narcizo de Souza, Ana Paula Bastos, Emanuel Adelino Medeiros Damasceno, Fabiane Hiratsuka Veiga-Souza, Ricardo Bentes de Azevedo and Sônia Nair Bão*.

Santos, MSC, MSc, Electron Microscopy Laboratory, Institute of Biological Sciences, University of Brasilia, Brasilia, Brazil. mayara.simonelly@gmail.com

Gouvêa, AL, UGRD, Electron Microscopy Laboratory, Institute of Biological Sciences, University of Brasilia, Brasilia, Brazil. iza_gouvea@hotmail.com

Moura, LD, MSc, Nanobiotechnology Laboratory, Institute of Biological Sciences, University of Brasilia, Brasilia, Brazil. ludmilladavidm@gmail.com

Paterno, LG, PhD, Research Laboratory in Polymer and Nanomaterials, Institute of Chemistry, University of Brasilia, Brasilia, Brazil. lpaterno@unb.br

Souza, PEN, PhD, Laboratory of Software and Instrumentation in Applied Physics and Laboratory of Electron Paramagnetic Resonance, Institute of Physics, University of Brasilia, Brasilia, Brazil. psouza@unb.br.

Bastos, AP, PhD, Embrapa Pigs and Poultry, Brazilian Agricultural Research Corporation, Santa Catarina, Brazil. bastosap@hotmail.com

Damasceno, EAM, MD, Nucleus of Pathological Anatomy, Regional Hospital of Taguatinga, Taguatinga, Brazil. damascenoemanuel@gmail.com

Veiga-Souza, FH, PhD, School of Ceilandia, University of Brasilia, Brasilia, Brazil and Laboratory of Protein Chemistry and Biochemistry, Institute of Biological Sciences, University of Brasilia, Brasilia, Brazil. fhveiga@unb.br

Azevedo, RB, PhD, Nanobiotechnology Laboratory, Institute of Biological Sciences, University of Brasilia, Brasilia, Brazil. razevedo@unb.br

*Báo, SN, PhD, Electron Microscopy Laboratory, Institute of Biological Sciences, University of Brasilia, Brasilia, Brazil. **Corresponding Author:** Sônia Nair Báo (snbao@unb.br)

Tel +556131073122

Abstract

Background: In the photodynamic therapy (PDT), the photosensitizer absorbs light and transfers the energy of the excited state to the oxygen in the cell environment producing reactive oxygen species (ROS), that in its turn, may cause cell damage. In the photothermal therapy (PTT), light also is responsible for activating the photothermal agent, which converts the absorbed energy in heat. Graphene oxide is a carbon-based material that presents photothermal activity. Its physical properties allow the association with the photosensitizer methylene blue and consequently the production of ROS when submitted to light irradiation. Therefore, the association between nanographene oxide and methylene blue could represent a strategy to enhance therapeutic actions. In this work, we report the nanographene oxide-methylene blue platform (NanoGO-MB) used to promote tumor ablation in combination with photodynamic and photothermal therapies against a syngeneic orthotopic murine breast cancer model.

Results: *In vitro*, NanoGO-MB presented 50% of the reactive oxygen species production compared to the free MB after LED light irradiation, and a temperature increase of ~40 °C followed by laser irradiation. On cells, the ROS production by the nanoplatform displayed higher values in tumor than normal cells. *In vivo* assays demonstrated a synergistic effect obtained by the combined PDT/PTT therapies using NanoGO-MB, which promoted complete tumor ablation in 5/5 animals. Up to 30 days after the last treatment, there was no tumor regrowth compared with only PDT or PTT groups, which displayed tumoral bioluminescence 63-fold higher than the combined treatment group. Histological studies confirmed that the combined therapies were able to prevent tumor regrowth and liver, lung and spleen metastasis. In addition, low systemic toxicity was observed in pathologic examinations of liver, spleen, lungs, and kidneys.

Conclusions: The treatment with combined PDT/PTT therapies using NanoGO-MB induced more toxicity on breast carcinoma cells than on normal cells. *In vivo*, the combined therapies

promoted complete tumor ablation and metastasis prevention while only PDT or PTT were unable to stop tumor development. The results show the potential of NanoGO-MB in combination with the phototherapies in the treatment of the breast cancer and metastasis prevention.

Keywords: Photodynamic therapy, Photothermal therapy, Graphene oxide, Photosensitizer dye, Bioluminescence, Tumor regression and Metastasis avoidance

Background

Breast cancer is the second most common cause of death in women worldwide. Its high incidence, aggressiveness, and low prognosis arouse interest in the health field [1, 2]. The currently available treatments, including surgery, radiotherapy, immunotherapy, hormonal treatment and mainly chemotherapy, may not promote complete tumor ablation, cause damage to normal cells, leading to adverse side-effects [3].

Phototherapies, such as photodynamic (PDT) and photothermal (PTT) therapies, have emerged as promising alternatives owing to their specificity, low systemic toxicity, and low invasiveness in comparison with other therapies [4–8]. In addition, it has been shown that these therapies can be used in combination with other available therapies, as well as with targeted drug delivery systems, which can be more efficient in overcoming tumors [9, 10]. To be effective, PDT needs three components, oxygen (O_2), a photosensitizer (PS) and light of specific wavelength. PS absorbs the energy of photons with a specific wavelength to create an excited state that decays to the ground state, transferring energy to O_2 molecules present in the cell environment. This changes on their electronic state to convert them into reactive oxygen species (ROS), such as singlet oxygen (1O_2), triplet oxygen (3O_2) or superoxide anion ($O_2^{\cdot-}$).

These ROS, mainly $^1\text{O}_2$, are responsible for causing damage and death in target cells due to oxidative stress [5, 11]. PTT usually uses red and near-infrared (NIR) visible light, which is near the tissue transparency window, to excite the photothermal agent [7]. In PTT, the light absorbed is converted into heat through a non-radioactive decay. The resulting hyperthermia in cells or tissues leads to tissue coagulation, irreversible cell damage and necrosis [11]. A further advantage is the restricted damage to a specific site and, therefore, the preservation of healthy tissue [12]. However, the greatest limitation of this approach is the light penetration depth in the tissues. As a result, PTT is preferably performed in smaller tumors and in which ones that remain superficial in the body. Due to this limitation, a non-depth tumor like the breast tumor is suitable to assess the efficiency of this therapy in heating the target tissue and subsequently in promote cell death [7].

Graphene is the smallest subunit of graphite. It features a one-atom thick sheet-like structure of sp^2 carbons that gives it outstanding mechanical, thermal, and optoelectronic properties [12–14]. However, due to its high hydrophobicity, it is difficult to be implemented as a diagnosis-therapy platform in biological environments. These shortcomings can be overcome by its oxidized form, known as graphene oxide (GO), which is hydrophilic and can be produced at large scale by an inexpensive oxidative exfoliation of graphite. GO is endowed with different oxygen-based functionalities, including ether, epoxy, alcohol and carboxylic acid, which may serve as anchoring sites for loading a myriad of biomedical agents, such as antibodies, PS, deoxyribonucleic acid, and radionuclides (eg copper-64) [13, 15, 16]. Furthermore, NanoGO sheets, displaying lateral dimensions below than 100 nm, absorbs strongly in the near-infrared (NIR) visible light range and has been used as a photothermal agent for cancer treatment. This additional property is also allied to its high surface area ($\sim 2630 \text{ m}^2\cdot\text{g}^{-1}$), which is suitable for loading of both hydrophilic and hydrophobic molecules as photosensitizers- which together may exhibit combined photodynamic and photothermal properties in a single biomedical nanodevice.

Furthermore, the low *in vitro* and *in vivo* toxicity makes NanoGO an excellent NIR-based PTT agent [7, 11, 15, 17].

The hydrophilic molecule methylene blue (MB) is an inexpensive dye that exhibits a wide light absorption window (600 nm to 900 nm), with a peak at 660 nm, and singlet oxygen species quantum yields of 0.52. It also presents low dark toxicity, it is FDA-approved to be used in humans in the treatment of methemoglobinemia and has been used as a promisor photosensitizer for PDT in the treatment of viruses, bacteria and cancer cells [11, 18–21]. All these properties make it a good photosensitizer for use in photodynamic therapies. Nevertheless, MB chemical modification in its inactive form, leukomethylene blue, hinders reactive oxygen species production when administered in biological systems. Thus, this barrier could be overcome by MB loading in a nanoplatfrom as GO, what could grants to MB a variety of new desirable properties such as protection against biological environment degradation, enhanced delivery, longer circulation time and bioavailability [11, 12, 22].

Previous studies have shown that NanoGO conjugated with different PS are effective PDT/PTT agents against different tumors [23, 24]. Here the tumor model comprises a murine mammary carcinoma of bioluminescent cells 4T1-Luc, which mimic tumor growth and metastasis of stage IV human breast cancer and, therefore, may be more suitable for full exploration of the nanoplatfrom NanoGO-MB as a PDT/PTT agent [11, 14, 25–27]. The present study aims to address this issue by evaluating the efficiency of a combined PDT/PTT agent based on NanoGO-MB *in vitro* and *in vivo* in a syngeneic orthotopic tumor model induced in female BALB/c mice.

Results and Discussion

Preparation and Characterization of the NanoGO-MB Platform

NanoGO was functionalized with carboxylic acid groups and loaded with MB. Table 1 presents hydrodynamic diameter (HD), polydispersity index (PDI), and zeta potential (ZP) of all GO-based samples.

Table 1. Nanomaterials properties.

Samples\Diluent	HD (nm)	PDI	Zeta Potential (mV)
GO\Water	254.4 ± 5.0	0.250 ± 0.060	-43.0 ± 1.11
NanoGO\Water	103.0 ± 0.5	0.242 ± 0.240	-41.7 ± 2.75
NanoGO-Pluronic F127\Water	122.2 ± 3.9	0.370 ± 0.320	-36.5 ± 0.90
NanoGO-MB (0.22 µm-filtered)\Water	112.5 ± 8.45	0.319 ± 0.340	-46.2 ± 1.12

Abbreviations: GO, graphene oxide; NanoGO, nanographene oxide; MB, methylene blue; HD, hydrodynamic diameter; PDI, polydispersity index.

In brief, the starting material, GO (Table 1), exhibits HD of 254.4 ± 5.0 nm, PDI of 0.250 ± 0.060, and zeta potential of -43.0 ± 1.1 mV. After the carboxylation process and ultrasonic stirring, the HD was reduced reaching the size of 103.0 ± 0.5 nm (Table 1). In addition, the as-produced NanoGO displays a negative zeta potential. The addition of Pluronic F127 leads to a slight increase of HD and of the zeta potential, which turned less negative. Finally, the NanoGO-MB sample exhibited HD of 112.5 ± 8.45 nm and zeta potential of -46.2 ± 1.12 mV (Table 1). As described elsewhere, Pluronic F127 acts partially masking the negative surface charges of the NanoGO [11]. Pluronic F127 interacts with the NanoGO via hydrophobic interactions, which takes place between hydrophobic propylene oxide (PPO) blocks and remaining graphitic regions in the NanoGO sheets. The use of

Pluronic F127 is to ensure the colloidal stability of the NanoGO-MB platform and also to provide sufficient biocompatibility with the physiological medium. Despite the hydrophobic nature of PPO blocks in Pluronic, MB is not expected to interact with it as stronger as it does with NanoGO. Actually, at the physiological condition tested (PBS, pH 7.4) methylene blue (MB) interacts with graphene oxide mainly through electrostatic interactions, since MB is in its cationic form while NanoGO is anionic due to carboxylate groups, as confirmed by its zeta potential (-46.2 ± 1.12 mV). Nonetheless, hydrophobic pi-stacking cannot be ruled out because other authors have previously identified such an interaction in the Nano-GO/MB system [28]. The colloidal stability of different platforms, NanoGO, NanoGO+Pluronic, NanoGO-MB, and NanoGO-MB+Pluronic, prepared in different media (deionized water, phosphate buffer saline, pH=7,4, and Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) with 10% of FBS) was ascertained by measuring their hydrodynamic diameter with dynamic light scattering. The measurements were taken right after of samples preparation. The respective data are provided in the supplementary information (Supplementary Table 1). The samples prepared in DMEM showed smaller hydrodynamic diameter and, therefore, higher stability. The enlarged size of samples prepared in PBS reflects the charge screening in NanoGO by the high concentration of salts in this buffer. However, it is important to point out that the NanoGO+Pluronic+MB was used right after its preparation so that long term monitoring was not necessary.

An overview of structural and morphological features of NanoGO and NanoGO-MB can be seen in Fig. 1. In the ATR-FTIR analysis was demonstrated that the carboxylation of the GO was quite successful. The ATR-FTIR spectrum of starting GO (Fig. 1A, black) confirms the

presence of different oxygenated groups –O–H stretching (3184 cm^{-1}); –C=O stretching (1728 cm^{-1}); –C–OH bending (1423 cm^{-1}); and –C–O stretching (1043 cm^{-1}). While in the spectrum of the GO sample, the band ascribed to –C=O stretching was very weak, in the spectrum of NanoGO carboxylated (Fig. 1A, red) it was very strong, which attests to the effectiveness of the carboxylation process. The carboxylic groups added to NanoGO were in the protonated acidic form, since the –C=O stretching band peaks above 1700 cm^{-1} and the functional group at 2800 cm^{-1} corresponds to the symmetric stretching mode of –CH₂– group in chloroacetic acid, which was used during the carboxylation reaction for add carboxylic acid groups to NanoGO [29–31].

UV-vis-NIR spectra (Fig. 1B) show a significant upward shift in the background when GO was carboxylated and cut into smaller NanoGO sheets. This rise in the optical absorption of NanoGO in both visible and NIR ranges, resulting in superior photothermal heating, which is advantageous for performing PTT [32, 33]. The spectrum of MB (Fig. 1B, navy blue) exhibited the characteristic peak of the n* transition at 660 nm, which was reproduced in the spectrum of the NanoGO-MB sample (Fig. 1B, light blue) and confirmed the successful loading of MB. There was also a red shift of the n* transition to 680 nm after MB was loaded to NanoGO, probably caused by charge transfer between MB and NanoGO.

The release kinetics of MB from NanoGO (*NanoGO+Pluronic F127 at 244 $\mu\text{g/mL}$ and MB at 49 $\mu\text{g/mL}$ in ultrapure water*) was conducted using a PBS solution containing 10% FBS, figure 1C. In the first 6 hours, the amount of MB in the release solution at pH 5.0 was 12.5% and 5.5% for solution at pH 7.4. In the next time points, the amount of methylene blue released from NanoGO at pH 5.0 reached higher values when compared with pH 7.4 solution. Once the incubation time for the *in vitro* studies was 24 hours, the release kinetics was conducted until this time point. At 24 hours, 71,7% of MB was released in solution at pH 5.0, while in solution at pH 7.4 only 24,2% of the amount of MB was released. These differences in release kinetics can be a result of that in physiological pH the carboxylic acid groups from NanoGO are on their ionized form (–COO[–]), resulting in a stronger interaction with MB. However, when at pH 5.0,

these carboxylate groups become protonated (-COOH) and the interaction is weakened, resulting in a faster release of MB from NanoGO. This pH-dependent release of MB obtained in conditions that mimic *in vivo* environment shed light on the suitability of the NanoGO-MB platform and its use on tumor treatments, once these more acidic conditions can be found in the intracellular lysosomes, endosomes and in tumors and could favor the MB release in these environments [11].

The sheet-like structure of NanoGO could be identified by TEM and SEM images provided in Fig. 1D and 1E, respectively [34]. The sheets transparency was confirmed by both techniques. The *in vitro* temperature increase of the NanoGO suspension under 808 nm NIR laser light irradiation was measured by the IR thermal imaging (Fig. 1F). Ten minutes of laser irradiation was sufficient to increase the NanoGO suspension temperature by 40 °C, reaching a maximum of 62 °C (Fig. 1G). This increase was in accordance with thermal ablation hyperthermia temperatures, which should be above 47 °C [4, 35].

Singlet oxygen production is a critical step in PDT, and its production was probed by two methods, the first one was 1,3-diphenylisobenzofuran (DPBF) absorbance and the second was electron paramagnetic resonance spectroscopy (EPR) *in vitro*. In DPBF method, its absorbance decreases in the presence of ROS. Under irradiation at 660 nm, the free MB solution (10 µg.mL⁻¹) produced a significant amount of ROS, which was lowered when MB was conjugated to NanoGO (200 µg.mL⁻¹ GO, 10 µg.mL⁻¹ MB) (Fig. 1H). After 15 min of irradiation, the ROS production by NanoGO-MB was approximately 50% of that produced by free MB, which still makes the NanoGO-MB platform suitable for use in PDT studies [36].

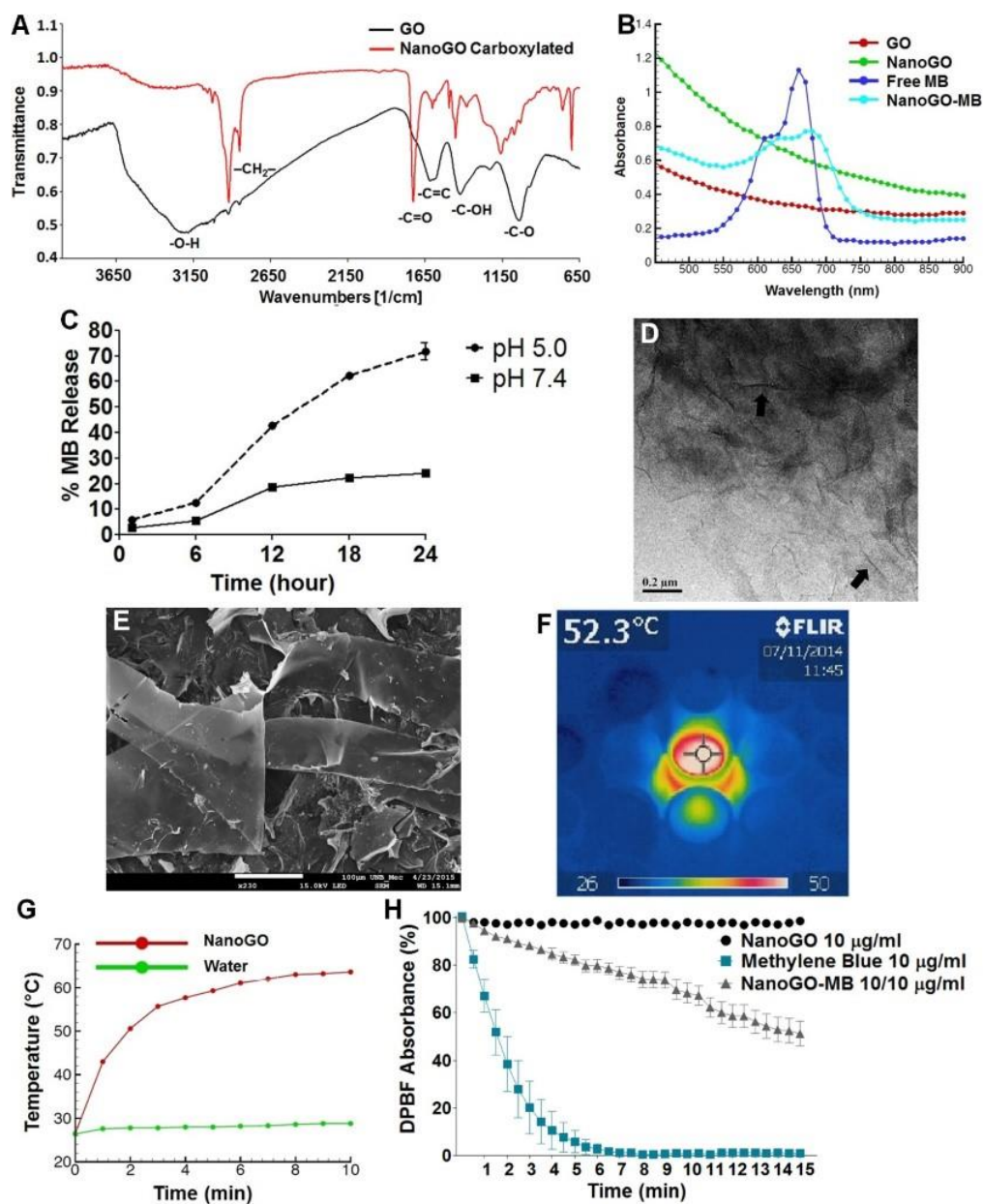


Figure 1. NanoGO and NanoGO-MB ultrastructure and characterization. **A.** Oxygenated groups of GO and carboxylated NanoGO indicated on the FTIR with the prominence of the carboxylic acid group in 1728 cm^{-1} in carboxylated GO (red), suggesting successful carboxylation. **B.** UV-Vis of samples showing the loading of MB into NanoGO sheets once its

characteristic absorption peak at ~660 nm is visible on sample NanoGO-MB. **C.** Methylene blue release kinetics from NanoGO under different pH conditions on PBS 10% FBS. The higher amount of MB released in a more acidic pH results from a weaker electrostatic interaction between the negatively charged carboxylic acid groups from NanoGO and the positively charged MB. **D.** On the TEM image, arrows indicate the boundaries of the graphene oxide nanosheets, magnification of 100,000x (scale bar = 2 μm). **E.** SEM image reveals the sheet-like shape and of GO, magnification of 230x (scale bar = 100 μm). **F.** Real time-infrared camera showing NanoGO temperature variation after irradiation with 808 nm NIR laser light. **G.** Water and graphene oxide after irradiation with 808 nm NIR laser light for 10 min (fluency of 5.52 $\text{kJ}\cdot\text{cm}^{-2}$). NanoGO temperature variation of ~40 °C. **H.** DPBF absorbance decay of free MB and NanoGO-MB upon irradiation with 660 nm LED light.

As expected, NanoGO alone produced no ROS. Nonetheless, graphene and GO are known to quench excited states. Once MB is excited, part of its energy is transferred to NanoGO instead of oxygen and, consequently, the ROS production is limited [11, 37]. Therefore, the lower ROS production by NanoGO-MB *in vitro* was expected. NanoGO-MB behavior in a biological environment, both in cells and *in vivo* assays, allowed a much higher ROS production since MB is being released from the NanoGO in an acidic environment. These findings confirm that the combination of NanoGO and MB is a suitable platform to be used as an agent in combined PDT/PTT therapy.

Cell Viability Studies and Phototoxicity of NanoGO-MB

The dark toxicity of NanoGO and free methylene blue were determined by standard MTT screening assay. Tumor and normal cells were treated for 24 h with NanoGO at concentrations of 3.1, 6.25, 12.5, 25, and 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ and free MB at 1, 2.5, 5, 10, and 20 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. NanoGO exhibits toxicity to tumor cells at all concentrations, except at 3.1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (Fig. 2A). Free MB at

concentrations of 5, 10, 20 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ was toxic to both tumor and normal cells, displaying a higher toxicity in tumor cells, ($p < 0.001$) (Fig. 2B). Such toxicity can be attributed to the faster metabolism of these cells, which increases MB uptake, as in the study of Sahu *et al.*, where they observed a higher uptake of a similar platform of NanoGO and MB by HeLa cells than by NIH/3T3 cells using confocal microscopy [11]. NanoGO-MB phototoxicity at concentrations of GO 12.5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ and MB 2.5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ were verified by a cell viability assay performed using NIH/3T3 and 4T1 cells upon irradiation (Fig. 2C). Laser-only treatment did not show any impact on normal or tumor cell viability ($p > 0.05$). Meanwhile, only LED light treatment displayed an increase in tumor cell viability ($p < 0.05$). The expressive cell viability reduction of 97% in PDT and PDT/PTT groups demonstrated the potential of the proposed therapies.

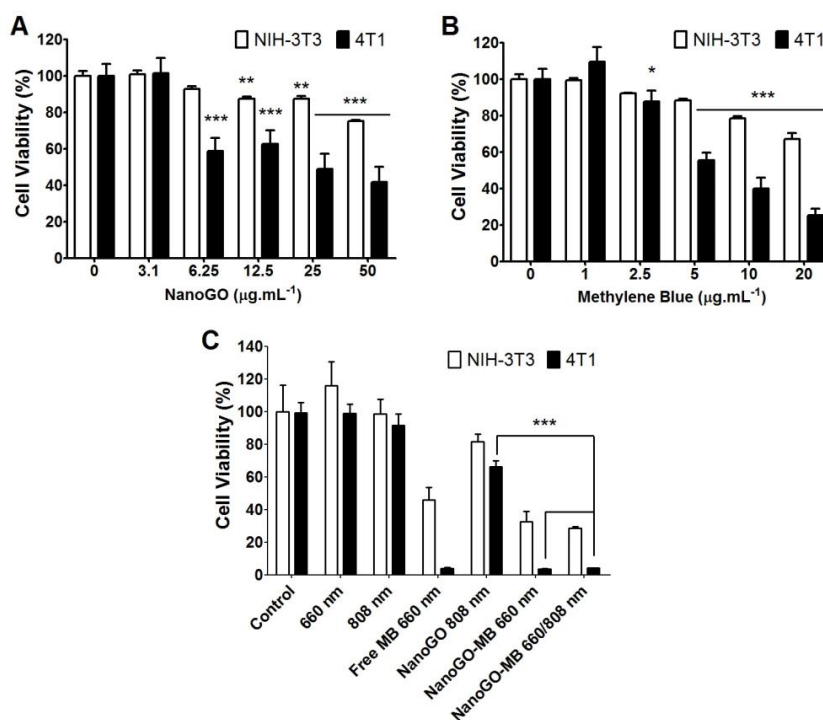


Figure 2. Viability of NIH/3T3 and 4T1 cells after treatment in the dark and upon irradiation. A. and B. NIH/3T3 and 4T1 cell viability after 24 h of exposure to NanoGO and MB in the dark, respectively. *P* values were calculated by ANOVA two-way test. **C.** Combined PDT/PTT treatments in both cell lines using NanoGO-MB (NanoGO 12.5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ and MB 2.5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) as a photodynamic and photothermal agent. *P* values were calculated by the student's *t* test. Mean \pm SD (*n* = 4) of three independent experiments, **p* < 0.05, ***p* < 0.01, ****p* < 0.001.

Here, NanoGO-MB showed the same efficiency in promoting cell death as free MB when used with PDT only or with combined PDT/PTT. There was no statistical significance between the PDT using free MB or PDT and combined PDT/PTT using NanoGO-MB (*p* > 0.05). Also, PTT only treatment presented higher cell viability than 70% for both cells studied. On the other hand, in the same study conducted by Sahu *et al*, the authors found a statistical significance between PDT and PTT only and combined PDT/PTT groups, while the present study did not find those differences (Fig. 2C) [11]. Based on the ROS production experiment, wherein the ROS produced by free MB was 5 times higher than platform NanoGO-MB at 5 minutes of irradiation (Figure 1H), it was expected a higher viability decrease for the cells treated with free MB than to NanoGO-MB. However, comparing the cell death promoted by both treatments, upon 660 nm LED light irradiation, there was no statistical significance between them (*p* > 0.05), Figure 2C. Therefore, the efficiency of MB loaded NanoGO in produce ROS and, subsequently, in promoting cell death was preserved showing the potential of the nanodevice since MB ability in acting as a photodynamic agent remained intact. As above mentioned, the high efficiency of NanoGO-MB platform may be the result of the protonation of the $-\text{COO}^-$ groups on NanoGO under the influence of the more acidic intracellular environment (pH 5.0). Once that the electrostatic interactions between the $-\text{COOH}$ from NanoGO and the positively-charged MB become weak, MB is released, and the quenching process mediated by graphene oxide stops, thus, giving space to ROS production by NanoGO-MB [11, 12].

In Vitro ROS Production After Photodynamic and/or Photothermal Therapy

For ROS detection in vitro CMH spin probe was added to cells culture before irradiation. CMH readily reacts with ROS to produce stable nitroxide radical CM[•], that can be quantitatively measured by EPR. ROS production was found to be higher in tumor cells ($p < 0.001$) for PDT only. There was no statistical significance comparing groups PDT only or PTT only and PDT/PTT combined treatments for tumor cells. The ROS amount produced by NIH/3T3 and 4T1 cells was below than 40 μM for all groups, except for three groups: free MB irradiated with LED 660 nm, NanoGO-MB irradiated with LED 660 nm and NanoGO-MB irradiated with both LED 660 nm and 808 nm NIR light. In those groups, the ROS production reached values up to 41.4-fold times higher than the control. The higher ROS values for 4T1 cells in the groups free MB irradiated with LED 660 nm light and NanoGO-MB irradiated with LED 660 nm light can be due to a higher uptake of the nanoplatfrom for these cells, compared with the normal cells NIH/3T3. In addition, the similar ROS production of free MB and NanoGO-MB reveals the reestablishment of MB potential in produce ROS even when associated to NanoGO. In both cells, for combined therapies, the ROS production was not statistically significant (Figure 3).

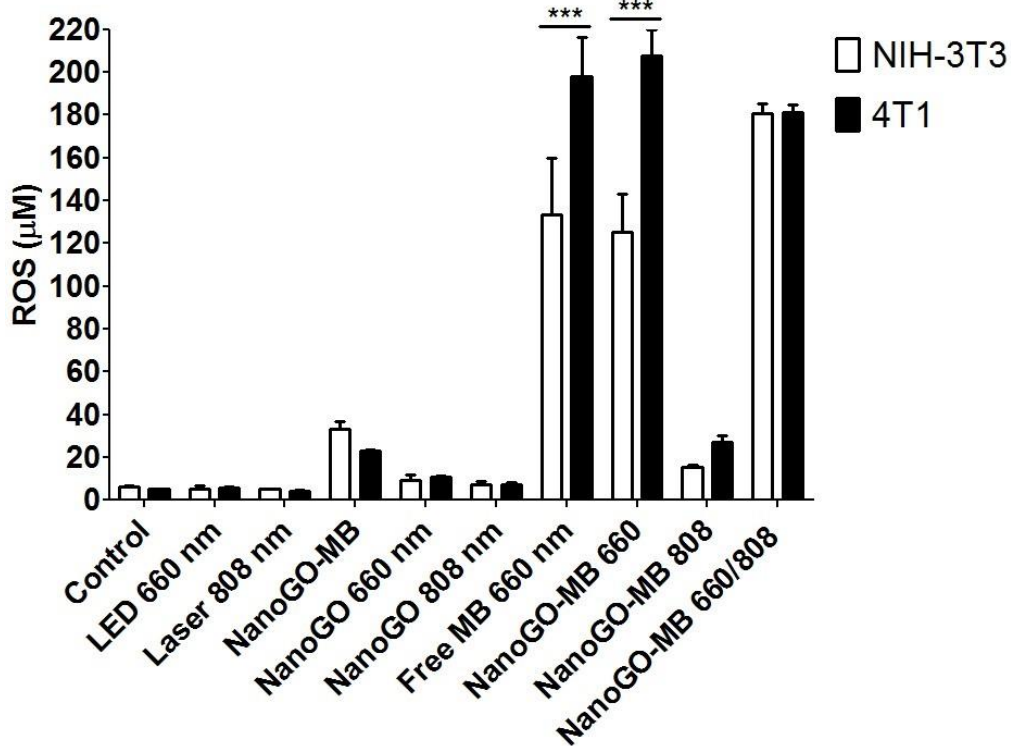


Figure 3. ROS production in NIH/3T3 and 4T1 cells after PDT only or PTT only and PDT/PTT combined treatments. A higher ROS production in micromolar was observed in tumor cells ($p < 0.001$) for PDT treatments only. There was no statistical significance comparing groups PDT or PTT only and PDT/PTT combined treatments for tumor cells. Data are represented as mean \pm SEM ($n=3$). P values were calculated by the student's t test. *** $p < 0.001$.

Combined PDT/PTT Therapies and Imaging in Orthotopic Syngeneic Model

NanoGO-MB capacity for promoting primary tumor ablation was tested upon irradiation with 660 nm LED (fluency of 90.8 J.cm^{-2}) and/or 808 nm NIR laser (fluency of 8.3 kJ.cm^{-2}) lights for 10

and 15 min, respectively (Fig. 4A). The real-time infrared camera was used to register the temperature increase on the tumor site after 3 min of irradiation of mice treated with saline or NanoGO-MB. For mice that were drug-administered and irradiated, temperatures reached up to 70 °C, as shown in Fig. 4B. Here, it was clear that the ability of NanoGO plays both the role of carrying the photosensitizer methylene blue and acts as a photothermal agent, reaching temperatures higher than 47 °C, ideal for tumor ablation [4, 35]. In mice, where there was no extravasation of NanoGO-MB during administration in solid breast tumor to the proximal tissues, such high temperatures were reached. Conversely, when NanoGO-MB appeared poorly concentrated on the tumor site, lower temperatures (between 50-70 °C) were reached. Due to the solid nature of the tumors, sometimes NanoGO-MB administration was not ideally performed.

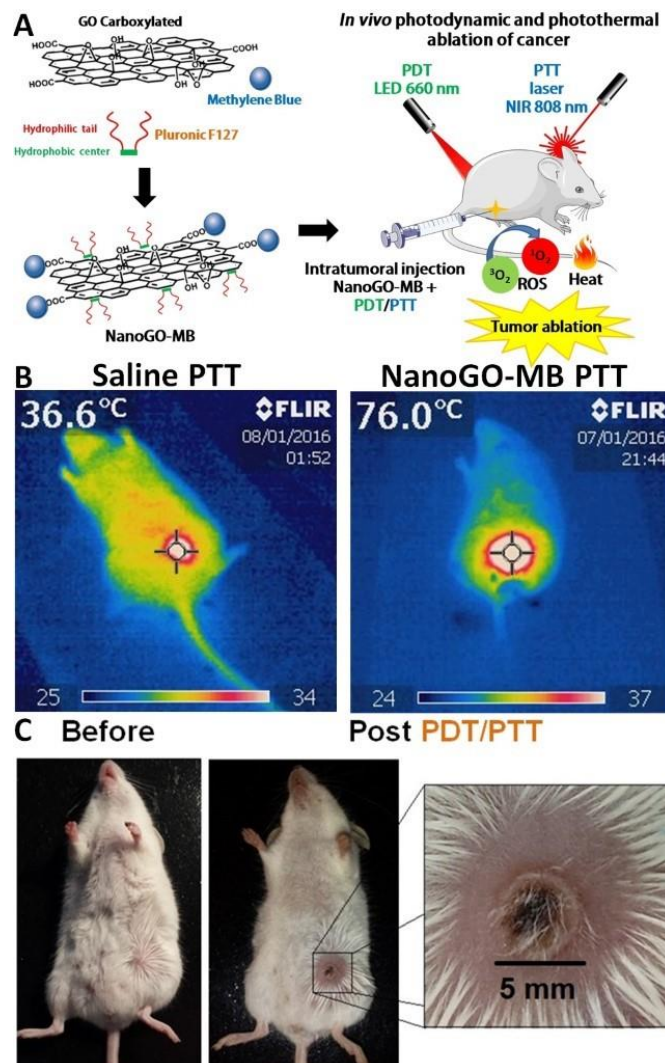


Figure 4. Combined PDT/PTT treatments and real-time thermal camera imaging. **A.** Schematic representation of phototherapies being performed after NanoGO-MB synthesis and its intratumoral administration. On both therapies, only the tumor region was exposed to the irradiation, thus the other areas were protected from the light. **B.** Real-time thermal camera imaging during PTT therapy in 4T1-Luc bearing mice showing a temperature increase of approximately 40 °C. **C.** Tumor site after combined PDT/PTT therapies. The healing tissue measured 5 mm.

The intratumoral route of administration chosen for this study was an attempt to overcome the disadvantages of tail vein i.v. injection, such as reticuloendothelial system uptake and low time blood circulation. Moreover, as suggested by Huang *et al* (2010), the preferred route of administration for phototherapies is intratumoral, because it concentrates the photothermal agent in a specific area, concentrating its effects [38, 39]. In groups that received PTT, on the following day after treatment, there was an appearance of a burn-related wound caused by irradiation (Fig. 4C). In some mice, PDT caused an inflammatory process at the irradiation site, and in the combined PDT/PTT groups, PTT seemed to aid in the healing process, promoting wound cauterization.

The 4T1-Luc cells in mice as a tumor model are able to mimic human breast cancer regarding tumor growth and metastasis. This kind of tumor represents an animal model for the late stage of disease, comparable to stage IV of human breast cancer [25–27, 40]. Also, in this study, the 4T1-Luc cells were used as an imaging tool since they emit bioluminescence, which is collected to monitor tumor progression and track treatment efficiency [41]. Compared with photodynamic or photothermal therapy only *in vivo* assays, combined PDT/PTT therapies demonstrated the synergistic effect provided by NanoGO-MB in the treatment of 4T1-Luc cell-bearing female BALB/c mice. Conversely, the *in vitro* results showed the same outcome for combined PDT/PTT therapies mediated by NanoGO-MB compared with only free MB, raising questions about the graphene oxide present in the nanoplatform. On the contrary, in the *in vivo* study, the graphene oxide nanosheets were determinant in the combined PDT/PTT therapy treatment to achieve tumor ablation without tumor regrowth after the first treatment and up to 30 days from the last treatment (Fig. 5), and metastasis prevention in major organs like liver, lungs and spleen, which did not occur in other groups what presented at least one organ affected by metastasis. In addition, low systemic toxicity was observed in pathologic examinations of liver, spleen, lungs, and kidneys.

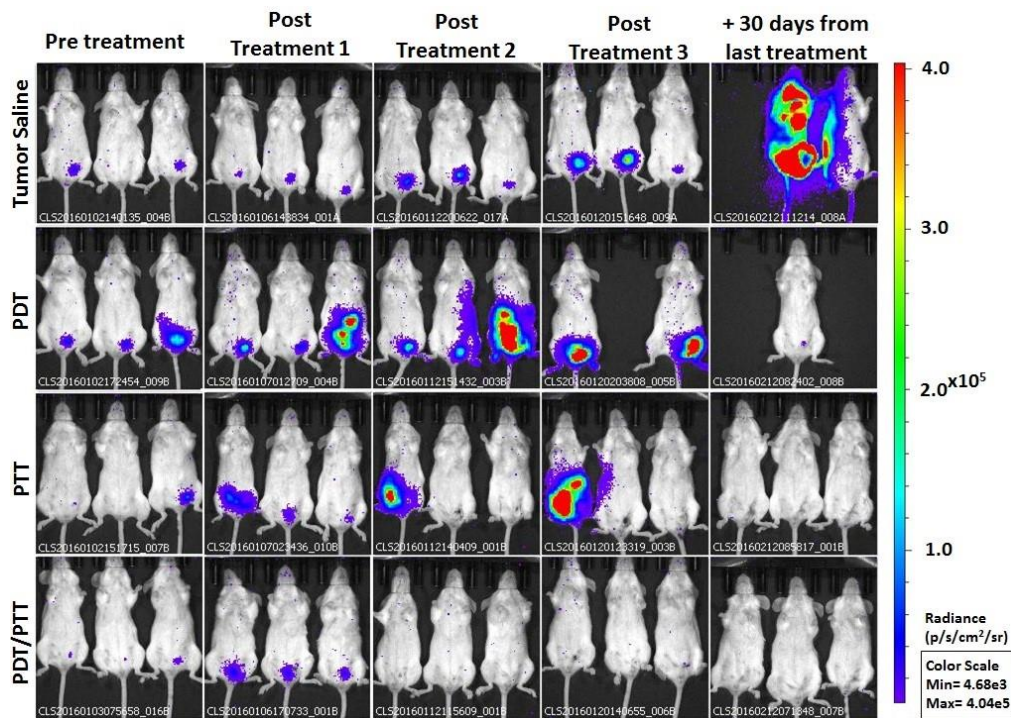


Figure 5. *In vivo* bioluminescence images. Bioluminescence signal after completion of each treatment: saline only, PDT only, PTT only and PDT/PTT combined. The bioluminescence signal reduction suggests a possible tumoral remission during the treatments on the 4T1-Luc cells-bearing BALB/c mice ($n = 5$). The bioluminescence signal increase on groups PDT only and PTT only over the three treatments displayed tumor growth and metastasis, whereas in the combined PDT/PTT treatment group there was a bioluminescence signal reduction throughout the treatments. Due to the color scale, the first animal from tumor saline group, in the column 30 days from the last treatment, had its bioluminescence signal overestimated. Control group (not shown) do not presented bioluminescence signal.

Abbreviations: PDT, photodynamic therapy (660 nm LED light); PTT, photothermal therapy (808 nm NIR laser light).

Even in the combined PDT/PTT mouse group, in which animals received two therapies, mice survived up to 30 days after the last treatment with no tumor remission, while the other groups presented metastasis in major organs and posterior death. The temperature rise caused by 808 nm NIR laser irradiation in the presence of NanoGO-MB promoted vascular permeability changes in the vessels and tissues, increasing the blood flow at the site, and partially mitigating hypoxia [4]. This led to higher tissue oxygenation and a subsequent higher ROS production in the tissue when under irradiation by 660 nm LED light, since the ROS production relies on the amount of oxygen available in the tissue, resulting in metastasis prevention and tumor regression [4]. The 4T1-Luc cell-bearing mice were randomly grouped in the following way (n = 5 for each group): control, tumor-bearing mice treated with saline, NanoGO-MB treated with 660 nm LED light, NanoGO-MB treated with 808 nm NIR laser light and NanoGO-MB treated with both 660 and 808 nm emitting sources. The groups that received only LED, only Laser and only NanoGO-MB were omitted (See Additional Figure 1). The mice have been treated a total of three times every four days, and the bioluminescence was collected on each following day.

For mice from the combined PDT/PTT group, after the first treatment, there was a decrease in the bioluminescence signal and, consequently, of the tumor size, whereas in the other groups the signal increased over the time. The sharp reduction of the bioluminescence signal in the saline, only PDT and only PTT groups after the third treatment was due to the deaths of one, three and one animal of those groups, respectively, by tumor progression (Fig. 6A). Most of the animals remained alive throughout the study period (approximately 60 days), even after the last imaging study. From the eight groups studied (n = 5), nine animals died due to tumor progression. Apart from the five animals mentioned above, the other four were from the following groups: tumor + 660 nm LED light group (three deaths) and tumor + 808 nm NIR light group (one death).

The relative tumor volume data was very similar to the bioluminescence total counts data, showing the same consistency in exhibiting no tumor regrowth after the first treatment in

the combined PDT/PTT group, whereas, in the PDT and PTT only groups, the tumor growth persisted ($p < 0.001$) (Fig. 6B). There was no statistically significant variation in mice weight between the groups during the study as can be seen in Fig. 6C. However, the mice from the combined PDT/PTT group underwent more expressive weight loss than the other ones, which may be a result of the impact of the two combined therapies on them.

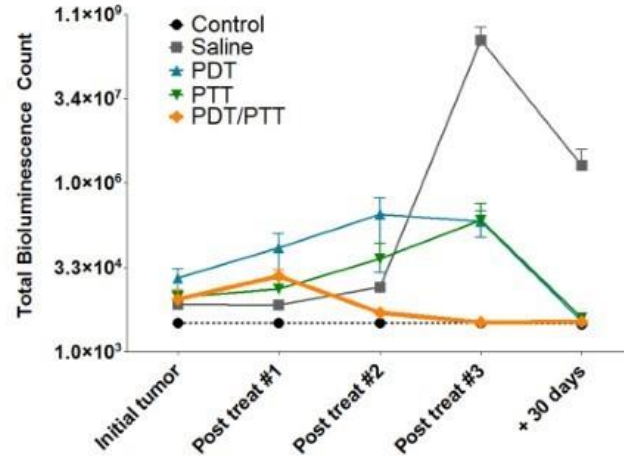
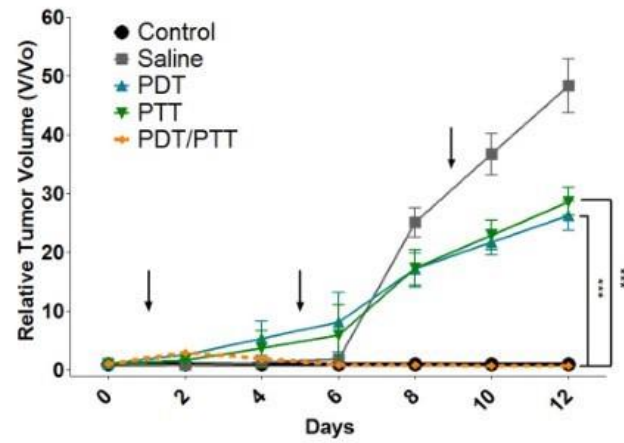
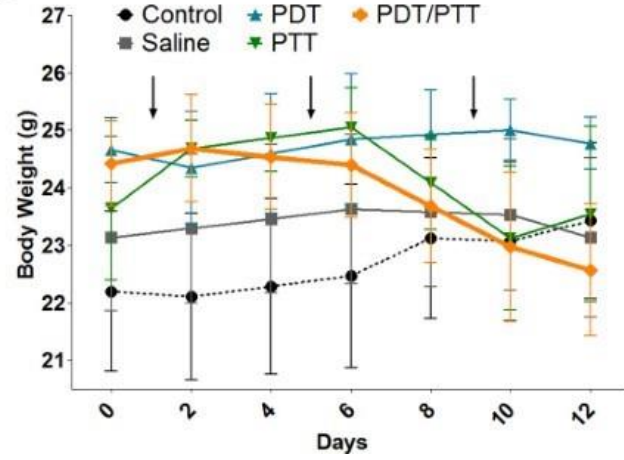
A**B****C**

Figure 6. Total bioluminescence counts, relative tumor volume and body weight assessment of treated mice. A. Tumor growth curves of different 4T1-Luc-bearing mice groups after treatments number 1, 2 and 3 (post treat #1, post treat #2 and post treat #3, respectively). The tumor volumes were normalized to their initial sizes. Statistical significance between the saline, PDT and PTT groups due to the evident reduction of bioluminescence on the combined PDT/PTT group ($n = 5$). **B.** The growth of 4T1-Luc tumors in different groups of mice during and after treatment. P value was calculated by the student's t test, $***p < 0.001$. **C.** Mean mice body weights from different groups after treatment. Arrows indicate when treatments and irradiations were performed. All data are presented as mean \pm SD.

Primary Tumor Ablation and Metastasis Prevention: Histological and Immunohistochemical Analysis

It has been shown that the 4T1-Luc cell line has metastatic behavior similar to the parental 4T1 cell line, presenting metastasis into bone, lungs, liver, and brain, organs primarily affected in human breast cancer [25]. Concordantly, the histological results showed metastasis in liver, lungs, and spleen (Fig. 7). In the breast tumor site, a complete loss of tissue pattern was observed, with angiolymphatic invasion in the PDT only group. However, none of the groups presented satellite lymph node metastasis, with the metastasis possibly moving through the blood vessels instead of lymphatic vessels. Death by metastatic breast cancer is still a major concern even with all clinical advances [1, 2].

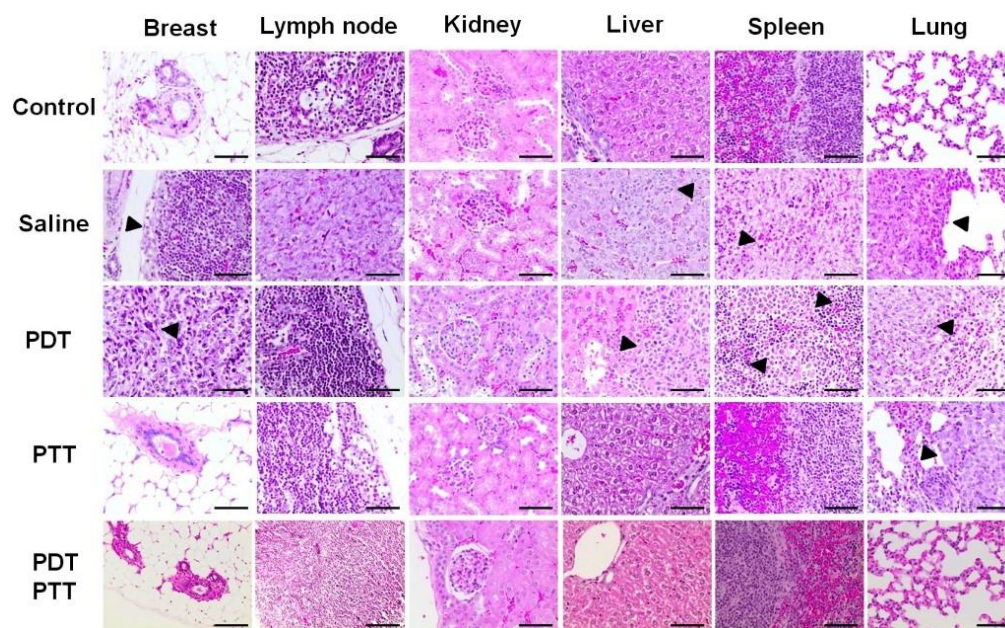


Figure 7. Tumor ablation and organs metastasis prevention. In the histological sections, total breast tumor ablation in PTT only and combined PDT/PTT therapies (with metastasis prevention in the major organs). The arrowheads indicate a tumor in the breast or metastasis in different organs (400x, scale bar = 100 μ m).

In this study, combined PDT/PTT treatment promoted primary tumor ablation and stopped its progression. In addition, metastasis appeared to be hindered after combined phototherapy administration. Conversely, the saline and PDT groups presented severe metastasis in liver, spleen, and lungs. Nevertheless, the treatment of the PTT group was efficient in promoting tumor ablation (Fig. 7). In a deeper analysis, PDT only, PTT only and combined PDT/PTT treatment groups presented necrotic cells at the tumor site, which may be a sign of therapy efficacy [42]. However, increased necrosis was found at PDT only and PTT only group when compared with combined PDT/PTT treatment groups, showing that the combined therapies provided a cleaner treatment, since necrosis is undesirable. To verify the lack of occurrence of metastasis in the combined PDT/PTT group, as seen in the

bioluminescence imaging and histological analysis, the slides were treated for immunodetection of apoptotic (TUNEL) and proliferating (PCNA) cells. In Fig. 8, the brown dye colored cells labeled for TUNEL revealed lower levels of apoptosis for groups treated with PTT only and combined PDT/PTT treatment. Although PCNA analyses in lungs revealed a high cellular proliferation rate in the saline, PDT and PTT only groups. Our analyses revealed indexes of PCNA-positive cells did not differ between treatments groups and negative control. PCNA, TUNEL and histological findings suggest that combined PDT/PTT induces a lesser morphological injury.

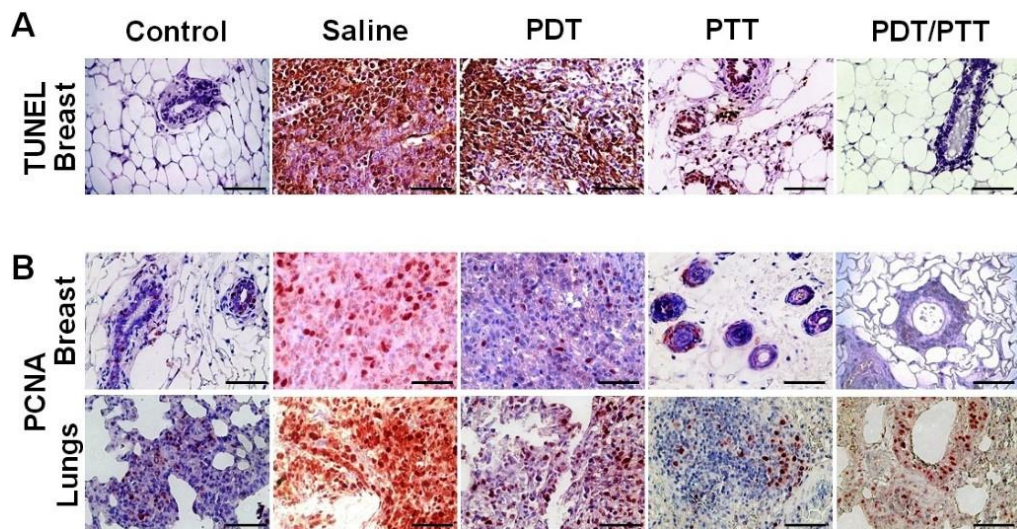


Figure 8. *In situ* apoptosis detection by TUNEL staining and immunolocalization of PCNA positive cells. The brown dye colored cells represent both TUNEL (control and tumoral breast tissues) and PCNA positive cells (breast and lung tissues). The sections were prepared 30 days from the last mice treatment with the phototherapies. **A.** For TUNEL, only in breast tissue, these positive cells can be observed mainly in the saline group without an expressive labeling of cells for the combined PDT/PTT group. **B.** Proliferating cell nuclear antigen labeled cells were natively found in lung tissue even in the control group. Breast tissue presented higher labeling in the saline group and lower in the treated

groups, PDT and PTT only and combined PDT/PTT therapies, suggesting the potential of the therapies. Magnification 400x, scale bar = 100 μm . There was no statistical significance between the groups ($p > 0.05$).

According to the statistical test performed, there was no statistical significance ($p > 0.05$) between the groups or in the different techniques or organs studied. Nevertheless, it was clear that the amount of brown dye colored cells in the combined PDT/PTT group was lower than the saline, PDT, and PTT only groups, resulting in a visual aspect similar to the control group for the breast with TUNEL or PCNA techniques.

For future studies, the delivery of a NanoGO-MB platform could be improved by a polyethylene glycol coating, which would allow graphene oxide to associate with antibodies or peptides in order to allow a tumor-targeted delivery increasing its specificity *in vivo*.

Conclusion

The developed NanoGO-MB platform has shown the capacity to promote complete tumor ablation without regrowth and with metastasis prevention upon the combined PDT/PTT in metastatic breast tumor in a murine model. Owing to the strong photoabsorption of nanographene oxide sheets and ROS production by MB, all tumors in the combined PDT/PTT therapy group were functionally defeated upon exposure to LED and NIR laser light sources. Thus, this suggests the potential of NanoGO-MB for the treatment of breast cancer in preclinical studies.

Material and methods

Materials

Graphite flakes (0.45 mm), sodium nitrate, sodium hydroxide, monochloroacetic acid, potassium permanganate, sulfuric acid (98%), hydrochloric acid (36-37%), hydrogen peroxide (30%), and methylene blue were all purchased from Sigma-Aldrich, USA, and used as received. Pluronic F127 (Mw 12,600 g.mol⁻¹) from BASF Corp. (USA) was used without additional purification. Murine fibroblasts (NIH/3T3) and murine mammary carcinoma (4T1 cells) were purchased from American Type Culture Collection (ATCC, USA) and Cell Bank of the Rio de Janeiro (Rio de Janeiro, Brazil), respectively. 4T1-Luc cells were obtained by cotransfecting 4T1 cells while using Lipofectamine PLUS with firefly luciferase-containing pGL-3-control vector and the puromycin resistance vector, pKO-puro, according to the Invitrogen (USA) protocol at Nanobiotechnology Laboratory of the University of Brasilia. Diethyldithiocarbamic acid sodium salt (DETC), deferroxamine methanesulfonate salt (DF), 1-hydroxy-3-methoxycarbonyl-2,2,5,5-tetramethylpyrrolidine (CMH), 3-carboxy-2,2,5,5-tetramethyl-1-pyrrolidinyloxy (CP*), and Krebs HEPES buffer (KHB) were purchased from Noxygen (Elzach, Germany).

Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) and Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 cell culture medium, heat-inactivated fetal bovine serum (FBS), and penicillin/streptomycin, trypsin and 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) were purchased from Gibco (NY, USA). Phosphate-buffered saline and dimethyl sulfoxide were purchased from Laborclin (Paraná, Brazil) and Sigma-Vetec (São Paulo, Brazil), respectively. All water used was the ultrapure type (18 M Ω .cm), provided by a Barnstead™Easypure™ II purification system from Thermo Scientific (CA, USA). Dialysis of NanoGO suspensions was performed with an MWCO 12 kDa cut-off dialysis bags from Sigma-Aldrich (MO, USA). A second purification step was carried out by centrifugation (5000 rpm) with

Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter Units cut-off MWCO 100 kDa, purchased from Millipore (MA, USA). PDT and PTT experiments were conducted with a setup designed and built at the Laboratory of Software and Instrumentation in Applied Physics at the University of Brasilia-UnB.

The system is provided with a 660 nm LED light and an 808 nm NIR laser light. The PDT equipment was composed of a 660 nm LED model GP-100Wr6-G42M-Z3GL, from Green Powertech Solutions Limited. The power was controlled using pulse width modulation (PWM) applied to a 480 Hz square wave. The temperature was controlled via a commercial water cooler Corsair H95 actuating as a heat sink attached to the high-power LED. The 808 nm NIR laser was driven by a DC power supply Agilent model E4356A. In both equipments, the irradiance calibration was performed using a FIELD MAX II Energy and Power meter, item # 1098580, serial # 0099L11R from Coherent, obtaining individual data from each point in the range of application.

Methods

Nano Graphene Oxide (NanoGO) Preparation

NanoGO was prepared in a four-step synthetic route, which comprised: i) preparation of graphene oxide by the Hummers and Offeman procedure [43–45] ; ii) ultrasonic exfoliation of graphitic oxide in ultrapure water to produce GO; iii) carboxylation of GO with mono chloroacetic acid and sodium hydroxide; and iv) ultrasonic stirring. Steps i) and ii) were performed according to the procedure detailed elsewhere [46]. The carboxylation step (step iii) was carried out according to the procedure described by Sahu *et al* [11]. In brief, 10 mL of GO suspension (1 mg.mL⁻¹, sodium hydroxide (200 mg; 0.005 mol) and monochloroacetic acid (150 mg; 0.0016 mol) were all mixed in a round bottom flask (125 mL), transferred to a water bath and heated at 45 °C for 4 h under magnetic stirring. The resulting suspension of carboxylated GO, or GO-

COOH, was then transferred to a dialysis bag (12000) and dialyzed against ultrapure water, for 2 days, with periodic changing of water.

After dialysis, the GO-COOH suspension was stirred with an ultrasonic probe Q700 Sonicator (QSonica, USA) at 500 W, in the pulse mode to prevent heat buildup, for 4 h in order to reduce the size of the sheets and produce NanoGO. The resulting NanoGO suspension was submitted to successive spin centrifuge filtration at 5000 rpm using an Amicon Ultra-15 MWCO 100 kDa centrifugal filter and washed with ultrapure water. This procedure was repeated several times until the suspension reached neutral pH. The neutral NanoGO suspension was submitted to an additional ultrasonic stirring step for 2 h at 500 W and then filtered through a 0.22- μm pore membrane filter to remove large aggregates. The filtered suspension was stored in a fridge at 10 °C for further characterization and biological tests.

Pluronic Stabilization of NanoGO and Methylene Blue Loading

The colloidal stability of NanoGO was improved further by mixing, with the aid of magnetic stirring, 10 mL of NanoGO suspension (0.2 mg.mL⁻¹) with 20 mg of Pluronic F127. After mixing, the homogeneous suspension was incubated at 4 °C for complete dissolution of the polymer. Shortly after, the suspension was ultrasonicated for 30 min at 500 W and incubated at 37 °C to promote adsorption of Pluronic F127 onto the NanoGO surface. Unbound free Pluronic F127 was removed by spin centrifuge filtration using an MWCO 100 kDa filter. The MB loading onto Pluronic F127-modified NanoGO was performed by addition of an MB stock solution. The mixture was then kept at 37 °C for 1 h under magnetic stirring. After 1 h, unbound free MB was removed by spin centrifuge filtration through an MWCO 100 kDa filter. The final PDT/PTT platform, called hereafter NanoGO-MB, refers to carboxylated nanographene oxide sheets associated

with Pluronic F127 and loaded with MB. The term Pluronic F127 was omitted from the name for clarification.

Structural and Morphological Characterization of NanoGO and NanoGO-MB

The electronic structures of NanoGO and NanoGO-MB, as well as confirmation of MB loading, were assessed by UV-vis absorption spectroscopy (Lambda 35 UV-vis spectrometer, PerkinElmer, USA). Absorption spectra were registered in the range of 450-900 nm with a 10-nm slit width. The effectiveness of the carboxylation reaction was evaluated by Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy. FTIR spectra were acquired with a continuum Fourier transform infrared microscope attached to the FTIR 6700 bench (Thermo Fisher, USA) in attenuated total reflection (ATR) mode (32 scans and resolution of 2 cm^{-1}). The hydrodynamic diameter and zeta potential of NanoGO samples were assessed by dynamic light scattering (DLS) and electrophoretic mobility, respectively, with a Zetasizer Nano ZS instrument (Malvern Instruments, U.K.). All measurements were carried out at $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ using ultrapure water as the solvent. NanoGO ultrastructure was analyzed by transmission electron microscopy (TEM) (JEOL JEM 1011, JEOL, Japan) at 100 kV and scanning electron microscopy (SEM) (JEOL JSM-700 1F, JEOL, Japan) at 15 kV.

Analysis of Methylene Blue Release Kinetics from NanoGO

NanoGO-MB platform (500 μL) was placed in MWCO 12 kDa cut-off dialysis bags and immersed in 25 mL of phosphate-buffered saline containing 10% of fetal bovine serum (FBS) in pH 5.0 or pH 7.4. The bags and solutions of different pH were kept at $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ in a shaking platform (100 rpm). The analysis of the MB release rate from NanoGO was carried out collecting samples at 1, 6, 12, 18 and 24 h time points. At every solution change, whole release medium was replaced by the new fresh medium. The amount of MB released from NanoGO was

assessed by measuring its absorbance at the peak of maximum absorption of 660 nm by an UV-vis spectrophotometer. A standard calibration curve with a known concentration of MB in PBS 10% FBS was used to calculate the exact concentration of the release solutions. The results were expressed in percentage of released MB comparing with the initial amount of MB added to the NanoGO suspension.

Singlet Oxygen Generation

The singlet oxygen ($^1\text{O}_2$) generation by free MB and NanoGO-MB was measured by monitoring the absorbance bleaching of the 1,3-diphenylisobenzofuran (DPBF) [22, 47]. For the assay, individual sample aliquots (200 μL) of free MB (10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), NanoGO (as a control, 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) and NanoGO-MB (200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ GO, 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ MB) were placed in a 96-well plate and 10 μL of ethanolic DPBF solution (225 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) was added to each sample. The samples' absorbance at 410 nm (DPBF max) were registered in a spectrophotometer (SpectraMax M2e, Molecular Devices, CA, USA), before and after irradiating for 30 s with 660 nm LED light (power density $\sim 150 \text{ mW.cm}^{-2}$). The results were expressed as the DPBF absorbance (%).

Photothermal Activity of NanoGO

Aliquots (200 μL) of diluted NanoGO suspension (200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) were placed in a 96-well plate and then irradiated with an 808 nm NIR laser light, with a spot size of 0.26 cm^2 and power density of 9.2 W.cm^{-2} . The plate was irradiated for ten minutes and the light-induced temperature change on water and in NanoGO suspension was monitored as a function of the irradiation elapsed time every minute by means of a type K thermocouple placed on the suspension. The thermocouple was kept away from the point of laser incidence to minimize

direct heating. The temperature change was also monitored in real-time with an infrared thermal imaging system (FLIR SC-300, FLIR Systems Inc, Danderyd, Sweden).

Dark and Phototoxicity Assays

Experiments were carried out using a normal murine fibroblast cell line (NIH/3T3) and murine mammary carcinoma cells (4T1 cells). The NIH/3T3 and 4T1 cells were cultured in DMEM and RPMI 1640 cell culture medium, respectively, containing 10% of heat-inactivated FBS and 1% antibiotic (penicillin-streptomycin) at 37 °C in an 80% humid CO₂ incubator. The cell viability under dark conditions was determined using different concentrations of the NanoGO suspension (3.1, 6.25, 12.5, 25 and 50 µg.mL⁻¹) and free MB solution (1, 2.5, 5, 10 and 20 µg.mL⁻¹) for 24 h, without LED or NIR laser light treatments. Cells (3 x 10⁴ per well) were seeded into 96-well cell culture plates and grown for 24 h at 37 °C. Afterward, cells were exposed to treatments for 24 h and were protected from light exposure. After incubation, fresh medium containing 0.5 mg.mL⁻¹ of MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) was added. Cells were further incubated for 2 h at 37 °C. Formazan crystals were solubilized with 200 µL of dimethyl sulfoxide, and the medium absorbance was measured at 595 nm using a spectrophotometer (Spectra-Max M2e, Molecular Devices, CA, USA). The same measurement procedure was repeated for samples submitted to photodynamic and/or photothermal therapy performed by irradiation for 3 min with LED and NIR laser light, respectively. Cells were seeded as previously, and 24 h later, a cell medium solution containing free MB (2.5 µg.mL⁻¹), NanoGO (12.5 µg.mL⁻¹) and NanoGO-MB (12.5 µg.mL⁻¹ of NanoGO and 2.5 µg.mL⁻¹ of MB) replaced the seeding media. The plates were incubated for 24 h to allow cell uptake. Then, without a washing step, in an attempt to simulate the *in vivo* conditions, PDT groups were treated with 660 nm LED light for 3 min (fluency of 34 J.cm⁻²), whereas PTT groups were irradiated with 808 nm NIR laser light also for 3 min (fluency of 1.65 kJ.cm⁻²). In the combined PDT/PTT group, cells were first submitted to 660 nm LED light followed by 808 nm

NIR laser light irradiation at the same treatment conditions described above. Cells were incubated for an additional 24 h and viabilities were measured by MTT assay as previously described.

***In Vitro* ROS Production After Photodynamic and/or Photothermal Therapy**

Cells NIH/3T3 and 4T1 (3×10^4 per well) were seeded into 24-well cell culture plates and grown for 24 h at 37 °C. Afterward, cells were exposed to the treatments as on the phototoxicity assay for 24 h, protected from light exposure. The ROS sensitive spin probe CMH (stock solution 10 mM prepared in KHB containing 25 μ M DF and 5 μ M DETC to minimize the oxidation of CMH by Fenton reaction due to transition metals) was added to a final concentration of 250 μ M in 600 μ L cell culture medium before the irradiation with LED 660 nm and/or 808 nm NIR laser lights. Then, the cells were irradiated for PDT or PTT only and PDT/PTT combined therapies and allowed to stand at 37C for 1 hour. After that, 450 μ L of supernatant was transferred to a 1 mL de-capped syringe and snap frozen in liquid nitrogen. All the samples were stored at -80 °C until the EPR measurements were performed. EPR measurements were performed in a Bruker spectrometer (Bruker EMXplus, Germany), equipped with an X-band (9 GHz) high sensitivity cavity (Bruker ER 4119HS, Germany). For ROS detection, the samples were transferred to a liquid nitrogen dewar (Noxygen, Germany) and the spectra were recorded at 77 K. The instrumental settings were 2 mW microwave power, 5G amplitude modulation, 100 kHz modulation frequency and 200G sweep width. The peak to peak amplitude, meaning the distance between the lowest and the highest points in the first derivative spectrum, was used for detection of the signal. A calibration curve was obtained using the nitroxide radical (CP^{*}) diluted in KHB to the following concentrations: 0, 10, 50, 100, 250 e 500 μ M. In this concentration range, a linear calibration curve was obtained and all the recorded data were within this calibration range.

***In Vivo* Photodynamic and Photothermal Therapy in a Syngeneic Orthotopic Tumor Model**

Female BALB/c mice (8 weeks old, 21-25 g) were acquired from the Institute of Energy and Nuclear Research (São Paulo, Brazil). Mice under anesthesia were orthotopically implanted with 4T1-Luc cells (2×10^4 cells in 50 μ L of DMEM medium without serum) by subcutaneous injection at a 90° angle to the nipple of the fifth left breast of each animal. Treatments started when tumors reached $\sim 25 \text{ mm}^3$.

Mice were randomly divided into the following eight experimental groups (five mice per group):

1. Control without tumor;
2. Tumor + saline;
3. Tumor + NanoGO-MB;
4. LED: tumor + 660 nm LED light;
5. Laser: tumor + 808 nm NIR laser light;
6. PDT: tumor + NanoGO-MB + 660 nm LED light;
7. PTT: tumor + NanoGO-MB + 808 nm NIR laser light; and
8. Combined PDT/PTT: tumor + NanoGO-MB + 660 nm LED light + 808 nm NIR laser light.

Only phosphate buffer saline (PBS) was administered to Groups 1 and 2. All other groups were intratumorally injected with NanoGO-MB (25 μ L, dose 10 mg.kg^{-1} of NanoGO and 2.5 mg.kg^{-1} of MB) through the mouse nipple, as detailed above. Ten minutes after the NanoGO-MB was administered, anesthetized mice received irradiation for PDT (660 nm LED light for 10 min, fluency of 90.8 J.cm^{-2}), PTT (808 nm NIR laser light for 15 min, fluency of 8.3 kJ.cm^{-2}) and combined PDT/PTT therapies for 10 and 15 min, respectively, at the tumor site. During irradiation, the non-interest regions were protected from LED and NIR laser light irradiation. For group 8, the treatment for PTT was performed after the PDT therapy. In total, each mouse

received three treatments every four days. During the NIR laser irradiation, the real-time temperature change at the tumor site was monitored by an infrared thermal imaging system. Pre and post-treatment tumor sizes were measured at specific time points by a digital caliper and calculated as volume = (tumor length) x (tumor width)²/2. The obtained value expressed as relative tumor volumes were calculated as V/V_0 (V_0 was the tumor volume when the treatment was initiated).

Progression of Tumor Growth, Metastasis and Imaging *In Vivo*

The 4T1-Luc tumor-bearing mice were monitored every four days with bioluminescence images (BLI). For this, 100 μ L of D-luciferin (10 mg.mL⁻¹, at a dose of 10 mg.kg⁻¹, PerkinElmer, USA) in PBS were intraperitoneally injected and, after 10 min, animals were imaged under anesthesia with 1.5% isoflurane in an IVIS Lumina XR *In Vivo* Imaging System (Caliper LifeSciences, USA). A total of 20 BLI (60 seconds of exposition each) were collected before and after each treatment using a field of view of 12.5 cm. The emission was collected at 560 nm with a time-correlated single photon counting system. The bioluminescence calculation was made taking into account the background removal, i.e. final bioluminescence was an equal region of interest (ROI) emitting bioluminescence signal minus the background of a different area with the same ROI size (n = 5).

Histology

Shortly after the last bioluminescence analysis (30 days from the last treatment), mice were euthanized. A full necropsy was performed, and tumors of the left breast and satellite lymph nodes, liver, lung, spleen and kidney were excised. The tissues were fixed with 4% paraformaldehyde, dehydrated in ethanol, sectioned into 5.0 μ m sections and processed for histology. Hematoxylin & Eosin staining of paraffin-embedded tissues was used for histological examination of primary tumors, organs and eventual metastasis. The sections were analyzed

and photographed using an Olympus Vanox-T microscope at 400x magnification and an Olympus U-PMTVC with CCD camera.

***In Situ* Apoptosis Detection by TUNEL Staining**

Apoptotic cell death in breast deparaffinized tissue sections was detected using terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated digoxigenin deoxyuridine nick-end labeling (TUNEL) with an ApopTagR Plus Peroxidase *In Situ* Apoptosis Kit (Chemicon, USA). Sections were treated with proteinase K (20 mg.mL⁻¹, Dako) in PBS (0.01 M, pH 7.4) for 15 min at room temperature. Endogenous peroxidase was inactivated by 3% H₂O₂ (10 min). Another blockage was performed with 6% skim milk in PBS (0.01 M, pH 7.4) for 30 min at 37 °C. Slides were incubated with the enzyme working strength TdT in a wet chamber for 1 h at 37 °C and then incubated with anti-digoxigenin for 30 min at room temperature.

Finally, sections were treated with 3,30-diaminobenzidine for 30 s and counterstained with Mayer's hematoxylin. As a negative control, a kidney section was incubated with 1.0 U.mL⁻¹ DNase, whereas for positive control a section of spleen tissue was used. Positive nuclei of apoptotic cells were identified by a dark brown color under a light microscope at 400x of magnification in ten different fields. The degree of apoptotic cells was calculated as a percentage of labeled cells.

Immunohistochemical Detection of Proliferating Cell Nuclear Antigen –

PCNA

PCNA expression in deparaffinized and rehydrated tissue sections was analyzed by immunostaining. Antigen exposure on sections was obtained by treatment for 20 min using target retrieval system (DAKO, CA, EUA). The activity of endogenous peroxidase was blocked by immersing sections in 3% hydrogen peroxide (H₂O₂) in 50% methanol. For reduction of nonspecific signals in the reaction, sections were then treated with blocking buffer (6% skim milk

in PBS, pH 7.4) for 30 min at 37 °C. Incubation of sections with the primary antibody IgG2 anti-PCNA (Dako, CA, EUA), at a dilution of 1:1300, was carried out overnight at 4 °C. For conjugation with the secondary antibody, sections were treated with EnVision-HRP (horseradish peroxidase complex) (DAKO, CA, EUA) following the manufacturer's specifications.

Sections were incubated with 3-amino-9-ethyl-carbazol (AEC) (DAKO, CA, EUA) for antibody conjugation with peroxidase, and then counterstained with Carazzi's hematoxylin, also for antibodies with peroxidase. All stained tumor sections were imaged with light microscopy under 400x magnification. The analysis consisted of quantification of positive cells per field. The degree of PCNA expression was calculated as the percentage of antibody-labeled cells.

Statistical Analysis

Analysis of variance (ANOVA) (two-way) was performed, followed by Bonferroni post-hoc test for multiple comparisons and student's t test using the software GraphPad Prism 5.0 (CA, EUA). Statistical significance was defined as * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$. Data were presented as the mean \pm standard deviation. The statistical analysis of the immunohistochemical data was performed using the software R. Normality of data was verified with the Shapiro-Wilk test, followed by data analysis using Kruskal-Wallis test.

Declarations

Ethics approval

Female BALB/c mice were handled in accordance with guidelines of the Animal Care and Use Committee of the University of Brasília - UnB (Brasilia, Brazil) project number 55692/2015.

Consent for publication

Not applicable.

Availability of data and material

The datasets used and/or analyzed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

Competing interests

We confirm that we have given due consideration to the protection of intellectual property associated with this work and that there are no impediments to publication, including the timing of publication, with respect to intellectual property. The authors disclose no potential conflicts of interest.

Funding

The author gratefully acknowledges financial support from the Brazilian Research agencies FINEP, FAPDF, CNPq, and CAPES.

Authors' contributions

MSCS was the principal investigator and took primary responsibility for the paper. MSCS, LGP, PES, RBA, and SNB participated in the design and coordination of the study. LGP conducted the graphene and nanographene oxide preparation. PES built LED and laser irradiation systems. MSCS characterized the graphene nanosheets and performed the *in vitro* assays with the help of ALG. MSCS, ALG, and LDM performed the *in vivo* assays under the coordination of RBA. APB and ED performed histological and immunohistochemical analysis and helped draft the manuscript. FHVS designed and performed the experiment for reactive oxygen species quantification and wrote the respective procedures and results related to it in the manuscript. MSCS, LGP, PEN, and SNB wrote the manuscript and all of the authors helped discuss the results, adding thoughtful insights, and approved the final manuscript.

Acknowledgments

The authors acknowledge Dr. César Romero (University of Brasília- UnB) for the assistance with the animal experiments and Dr. Jason Dearing (Boston Children's Hospital/ Harvard Medical School) for contributions in the manuscript and also the English revision.

References

1. Siegel R, Miller K, Jemal A. Cancer statistics , 2017 . CA Cancer J Clin. 2017;67:7–30.
2. Khanal A, Bui MN, Seo SS. Breast Cancer Microgel-Encapsulated Methylene Blue for the Treatment of Breast Cancer Cells by Photodynamic Therapy. J Breast Cancer. 2014;17:18–24.
3. Lv Y, Tao L, Annie Bligh SW, Yang H, Pan Q, Zhu L. Targeted delivery and controlled release of doxorubicin into cancer cells using a multifunctional graphene oxide. Mater Sci Eng C. 2016;59:652–60. doi:10.1016/j.msec.2015.10.065.
4. Beik J, Abed Z, Ghoreishi FS, Hosseini-Nami S, Mehrzadi S, Shakeri-Zadeh A, et al. Nanotechnology in hyperthermia cancer therapy: From fundamental principles to advanced applications. J Control Release. 2016;235:205–21. doi:10.1016/j.jconrel.2016.05.062.
5. Dolmans DEJGJ, Fukumura D, Jain RK. Photodynamic therapy for cancer. Nat Rev Cancer. 2003;3:380–7. doi:10.1038/nrc1071.
6. Sheng Z, Song L, Zheng J, Hu D, He M, Zheng M, et al. Protein-assisted fabrication of nano-reduced graphene oxide for combined in vivo photoacoustic imaging and photothermal therapy. Biomaterials. 2013;34:5236–43. doi:10.1016/j.biomaterials.2013.03.090.
7. Yang K, Wan J, Zhang S, Tian B, Zhang Y, Liu Z. The influence of surface chemistry and size of nanoscale graphene oxide on photothermal therapy of cancer using ultra-low laser power. Biomaterials. 2012;33:2206–14. doi:10.1016/j.biomaterials.2011.11.064.
8. Taratula O, Schumann C, Duong T, Taylor KL, Taratula O. Dendrimer-encapsulated naphthalocyanine as a single agent-based theranostic nanoplatform for near-infrared

- fluorescence imaging and combinatorial anticancer phototherapy. *Nanoscale*. 2015;7:3888–902. doi:10.1039/C4NR06050D.
9. Yan X, Hu H, Lin J, Jin AJ, Niu G, Zhang S, et al. Optical and photoacoustic dual-modality imaging guided synergistic photodynamic/photothermal therapies. *Nanoscale*. 2015;7:2520–6. doi:10.1039/C4NR06868H.
10. Shi J, Wang B, Chen Z, Liu W, Pan J, Hou L, et al. A Multi-Functional Tumor Theranostic Nanoplatfrom for MRI Guided Photothermal-Chemotherapy. *Pharm Res*. 2016;33:1–14. doi:10.1007/s11095-016-1891-7.
11. Sahu A, Choi W II, Lee JH, Tae G. Biomaterials Graphene oxide mediated delivery of methylene blue for combined photodynamic and photothermal therapy. *Biomaterials*. 2013;34:1–10. doi:10.1016/j.biomaterials.2013.04.066.
12. Wojtoniszak M, Rogińska D, Machaliński B, Drozdziak M, Mijowska E. Graphene oxide functionalized with methylene blue and its performance in singlet oxygen generation. *Mater Res Bull*. 2013;48:2636–9.
13. Liu G, Qin H, Amano T, Murakami T, Komatsu N. Direct Fabrication of the Graphene-Based Composite for Cancer Phototherapy through Graphite Exfoliation with a Photosensitizer. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2015;7:23402–6.
14. Yang K, Zhang S, Zhang G, Sun X, Lee S-TT, Liu Z. Graphene in mice: Ultrahigh in vivo tumor uptake and efficient photothermal therapy. *Nano Lett*. 2010;10:3318–23. doi:10.1021/nl100996u.
15. Yue H, Wei W, Yue Z, Wang B, Luo N, Gao Y, et al. The role of the lateral dimension of graphene oxide in the regulation of cellular responses. *Biomaterials*. 2012;33:4013–21. doi:10.1016/j.biomaterials.2012.02.021.
16. Hao Hong, Kai Yang, Yin Zhang, JonathanW. Engle, Liangzhu Feng, Yunan Yang, Tapas R. Nayak, Goel S, Bean J, Theuer CP, Barnhart TE, Liu Z, Cai W, et al. In Vivo Targeting and

- Imaging of Tumor Vasculature with Radiolabeled, Antibody-Conjugated Nanographene. *ACSNano*. 2012;6:2361–70.
17. Zhu BY, Murali S, Cai W, Li X, Suk JW, Potts JR, et al. Graphene and Graphene Oxide : Synthesis , Properties , and Applications. *Adv Mater*. 2010;:3906–24.
18. Vecchio D, Gupta A, Huang L, Landi G, Avci P, Rodas A, et al. Bacterial photodynamic inactivation mediated by methylene blue and red light is enhanced by synergistic effect of potassium iodide. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015;59:5203–12.
19. Zolfaghari PS, Packer S, Singer M, Nair SP, Bennett J, Street C, et al. In vivo killing of *Staphylococcus aureus* using a light-activated antimicrobial agent. *BMC Microbiol*. 2009;9:27. doi:10.1186/1471-2180-9-271471-2180-9-27 [pii].
20. Papin JF, Floyd RA, Dittmer DP. Methylene blue photoinactivation abolishes West Nile virus infectivity in vivo. *Antiviral Res*. 2005;68:84–7.
21. Khdair A, Gerard B, Handa H, Mao G, Shekhar MP V, Panyam J. articles Surfactant-Polymer Nanoparticles Enhance the Effectiveness of Anticancer Photodynamic Therapy. *Mol Pharm*. 2008;5:795–807.
22. He X, Wu X, Wang K, Shi B, Hai L. Methylene blue-encapsulated phosphonate-terminated silica nanoparticles for simultaneous in vivo imaging and photodynamic therapy. *Biomaterials*. 2009;30:5601–9.
23. Rong P, Yang K, Srivastan A, Kiesewetter DO, Yue X, Wang F, et al. Photosensitizer loaded nano-graphene for multimodality imaging guided tumor photodynamic therapy. *Theranostics*. 2014;4:229–39.
24. Kalluru P, Vankayala R, Chiang CS, Hwang KC. Nano-graphene oxide-mediated In vivo fluorescence imaging and bimodal photodynamic and photothermal destruction of tumors. *Biomaterials*. 2016;95:1–10.

25. Tao K, Fang M, Alroy J, Sahagian GG. Imagable 4T1 model for the study of late stage breast cancer. *BMC Cancer*. 2008;8:228. doi:10.1186/1475-2875-8-228.
26. Pulaski BA, Ostrand-Rosenberg S. Mouse 4T1 breast tumor model. *Curr Protoc Immunol*. 2001;Chapter 20:Unit 20.2.
27. Pulaski BA, Terman DS, Khan S, Muller E, Ostrand-Rosenberg S. Cooperativity of Staphylococcal aureus enterotoxin B superantigen, major histocompatibility complex class II, and CD80 for immunotherapy of advanced spontaneous metastases in a clinically relevant postoperative mouse breast cancer model. *Cancer Res*. 2000;60:2710–5.
28. Hosseinzadeh R, Khorsandi K, Hosseinzadeh G. Graphene oxide-methylene blue nanocomposite in photodynamic therapy of human breast cancer. *J Biomol Struct Dyn*. 2017;1102 June:1–8. doi:10.1080/07391102.2017.1345698.
29. Liu T, Li Y, Du Q, Sun J, Jiao Y, Yang G, et al. Adsorption of methylene blue from aqueous solution by graphene. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2012;90:197–203. doi:10.1016/j.colsurfb.2011.10.019.
30. Zheng XT, Ma XQ, Li CM. Highly efficient nuclear delivery of anti-cancer drugs using a bio-functionalized reduced graphene oxide. *J Colloid Interface Sci*. 2016;467:35–42. doi:10.1016/j.jcis.2015.12.052.
31. Imani R, Emami SH, Faghihi S. Synthesis and characterization of an octaarginine functionalized graphene oxide nano-carrier for gene delivery applications. *Phys Chem Chem Phys*. 2015;17:6328–39. doi:10.1039/C4CP04301D.
32. Zhang W, Guo Z, Huang D, Liu Z, Guo X, Zhong H. Synergistic effect of chemo-photothermal therapy using PEGylated graphene oxide. *Biomaterials*. 2011;32:8555–61. doi:10.1016/j.biomaterials.2011.07.071.
33. Akhavan O, Ghaderi E. Graphene nanomesh promises extremely efficient in vivo photothermal therapy. *Small*. 2013;9:3593–601. doi:10.1002/smll.201203106.

34. Zhou H, Zhang B, Zheng J, Yu M, Zhou T, Zhao K, et al. The inhibition of migration and invasion of cancer cells by graphene via the impairment of mitochondrial respiration. *Biomaterials*. 2014;35:1597–607.
35. Taratula O, Patel M, Schumann C, Naleway MA, Pang AJ, He H, et al. Phthalocyanine-loaded graphene nanoplatform for imaging-guided combinatorial phototherapy. *Int J Nanomedicine*. 2015;10:2347–62.
36. Wang Y, Wang H, Liu D, Song S, Wang X, Zhang H. Graphene oxide covalently grafted upconversion nanoparticles for combined NIR mediated imaging and photothermal/photodynamic cancer therapy. *Biomaterials*. 2013;34:7715–24. doi:10.1016/j.biomaterials.2013.06.045.
37. Chen G-Y, Pang DW-P, Hwang S-M, Tuan H-Y, Hu Y-C. A graphene-based platform for induced pluripotent stem cells culture and differentiation. *Biomaterials*. 2012;33:418–27. doi:10.1016/j.biomaterials.2011.09.071.
38. Yang K, Gong H, Shi X, Wan J, Zhang Y, Liu Z. In vivo biodistribution and toxicology of functionalized nano-graphene oxide in mice after oral and intraperitoneal administration. *Biomaterials*. 2013;34:2787–95. doi:10.1016/j.biomaterials.2013.01.001.
39. Huang X, Peng X, Wang Y, Wang Y, Shin DM, El M a, et al. A Reexamination of Active and Passive Tumor Targeting by Using Rod-Shaped Gold Nanocrystals and Covalently Conjugated Peptide Ligands. *ACS Nano*. 2010;4:5887–96. doi:10.1021/nn102055s.
40. Pulaski B a, Ostrand-Rosenberg S. Reduction of Established Spontaneous Mammary Carcinoma Metastases following Immunotherapy with Major Histocompatibility Complex Class II and B7 . 1 Cell-based Tumor Vaccines Reduction of Established Spontaneous Mammary Carcinoma MÃ© tastases following. *Cancer Res*. 1998;;1486–93.
41. Hu Z, Qu Y, Wang K, Zhang X, Zha J, Song T, et al. In vivo nanoparticle-mediated radiopharmaceutical-excited fluorescence molecular imaging. *Nat Commun*. 2015;6:7560. doi:10.1038/ncomms8560.

42. Wang D, Xu Z, Yu H, Chen X, Feng B, Cui Z, et al. Treatment of metastatic breast cancer by combination of chemotherapy and photothermal ablation using doxorubicin-loaded DNA wrapped gold nanorods. *Biomaterials*. 2014;35:8374–84.
doi:10.1016/j.biomaterials.2014.05.094.
43. Kurantowicz N, Strojny B, Sawosz E, Jaworski S, Kutwin M, Grodzik M, et al. Biodistribution of a High Dose of Diamond, Graphite, and Graphene Oxide Nanoparticles After Multiple Intraperitoneal Injections in Rats. *Nanoscale Res Lett*. 2015;10:398. doi:10.1186/s11671-015-1107-9.
44. Yang K, Feng L, Hong H, Cai W, Liu Z. Preparation and functionalization of graphene nanocomposites for biomedical applications. *Nat Protoc*. 2013;8:2392–403.
doi:10.1038/nprot.2013.146.
45. Hummers WS, Offeman RE. Preparation of Graphitic Oxide. *J Am Chem Soc*. 1958;80:1339–1339. doi:10.1021/ja01539a017.
46. Gross MA, Sales MJA, Soler MAG, Pereira-da-Silva MA, da Silva MFP, Paterno LG. Reduced graphene oxide multilayers for gas and liquid phases chemical sensing. *RSC Adv*. 2014;4:17917–24. doi:10.1039/C4RA01469C.
47. Shibu ES, Hamada M, Murase N, Biju V. Nanomaterials formulations for photothermal and photodynamic therapy of cancer. *J Photochem Photobiol C Photochem Rev*. 2013;15:53–72.
doi:10.1016/j.jphotochemrev.2012.09.004.

Additional file

File name: Additional file 1

File format: .doc

Title of data: Supplementary Table 1 Nanomaterials Colloidal Stability and Properties

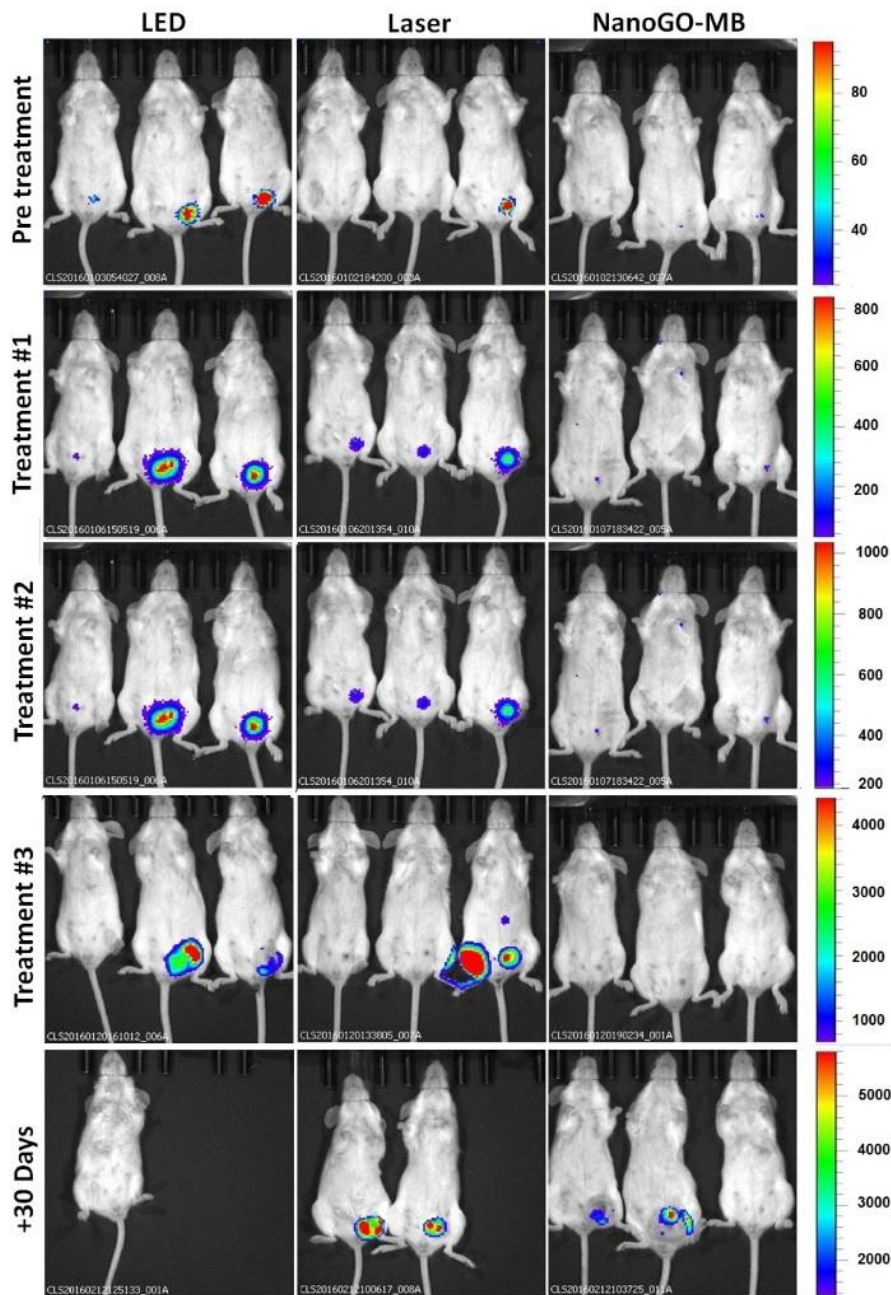
Sample/ Diluent	DH (nm)	PDI
NanoGO/water	200.08 ± 2.61	0.328 ± 0.02
NanoGO/PBS	1353.33 ± 156.84	0.495 ± 0.15
NanoGO/DMEM	363.60 ± 10.90	1.00 ± 0.00
NanoGO/RPMI	123.00 ± 3.90	0.64 ± 0.14
NanoGO Pluronic F127/water	188.93 ± 3.59	0.300 ± 0.03
NanoGO Pluronic F127/PBS	1096.33 ± 60.47	0.269 ± 0.05
NanoGO Pluronic F127/DMEM	112.71 ± 16.59	0.820 ± 0.16
NanoGO Pluronic F127/RPMI	104.4 ± 1.35	0.70 ± 0.01
NanoGO MB/water	10473.00 ± 7879.06	0.571 ± 0.42
NanoGO MB/PBS	868.50 ± 314.62	0.183 ± 0.11
NanoGO MB/DMEM	79.10 ± 54.21	0.370 ± 0.07
NanoGO MB/RPMI	30.50 ± 8.43	0.645 ± 0.14
NanoGO Pluronic F127 MB/water	4733.33 ± 1491.64	0.826 ± 0.15
NanoGO Pluronic F127 MB/PBS	5436.00 ± 1655.20	0.732 ± 0.23
NanoGO Pluronic F127 MB/DMEM	137.57 ± 41.19	0.401 ± 0.05
NanoGO Pluronic F127 MB/RPMI	224.27 ± 34.19	0.716 ± 0.17

Description of data: The colloidal stability of different platforms, NanoGO, NanoGO+Pluronic, NanoGO-MB, and NanoGO-MB+Pluronic, prepared in different media (deionized water, phosphate buffer saline, pH=7,4, and Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) with 10% of FBS was ascertained by measuring their hydrodynamic diameter with dynamic light scattering. The measurements were taken after right after of samples preparation.

File name: Additional file 2

File format: .doc

Title of data: Bioluminescence images of LED or NIR laser light irradiation only and NanoGO-MB only treated groups.



Description of data: The increase in the bioluminescence signal indicates tumoral progression and the absence of some 4T1-Luc-bearing mice during the treatments means the death of these individuals during the experiment.