

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

MAITÊ CEVALLOS MIJAN

TERAPIA FOTODINÂMICA MEDIADA POR ALUMÍNIO-CORO-FALOCIANINA
EM FORMULAÇÃO LIPOSSOMAL NO TRATAMENTO DE CÂNCER DE MAMA IN
VITRO E IN VIVO: MECANISMOS DE AÇÃO E PERFIL IMUNOESTIMULATÓRIO.

Dissertação apresentada como requisito parcial
para a obtenção do Título de Mestre em
Ciências da Saúde pelo Programa de Pós-
Graduação em Ciências da Saúde da
Universidade de Brasília.

Orientador: Ricardo Bentes de Azevedo

Brasília

2012

MAITÊ CEVALLOS MIJAN

TERAPIA FOTODINÂMICA MEDIADA POR ALUMÍNIO-CORO-FALOCIANINA
EM FORMULAÇÃO LIPOSSOMAL NO TRATAMENTO DE CÂNCER DE MAMA IN
VITRO E IN VIVO: MECANISMOS DE AÇÃO E PERFIL IMUNOESTIMULATÓRIO.

Dissertação apresentada como requisito parcial
para a obtenção do Título de Mestre em
Ciências da Saúde pelo Programa de Pós-
Graduação em Ciências da Saúde da
Universidade de Brasília.

Aprovado em Brasília, 24 de fevereiro de 2012.

BANCA EXAMINADORA

Ricardo Bentes de Azevedo

Universidade de Brasília

Cecília Beatriz Fiuza Favali

Universidade de Brasília

Eliete Neves da Silva Guerra

Universidade de Brasília

Dedico aos meus pais, por me ensinarem os reais valores da vida.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela minha vida e pelos meus familiares e amigos. Por iluminar meus caminhos e permitir que eu conseguisse chegar até aqui.

Aos meus pais, Lucimar e Francisco, por serem simplesmente incríveis, por me darem à luz e por disponibilizarem a mim todos os meios possíveis e imagináveis para eu alcançar minha felicidade. O futuro que traço para mim certamente é à imagem e semelhança do vosso.

Ao amor da minha vida, Marcelo, por me apoiar incondicionalmente nos últimos sete anos, por ser mais que um amigo, por acreditar no meu potencial e por me fazer amar e ser amada a cada dia.

Aos meus irmãos, Natalie e Pedro Henrique, por serem os melhores irmãos que alguém poderia ter. Sem vocês nada seria tão divertido.

Ao Paulo e aos meus familiares, Regina, Lígia, Laureno e Scheneider, por me abraçarem como um familiar e estar presente em mais uma etapa da minha vida.

Às minhas queridas tias Mercedes, Rosângela e Valdéris por simplesmente existirem em minha vida e fazerem dela uma verdadeira comédia.

Ao meu querido avô Francisco (*in memoriam*) e à minha querida avó Mercedes por despertarem em mim uma grande felicidade e ao mesmo tempo uma saudade enorme da infância.

Ao meu querido orientador, Prof. Dr. Ricardo Bentes, pelos maiores aprendizados em todos esses anos, pelo espelho de sucesso profissional e também pela amizade e carinho desempenhados a mim como a uma filha.

À Prof. Dra Eliete Neves, pela gentileza em disponibilizar o laboratório de Histopatologia Oral para experimentação.

À D. Zélia, por todo empenho, colaboração e boa vontade todos os dias. Sem a senhora, as coisas seriam impossíveis.

À prof. Dra. Monica Garcia, por toda paciência e atenção e pela rica contribuição nessa dissertação.

Aos meus colegas de laboratório: Luis, João, Taynanzinho, Vic, Mari, Vanessinha, Lud, Renatinha, Grazi, Maria Luiza, Khélida, Camilinha, Bia, pela amizade e contribuição no decorrer dos últimos dois anos. As lembranças dessa etapa serão inesquecíveis.

À Juliana Oliveira, pela amizade e compreensão e por me fazer lembrar de todo meu início. Espero ter lançado a chama da pesquisa em seu coração.

À Jaque, por toda contribuição e dedicação na minha formação e por compartilhar experiências inesquecíveis.

Às minhas amigas July, Lalá, Patty e Shélida, por participarem de mais uma etapa da minha vida e por compartilharem sentimentos, angustias, frustrações e sucessos por tanto tempo. A amizade de vocês certamente contribuiu muito para o sucesso desse trabalho.

Aos meus amigos Lorena e Andrew, por estarem sempre presentes em todos os acontecimentos da minha vida e por estenderem a mão sempre, em qualquer circunstância.

Às minhas amigas Carol KK, Carol Valente, Ingrid, Paulinha e Thais, pela verdadeira amizade em todos esses anos.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a resolução dessa dissertação.

Aos funcionários do Laboratório de Nanobiotecnologia, pela colaboração na realização das tarefas.

Ao CNPq, Capes, INCT pelo fomento e respaldo técnico-financeiro dessa pesquisa.

À Universidade de Brasília, pela infraestrutura disponibilizada em todos esses anos e pela minha formação. Sinto-me orgulhosa de fazer parte da história dessa Instituição.

O correr da vida embrulha tudo. A vida é assim: esquenta e esfria, aperta e daí afrouxa, sossega e depois desinquieta. O que ela quer da gente é CORAGEM!

(Guimarães Rosa)

RESUMO

A Terapia Fotodinâmica (TFD), cujo princípio é a atuação simultânea de três componentes: fármaco fotossensibilizador, luz em comprimento de onda específico e oxigênio molecular, tem se mostrado uma modalidade terapêutica promissora para o tratamento de diversas neoplasias malignas, dentre as quais o câncer de mama, altamente prevalente em mulheres em todo o mundo. Atualmente, a busca por novas formulações de fármacos fotossensibilizadores que potencializem os efeitos anti-tumorais da TFD, principalmente pela indução de resposta imune anti-tumoral e que minimizem efeitos adversos a tecidos normais adjacentes, tem sido constante. O presente estudo teve o objetivo de avaliar os efeitos da TFD mediada por Alumínio-Cloro-Ftalocianina (AICIFc) em formulação lipossomal no tratamento de câncer de mama *in vitro* e *in vivo*, bem como avaliar o perfil de resposta imunológica por meio da expressão de citocinas inflamatórias. Como resultados, puderam ser observados que a TFD mediada por AICIFc em formulação lipossomal foi altamente eficiente na ablação de células de carcinoma mamário murino – 4T1 *in vitro* – com mais de 90% de morte celular, induzindo preferencialmente necrose, seguida tardiamente por apoptose celular. A alta eficiência de tratamento também foi observada no modelo tumoral em camundongos Balb/C *in vivo*, onde foram constatados os três diferentes mecanismos de ação da TFD comumente descritos, tais quais: ação direta por necrose celular, ablação vascular acentuada e indução de resposta inflamatória caracterizadas principalmente pela expressão de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β e TNF- α . Pôde-se concluir que a TFD mediada por AICIFc em formulação lipossomal é altamente efetiva no tratamento de câncer de mama, fornecendo suporte científico para que essa modalidade associada à nova formulação farmacêutica seja empregada, no mínimo, como adjuvantes terapêuticos a tratamentos cirúrgicos, permitindo maior controle tumoral por longos períodos e, possivelmente, maior controle dos focos metastáticos.

Palavras-chave: Terapia Fotodinâmica, ftalocianinas, necrose, citocinas e resposta imune.

ABSTRACT

Photodynamic therapy (PDT), which acts by interaction of three main components: photosensitizer, light in specific wavelength and molecular oxygen, has shown to be a promising therapeutic modality applied to the treatment of various malignancies, among which breast cancer. Currently, the search for new formulations of photosensitizing drugs that enhance antitumor effects of PDT, mainly by inducing antitumor immune response and by minimizing adverse effects to adjacent normal tissues has been increased. This study aimed to evaluate the effects of PDT mediated with aluminium-chlorine-phthalocyanine (AlClPc) in liposomal formulation to the treatment of breast cancer both *in vitro* and *in vivo* model, as well as to assess the profile of immune response through the expression of inflammatory cytokines. As a result, it could be observed that PDT mediated with liposomal AlClPc was highly effective in the ablation of murine mammary carcinoma cells (4T1), *in vitro*, leading to more than 90% of cell death, mainly characterized by necrosis, followed by delayed apoptosis. The high efficiency of treatment was also observed in tumor model in Balb/C mice *in vivo*, where the three main mechanisms of PDT, commonly described, were achieved: direct cell harm by necrosis process, followed by vascular ablation and induction of inflammatory response mainly characterized by the expression of proinflammatory cytokines such as IL-1 β and TNF- α . It was concluded, therefore, that PDT mediated with liposomal AlClPc is highly effective in treating breast cancer. This provides scientific support to perform this new formulation to be used at least as an adjuvant therapy to surgical treatments. This would allow greater tumor control for long periods and possibly greater control of metastasis.

Keywords: Photodynamic Therapy, phthalocyanines, necrosis, cytokines and immune response.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 – Tipos de câncer mais incidentes na população brasileira em 2012.

Figura 1.2 – Mecanismos fotofísicos e fotoquímicos da TFD.

Figura 1.3 - Mortes celulares induzidas pelo dano oxidativo decorrente da Terapia Fotodinâmica.

Figura 1.4 - Multiplicidade dos mecanismos de ação da TFD.

Figura 1.5 - Mecanismo de ação da TFD na intermediação de resposta imune anti-tumoral.

Figura 1.6 - Profundidade de penetração das diferentes fontes

Figura 1.7 - Estrutura dos fármacos fotossensibilizadores

Figura 2.1 - Modelo de aplicação da TFD.

Figura 4.1 – Toxicidade no escuro do fármaco AICIFc em formulação lipossomal em células 4T1.

Figura 4.2 – Internalização do fármaco AICIFc em formulação lipossomal em células 4T1

Figura 4.3 – Localização intracelular do fármaco AICIFc em formulação lipossomal em células 4T1

Figura 4.4 - Viabilidade celular pelo teste MTT em células 4T1 em diferentes grupos experimentais.

Figura 4.5 - Análise morfológica de células 4T1 por microscopia óptica de contraste de fase.

Figura 4.6 - Análise de tamanho e granulosidade de células 4T1 após TFD mediada por AICIFc em formulação lipossomal por citometria de fluxo.

Figura 4.7 - Análise de exposição de fosfatidilserina A e fragmentação de DNA por citometria de fluxo de células 4T1 após TFD mediada por AICIFc em formulação lipossomal.

Figura 4.8 – Avaliação da variação do peso corporal em modelo experimental em camundongos Balb/C submetidos à TFD mediada por AICIFc em formulação lipossomal.

Figura 4.9 - Avaliação da variação do volume tumoral em modelo experimental em camundongos Balb/C submetidos à TFD mediada por AICIFc em formulação lipossomal.

Figura 4.10 - Análise macroscópica de vascularização tumoral em modelo experimental em camundongos Balb/C submetidos à TFD mediada por AICIFc em formulação lipossomal.

Figura 4.11 - Análise histopatológica dos tecidos tumorais em modelo experimental em camundongos Balb/C submetidos à TFD mediada por AICIFc em formulação lipossomal.

Figura 4.12 - Expressão de IL-1 β e TNF- α em tecido tumoral em modelo experimental em camundongos Balb/C submetidos à TFD mediada por AICIFc em formulação lipossomal.

Figura 4.13 - Expressão de IL-6 local e sistêmico em modelo experimental em camundongos Balb/C submetidos à TFD mediada por AICIFc em formulação lipossomal.

Figura 4.14 - Expressão de IL-10 local e sistêmico em modelo experimental em camundongos Balb/C submetidos à TFD mediada por AICIFc em formulação lipossomal.

Figura 4.15 - Expressão de TGF- β local e sistêmico em modelo experimental em camundongos Balb/C submetidos à TFD mediada por AICIFc em formulação lipossomal.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1 - Características ideais de um fármaco fotossensibilizador.

Tabela 1.2 – Fotossensibilizadores disponíveis para uso clínico.

Tabela 3.1 – Protocolo da Terapia Fotodinâmica *in vitro*.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADME – Absorção, distribuição, metabolismo e excreção

ALA – Ácido Aminolevulínico

AICIFc – Alumínio-Cloro-Ftalocianina

Brca-1/brca-2 – genes breast câncer 1 e breast câncer 2

DAMPs - Danger Associated Molecular Patterns

DNA – Ácido desoxirribonucléico

DMEM – Dulbeco Modified Eagle Medium (Invitrogen)

EDTA - Ácido etilenodiaminatetraacético

ER-/ER+ - Receptor de estrógeno negativo/ Receptor de estrógeno positivo

EROs – Espécies Reativas de Oxigênio

FDA – Food and Drug Administration

GRP94 – protein regulada por glucose 94

H&E – Hematoxilina e Eosina

HSPs60 – Heat Shock Protein 60, família das chaperonas

HSPs70 – Heat Shock Protein 70, família das chaperonas

IL-1 β – Interleucina 1 β

IL-6 – Interleucina 6

IL-10 – Interleucina 10

IFN- γ – Interferon- γ

PBS – Tampão Fosfato Salina

PS - Fotossensibilizador

4T1 – Linhagem celular de carcinoma mamário murino

SFB – Soro Fetal Bovino

T CD4+ - Linfócitos T CD4+

T CD8+ - Linfócitos T CD8+

TFD – Terapia Fotodinâmica

TGF- β – Fator de crescimento tumoral- β

TNF- α - Fator de necrose tumoral- α

VEGF – Fator de Crescimento Endotelial Vascular

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| 1. INTRODUÇÃO..... | 16 |
| 1.1 CÂNCER..... | 16 |
| 1.1.2 – Câncer de mama | 17 |
| 1.2 TRATAMENTOS PARA O CÂNCER | 19 |
| 1.3 TERAPIA FOTODINÂMICA | 21 |
| 1.4 TERAPIA FOTODINÂMICA E IMUNIDADE ANTI-TUMORAL | 26 |
| 1.5 FOTOSSENSIBILIZADORES..... | 30 |
| 1.6 JUSTIFICATIVA..... | 35 |
| 2. OBJETIVOS | 37 |
| 2.1 OBJETIVOS GERAIS..... | 37 |
| 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... | 37 |
| 3. METODOLOGIA..... | 38 |
| 3.1 FÁRMACO FOTOSSENSIBILIZADOR..... | 38 |
| 3.2 EQUIPAMENTO LASER..... | 38 |
| 3.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL..... | 39 |
| 3.4 EXPERIMENTAÇÃO <i>IN VITRO</i> | 39 |
| 3.4.1 Cultura de Células..... | 39 |
| 3.4.2 Toxicidade do fármaco no escuro | 40 |
| 3.4.3 Internalização do fármaco | 40 |
| 3.4.4 Terapia Fotodinâmica..... | 41 |
| 3.4.5 Viabilidade Celular | 42 |
| 3.4.6 Análise Morfológica | 43 |
| 3.4.7 Análise da (exposição) de fosfatidilserina A por citometria de fluxo | 43 |
| 3.5 EXPERIMENTAÇÃO <i>IN VIVO</i> | 45 |
| 3.5.1 Animais | 45 |
| 3.5.2 Indução Tumoral | 45 |
| 3.5.3 Protocolo de Terapia Fotodinâmica | 46 |
| 3.5.4 Análise clínica | 47 |
| 3.5.5 Análise histopatológica..... | 47 |
| 3.5.6 Análise de expressão de citocinas – ELISA | 48 |

| | |
|---|-----------|
| 3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA..... | 49 |
| 4. RESULTADOS | 50 |
| 4.1 EXPERIMENTAÇÃO IN VITRO..... | 50 |
| 4.1.1 Toxicidade do fármaco no escuro | 50 |
| 4.1.2 Internalização do fármaco por células 4T1..... | 51 |
| 4.1.3 Localização intracelular do fármaco..... | 52 |
| 4.1.4 Efeitos da Terapia Fotodinâmica..... | 54 |
| 4.2 EXPERIMENTAÇÃO <i>IN VIVO</i> | 60 |
| 4.2.1 Análise clínica | 60 |
| 4.2.2 Análise histopatológica..... | 63 |
| 4.2.3 Expressão de citocinas..... | 65 |
| 5. DISCUSSÃO..... | 72 |
| 6. CONCLUSÃO..... | 78 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 79 |
| ANEXO A – Documento de aprovação em Comitê de Ética..... | 87 |

1. INTRODUÇÃO

1.1 CÂNCER

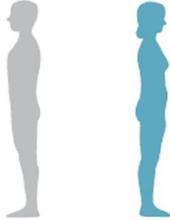
A mais antiga evidência de câncer remonta a 8.000 a.C.. Hipócrates, médico grego considerado o pai da medicina foi quem primeiro cunhou a palavra “câncer” que significa, em grego, “caranguejo”, remetendo ao tumor um aspecto com superfícies irregulares e projeções de vasos sanguíneos ao seu redor que fazem lembrar as patas do crustáceo. O impacto global do câncer mais que dobrou nos últimos 30 anos. (1) Desde então, o câncer tem sido amplamente estudado em diferentes aspectos e sua cura permanece como o maior paradigma médico-científico já estabelecido.

Com o decorrer dos séculos e com o avanço técnico-científico, observou-se que o câncer corresponde a uma condição patológica multifatorial que culmina na proliferação desenfreada de células geneticamente modificadas, formando massas tumorais em um determinado sítio primário. Assim que o tumor progride, a lâmina basal é degradada, facilitando uma interação direta entre as células cancerosas e o tecido conjuntivo adjacente ao tumor. O crescimento desenfreado das células tumorais aumenta o potencial de invasão tecidual, podendo originar focos neoplásicos metastáticos, ou seja, adquirem o potencial de proliferação em diferentes sítios teciduais, que são as principais causas de morte decorrentes da doença (2)

A incidência mundial de cânceres cresceu 20% na última década, sendo registrados mais de 12 milhões de novos casos ao ano - número superior à população da cidade de São Paulo - dos quais, segundo a ONG World Cancer Research Fund (WCRF), 7,6 milhões resultaram em óbito (3). De acordo com dados da Organização Mundial de Saúde (WHO) em 2010, o câncer foi a segunda causa de morte em países desenvolvidos, figurando atrás apenas de doenças cardiovasculares sendo, portanto, um alvo constante de pesquisa e desenvolvimento

tecnológico que potencializem os efeitos terapêuticos de fármacos e que, promovam acima de tudo, melhoria na qualidade de vida dos pacientes por ele atingidos.

No Brasil, de acordo com estimativas do Instituto Nacional do Câncer (INCA), em 2012 (1), a epidemiologia da doença segue a tendência mundial. Nesse ano, foram estimados diagnósticos de mais de 518 mil novos casos. Destes, a maior prevalência foi determinada para neoplasias primariamente originadas na mama em mulheres (52 mil novos casos) e na próstata em homens (60 mil novos casos), seguidos de neoplasias nas regiões de cólon e reto, traquéia, pulmões e estômago (Figura 1.1).

| Localização primária | | | | | Localização primária | | |
|-----------------------------|-------------|------------|--|-----------------------------|----------------------|-------------|------------|
| | casos novos | percentual | | | | casos novos | percentual |
| | | | Homens | Mulheres | | | |
| Próstata | 60.180 | 30,8% |  | | Mama Feminina | 52.680 | 27,9% |
| Traqueia, Brônquio e Pulmão | 17.210 | 8,8% | | Colo do Útero | 17.540 | 9,3% | |
| Cólon e Reto | 14.180 | 7,3% | | Cólon e Reto | 15.960 | 8,4% | |
| Estômago | 12.670 | 6,5% | | Glândula Tireoide | 10.590 | 5,6% | |
| Cavidade Oral | 9.990 | 5,1% | | Traqueia, Brônquio e Pulmão | 10.110 | 5,3% | |
| Esôfago | 7.770 | 4,0% | | Estômago | 7.420 | 3,9% | |
| Bexiga | 6.210 | 3,2% | | Ovário | 6.190 | 3,3% | |
| Laringe | 6.110 | 3,1% | | Corpo do Útero | 4.520 | 2,4% | |
| Linfoma não Hodgkin | 5.190 | 2,7% | | Linfoma não Hodgkin | 4.450 | 2,4% | |
| Sistema Nervoso Central | 4.820 | 2,5% | | Sistema Nervoso Central | 4.450 | 2,4% | |

*Números arredondados para 10 ou múltiplos de 10

Fonte: Instituto Nacional do Câncer (INCA), 2012.

Figura 1.1 Tipos de câncer mais incidentes na população brasileira para o ano de 2010. Pode-se observar que os tipos de neoplasias mais incidentes no Brasil são de mama e próstata para pacientes do sexo feminino e masculino, respectivamente.

1.1.2 – Câncer de mama

O câncer de mama é a neoplasia sólida mais freqüente em todo o mundo e a neoplasia maligna mais diagnosticada em mulheres desde os anos 90, acometendo as mais diversas faixas etárias, sendo a segunda causa de morte mais comum em mulheres acometidas por neoplasias malignas (4). Como citado anteriormente, no Brasil, estima-se que dentre os 52 mil casos diagnosticados em 2012, mais de 19 mil resultarão em óbito em um período de até cinco anos (1). Jemal et al, 2007 (5) em

um estudo longitudinal de 18 anos, observaram um aumento na incidência de câncer em 40% desde 1980 nos Estados Unidos, revelando não só a mudança etária como etiológica do câncer de mama, principalmente com a utilização de contraceptivos orais nas últimas décadas.

A etiologia do câncer de mama, por sua vez é bem estabelecida. Zhu et al, 2011(4) relatam as possibilidades etiológicas dessa doença, que estão principalmente relacionadas a três fatores principais: (i) predisposição genética; (ii) uso prolongado de estrógenos e; (iii) hormonioterapia pós-menarca. A primeira é a mais relevante, associada a mutações genéticas em *brca-1* e *brca-2* e no cromossomo 17q21. A segunda está associada principalmente ao uso de estrógenos na forma de contraceptivos orais, principalmente quando associado ao consumo de tabaco. A hormonioterapia, por sua vez, é descrita como um estímulo ao crescimento de células cancerosas, bem como à supressão de apoptose, agindo como potencializadores da carcinogênese (6).

Existem diferentes subtipos de câncer de mama, com diferenças clínicas e moleculares importantes. Molecularmente, os cânceres de mama podem expressar receptores de estrogênio (ER+) ou não (ER-) (7). O mais comumente encontrado são ER+, sendo também os de melhor prognóstico (8). Adicionalmente, os riscos de mortalidade variam de acordo com a presença de receptores de progesterona e estrogênio, tamanho do tumor e envolvimento de nódulos linfáticos, sendo a sobrevida média de 60 meses (9).

Cerca de 20% dos pacientes em estágios iniciais de câncer de mama, inicialmente diagnosticados com linfonodos negativos e ao menos 50-60% de pacientes com linfonodos positivos desenvolvem metástases em menos de cinco anos após o diagnóstico inicial do tumor primário de mama. O tempo de sobrevida desses pacientes varia significativamente, com sobrevida média entre nove meses a três anos, sendo que a demora para o início do tratamento dos focos metastáticos pode afetá-la significativamente (10).

Como pode ser observado, apesar dos avanços terapêuticos, a metástase decorrente do câncer de mama ainda permanece como o principal obstáculo ao sucesso terapêutico. Com isso, atualmente a preocupação volta-se não somente à cura de tumores primários, mas sim, ao controle tumoral por longos períodos,

reduzindo a incidência de metástases e proporcionando maior tempo de sobrevivência e melhor qualidade de vida aos pacientes (11).

1.2 TRATAMENTOS PARA O CÂNCER

Dentre as terapêuticas comumente aplicadas no tratamento de neoplasias malignas, figuram tanto procedimentos locais como cirurgia e radioterapia, quanto sistêmicos, tais como quimioterapia e terapias hormonais. Na maioria dos procedimentos observa-se grande prejuízo funcional, baixa seletividade aos tecidos tumorais, levando a quadros clínicos de imunossupressão e debilidade física, que também se somatizam aos efeitos locais das neoplasias, debilitando consideravelmente o paciente, sendo assim um limitante terapêutico (12-13).

Dos procedimentos loco-regionais para o tratamento do câncer de mama, a cirurgia é um dos mais empregados. A ressecção cirúrgica conservativa da mama é um procedimento padrão na maioria dos pacientes acometidos pela doença em estágios iniciais. Entretanto, inúmeras são as contra-indicações, uma vez que existem relatos de recorrência da neoplasia subsequente ao procedimento cirúrgico, bem como a promoção de resultados cosméticos pobres (11).

A radioterapia, por sua vez, é um tratamento comum e primário no manejo de vários tipos de câncer. Mais de 50% dos pacientes diagnosticados com câncer de mama recebem radioterapia durante o tratamento quimioterápico. A radiação ionizante promove a morte celular por transferência de energia suficiente para a interação com o material biológico, promovendo a quebra de ligações químicas diretamente no DNA. No câncer de mama, a radioterapia é aplicada como tratamento adjuvante em cânceres com prognóstico ruim, como os ER- (14). No entanto, diversos são os efeitos tóxicos produzidos em vários tecidos sadios quando altas doses de radiação são necessárias, tais como inflamação de mucosas, diarreia e mielossupressão prolongada. Aliada a esses fatores, há ainda a geração de subtipos celulares neoplásicos resistentes, aumentando a progressão e a

agressividade das células tumorais pós-irradiadas, favorecendo a recorrência local ou à distância (15).

A quimioterapia é o procedimento mais comumente empregado no manejo clínico. Nesta modalidade terapêutica um agente quimioterápico atua inespecificamente sobre células com altas taxas proliferativas, promovendo sua morte por atuação em diferentes níveis do ciclo celular, sendo indicada principalmente em tumores disseminativos (16). Além de atuar sobre as células neoplásicas, os quimioterápicos têm grande atuação também em tecidos epiteliais, células da medula óssea (mielotoxicidade), tecidos linfóides periféricos e células imunológicas, comprometendo assim o sistema imunológico do paciente, bem como promovendo inúmeros efeitos colaterais como a mucosite no trato gastrointestinal, queda de cabelo e unhas, náuseas e vômitos. Relata-se que o paciente submetido a protocolos de quimioterapia tem risco de infecções e neutropenia aumentados em 40%, além do aumento no tempo de internação hospitalar em 30% (2, 11, 16) Apesar de todos os efeitos adversos, a quimioterapia ainda é a terapêutica de maior sucesso clínico, com taxas de remissão inicial entre 60 e 80% e controle metastático relativo (11).

Ainda como terapêuticas sistêmicas adjuvantes, figuram os tratamentos hormonais e imunoterapias. Os tratamentos hormonais são protocolos aplicados principalmente em cânceres de mama com ER+. Nesse caso, o fármaco mais comumente empregado é o tamoxifeno associado à progestina, bem como o procedimento de ablação/supressão de ovário, sendo também indicado no caso de metástases. Entretanto, os pacientes apresentam riscos aumentados de trombose, redução na densidade mineral óssea e falência cardíaca, sendo contra-indicado em diversos casos (2, 11).

Já o desenvolvimento de imunoterapias específicas para antígenos tumorais tem aumentado a resposta imune anti-tumoral. Comumente aplicam-se de forma adjuvante citocinas conhecidamente imunoestimuladoras, como IL-1 e também anticorpos monoclonais. Apesar de eficiente, ainda trata-se de uma terapêutica em fase pré-clínica e precisa ser melhor compreendida para aplicação efetiva (16).

1.3 TERAPIA FOTODINÂMICA

Apesar do progresso na pesquisa básica acerca da compreensão da biologia tumoral que tem levado ao desenvolvimento de novos fármacos, é necessária maior ênfase em tratamentos existentes, porém ainda pouco empregados.

Ainda emergente, a Terapia Fotodinâmica (TFD) é uma terapêutica de sucesso e clinicamente aprovada para o tratamento de neoplasias malignas e não malignas em diversas localizações, tais como pele, cabeça e pescoço, esôfago, pulmão, pâncreas e também no tratamento de câncer de mama, inclusive casos recorrentes e metastáticos (13, 17-20).

A TFD foi a primeira combinação droga-dispositivo aprovada pela Associação Americana de Drogas e Alimentos (FDA), aproximadamente há duas décadas, porém permanece pouco utilizada clinicamente, já que a maioria dos estudos relacionados ainda encontram-se em fase pré-clínica. O sucesso dessa modalidade terapêutica surge dado o contexto atual das terapêuticas comumente empregadas, que levam tanto a destruição massiva de tecidos normais, quanto à imunossupressão do paciente (21).

A TFD é conceitualmente uma modalidade seletiva, uma vez que para a consecução de seus resultados, se faz necessária a existência simultânea de três componentes: fármaco fotossensibilizador (PS) que se localiza seletivamente no tecido tumoral, uma luz de comprimento de onda específico, compatível com a maior absorção do fármaco empregado e oxigênio molecular. A efetividade da TFD é determinada pelo suprimento de oxigênio e pode decair em condições de hipóxia tecidual. A ausência de qualquer um dos fatores descritos inviabiliza a toxicidade da TFD sendo, portanto uma terapêutica muito segura e com efeitos adversos mínimos (22).

O mecanismo de atuação da TFD ocorre por meio de dano oxidativo a componentes celulares, pela geração de espécies reativas de oxigênio (EROs), principalmente o oxigênio singlete (1O). Após a injeção endovenosa ou aplicação local do fármaco fotossensibilizador e seu acúmulo no tecido tumoral, há

internalização do mesmo para o ambiente intracelular (21). Nesse estágio, o fármaco fotossensibilizador se encontra em estado fundamental, estável, sendo conhecido como estado singleto (1PS), não reativo com componentes celulares. Assim que ocorre a irradiação tecidual em comprimento de onda específico, normalmente na região vermelha ou infra-vermelha do espectro eletromagnético, o fármaco que se encontra acumulado nas células tumorais absorve a energia fornecida pela fonte luminosa, em forma de fótons, atingindo um estado excitado tripleto (3PS) de maior energia, possuindo spins de elétrons desemparelhados. Nesse momento, de forma muito rápida, o fármaco fotossensibilizador pode sofrer dois tipos de reações fotoenergéticas, conforme a Figura 1.2. (19, 23).

Na reação do Tipo I, o fármaco pode reagir diretamente com substratos como membrana celular ou moléculas, onde transfere um próton ou um elétron para formar radicais aniônicos ou catiônicos, respectivamente. Esses radicais podem interagir com oxigênio para gerar EROs. Alternativamente, na reação do Tipo II, o fármaco fotossensibilizador pode transferir sua energia diretamente ao oxigênio molecular (que em seu estado fundamental é tripleto), para formar oxigênio singleto excitado. Neste caso, as moléculas do fotossensibilizador funcionam como verdadeiros catalisadores fotoativados da produção de 1O_2 e estima-se que cada uma delas pode produzir por meio de processos fotodinâmicos, entre 10^3 e 10^5 moléculas de 1O_2 antes de ser fotodegradadas. (19, 24) Apesar das reações do Tipo II estarem geralmente associadas à geração de 1O_2 , outros compostos também têm seu estado fundamental na configuração tripleto e podem, portanto, ser envolvidos neste tipo de fotorreação, tais como o óxido nítrico e os carotenóides (25).

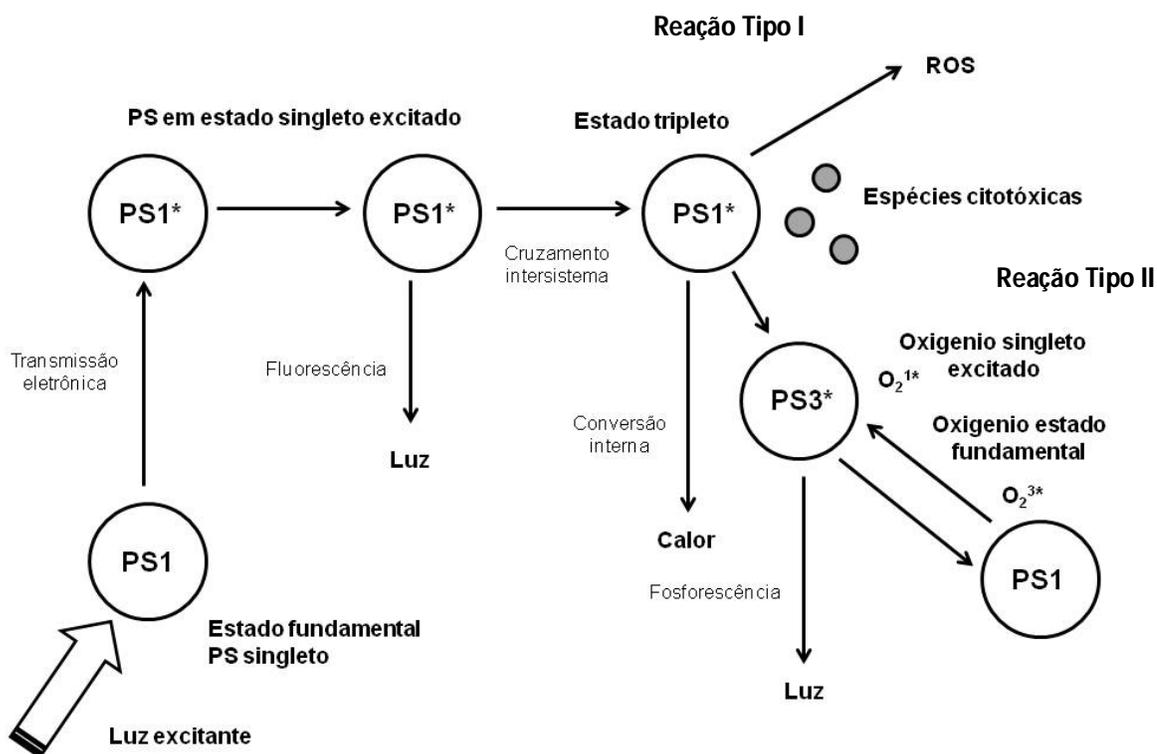


Figura 1.2 Mecanismos fotofísicos e fotoquímicos da terapia fotodinâmica (TFD). O estado fundamental do fármaco fotossensibilizador (PS) é singlete. Após sua ativação com fonte luminosa em comprimento de onda específico, há a excitação para um estado tripleto. Dependendo do substrato de interação, o PS pode gerar radicais aniônicos ou catiônicos (reação tipo I) ou pode gerar espécies reativas de oxigênio, principalmente o oxigênio singlete, pela interação do PS com oxigênio molecular. Ambos os processos levam à lesão celular por dano oxidativo. Adaptado de Robertson et al, 2009.

Ambos os tipos de reações podem ocorrer simultaneamente e a razão entre esses processos pode decorrer do fotossensibilizador utilizado, assim como a concentração dos substratos e do oxigênio. Dada a alta reatividade e o curto período de meia vida do ¹O₂ e dos radicais hidroxilas, apenas as moléculas e estruturas que estão próximas as áreas de produção são diretamente afetados pela TFD (26).

A geração massiva de EROs promove o disparo de diversos mecanismos celulares que induzirão a morte celular direta por diferentes vias: apoptose, necrose e/ou autofagia a depender: do tipo de célula tratada, da concentração de fármaco fotossensibilizador empregado, da dose de energia fornecida e da localização intracelular do fotossensibilizador (Figura 1.3) (27). A localização intracelular do fotossensibilizador é um determinante importante, já que o curto tempo de vida do $^1\text{O}_2$, de cerca de ~ 20 nseg, determina o sítio primário de dano oxidativo, que corresponde a aproximadamente 40 nm da sua localização intracelular inicial (28).

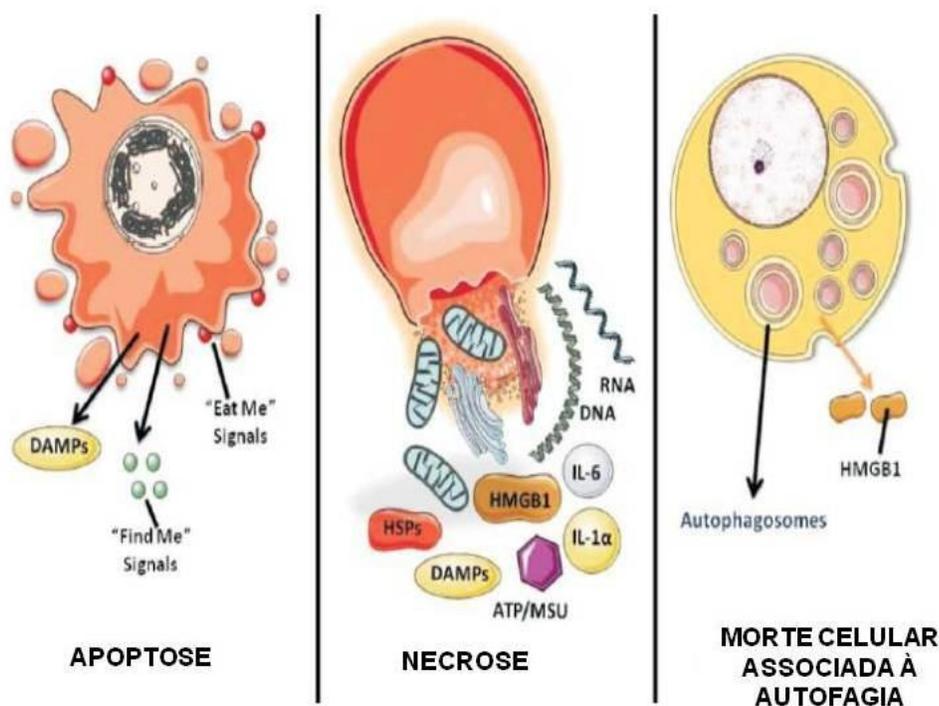


Figura 1.3. Mortes celulares induzidas pelo dano oxidativo decorrente da Terapia Fotodinâmica. Adaptado de Agostinis et. al, 2011.

A localização intracelular pode ainda prever a via de morte, uma vez que fármacos com acúmulos em mitocôndrias estão amplamente associados à indução de apoptose celular pela liberação de citocromo c e indução de resposta por meio da cascata de caspases. Fármacos localizados em membranas de organelas e

lisossomos tendem a ocasionar necrose dada a perda rápida de integridade de membrana, bem como a rápida depleção intracelular de ATP. Mroz et al., 2011 relatam que altas doses de TFD (tanto concentração de fármaco, quanto dose de energia) tendem a causar necrose. Corroborando com esta análise, há a descrição de que viabilidades celulares menores que 70% são preditivas de apoptose, enquanto que a necrose é encontrada em citotoxicidades de mais de 90% (22).

Além dano celular direto, a TFD também promove lesão à vascularização tumoral pela atuação em células endoteliais adjacentes e intra-tumorais, promovendo a ablação vascular com formação de trombos e áreas hemorrágicas, resultando em falta de aporte de nutrientes e oxigenação às células tumorais no microambiente tumoral e, conseqüentemente, promovendo morte celular secundária com necrose tecidual (29). Estudos como o de Barnes et al, 2008 têm demonstrado que intervalos menores entre o tempo de administração do fármaco fotossensibilizador e a irradiação tumoral favorecem a ocorrência de lesões vasculares, uma vez que não há completa dissipação do fotossensibilizador às células tumorais, potencializando a eficiência do tratamento e levando à reduções tumorais maiores, sendo um efeito desejado nessa modalidade (17).

Aliada aos efeitos diretos e vasculares sabe-se ainda que o terceiro mecanismo de ação da TFD ocorre pela ativação de resposta imunológica anti-tumoral. Durante o tratamento induz-se uma resposta inflamatória aguda robusta, mediada inicialmente por neutrófilos, macrófagos/monócitos e diversos agentes quimiotáticos, capazes de sensibilizar componentes do sistema imunológico, como linfócitos T efetores. A presença dos linfócitos T é capaz de induzir resposta imunológica adaptativa e conseqüente reconhecimento e controle tumoral por longos períodos, como pode ser observado na Figura 1.4 (30).

Tal perspectiva da TFD tem sido amplamente estudada nos últimos três anos. Diversos estudos têm demonstrado a indução de resposta imunológica efetora, capaz de minimizar a recorrência de tumores e inibir o crescimento de metástases, que é o principal desafio no tratamento das diversas neoplasias malignas (25). Pautado ainda no conceito de indução de resposta imunológica anti-tumoral, diversas pesquisas têm sido conduzidas no desenvolvimento de vacinas anti-câncer preventivas e terapêuticas associadas à TFD (32).

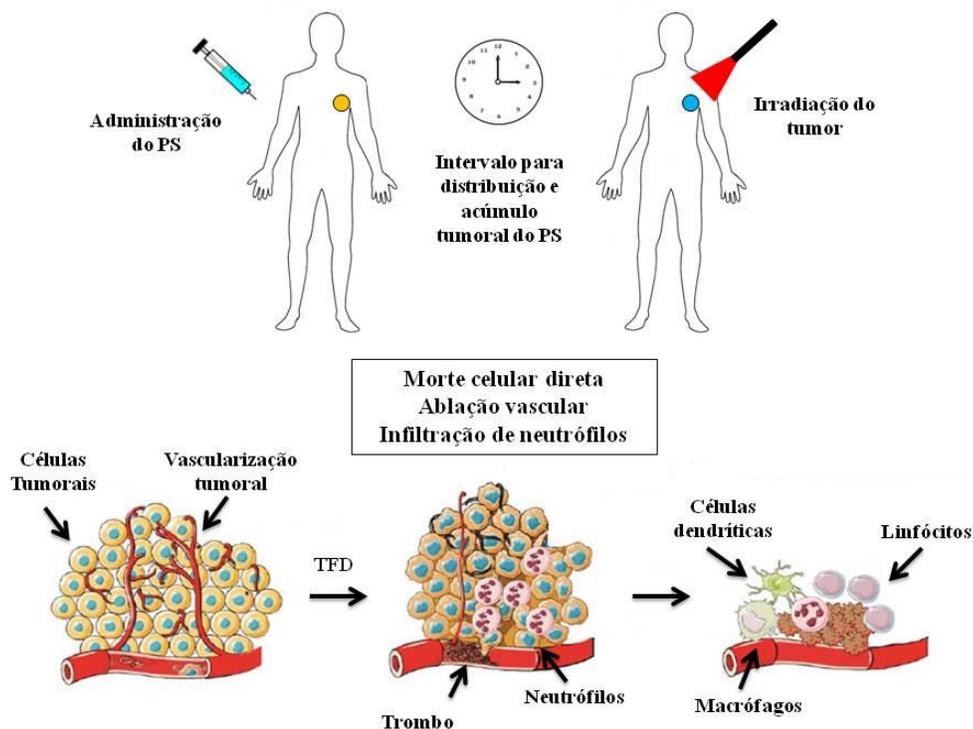


Figura 1.4. Multiplicidade dos mecanismos de ação da terapia fotodinâmica (TFD). Adaptado de Agostinis, 2011.

1.4 TERAPIA FOTODINÂMICA E IMUNIDADE ANTI-TUMORAL

Como descrito em tópicos anteriores, o principal causador de morte associada ao câncer está relacionado à dualidade de metástases recorrentes juntamente com o uso de terapias imunossupressoras, que reduzem significativamente a capacidade do organismo em combater novos desafios cancerígenos. Adicionalmente, pôde-se observar que a TFD possui três mecanismos principais de destruição tumoral, dentre eles a ativação do sistema imunitário para controle tumoral por longos períodos.

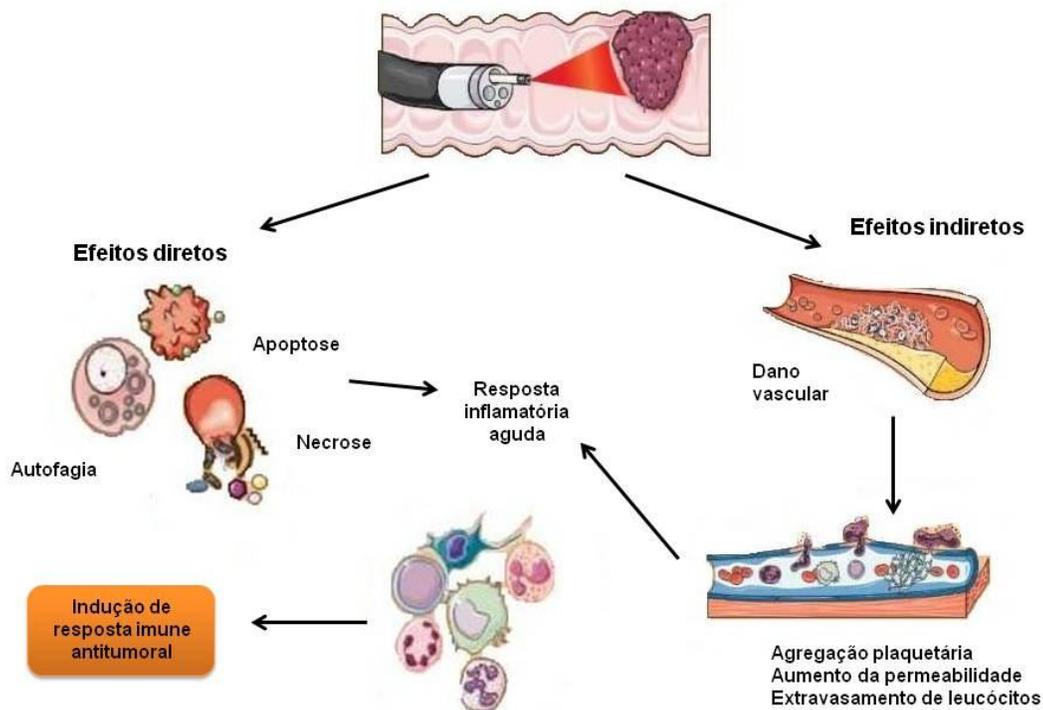


Figura 1.5. Mecanismo de ação da terapia fotodinâmica (TFD) na intermediação de resposta imune anti-tumoral. Adaptado de Mroz et. al, 2011.

A primeira descrição do potencial imunológico da TFD foi realizada por Canti et al, 1998 demonstrando que as células isoladas de linfonodos drenantes de tumores de camundongos tratados com TFD eram capazes de conferir resistência tumoral a camundongos nativos (33-34). Desde então, diversos estudos têm demonstrado a viabilidade de indução de resposta imune anti-tumoral associada à TFD (32, 35-38).

A TFD freqüentemente induz inflamação aguda severa, observada como edema local no tecido alvo. A TFD produz lesão química/física no sitio tumoral, percebido pelo hospedeiro como trauma local agudo. Com isso, a inflamação local é induzida, rompendo a homeostase e assegurando a remoção de células destruídas e promovendo cicatrização local com restauração da função tecidual normal. A

inflamação induzida pela TFD é antígeno inespecífica, orquestrada pelo sistema imune inato (12, 39-40).

O começo da inflamação induzida pela TFD é marcado por mudanças drásticas na vascularização tumoral, que se torna permeável às proteínas sanguíneas e pró-adesivas às células inflamatórias (35). Estas células inflamatórias, lideradas pelos neutrófilos e seguido de monócitos/macrófagos, invadem rápida e massivamente o tumor após a TFD. Sua primeira atividade é neutralizar as DAMPs (Damage Associated Molecular Patterns), que são moléculas comumente geradas após a TFD no sítio de tratamento, cuja principal função é emitir sinais de alerta para a imunidade inata. As DAMPs mais comumente liberadas são as HSPs60, HSPs70 e GRP94 (41-42). As células imunes atraídas pelas DAMPs e também pelos demais mediadores pró-inflamatórios atuam eliminando debris contendo tecido comprometido, incluindo células injuriadas e mortas (43). Além da ação das DAMPs, diversas citocinas envolvidas na regulação do processo inflamatório são expressas no microambiente tumoral. Dentre as mais comumente encontradas estão a IL-1 β , IL-6, TNF- α e IFN- γ , sendo co-responsáveis pela indução e manutenção da resposta inflamatória aguda após a TFD (44-45).

A imunidade anti-tumoral após a TFD é dependente de indução de inflamação. A inflamação local e aguda culmina na maturação e ativação de células dendríticas. Células dendríticas são ativadas em resposta à TFD e migram aos linfonodos de drenagem tumoral onde conseguem estimular a produção e ativação de células T. A ativação de células T CD8+ e de memória é freqüentemente dependente da presença e ativação de células T CD4+ (27, 46).

Contrariamente à indução de resposta inflamatória após a TFD, alguns estudos demonstram uma atividade imunossupressora dessa modalidade terapêutica (47-49). A supressão induzida pela TFD está intimamente associada ao uso de Photofrin como fármaco fotossensibilizador, em regimes de tratamento cutâneo e transdérmico, envolvendo amplas áreas de superfície. Nesses casos, há morte celular preferencialmente por apoptose e pouca ablação vascular, molecularmente caracterizada pelos níveis elevados de VEGF (50-51). Em conjunto, a baixa sinalização para as células inflamatórias se somatizam à liberação de citocinas como IL-10 e TGF- β , conhecidamente imunossupressoras, contribuindo

para o retardamento da maturação de células dendríticas e conseqüentemente a inibição da produção de linfócitos T efetores CD4+ e CD8+. Existem relatos de que a eficácia da TFD em camundongos e humanos é reduzida por conta da ausência de ativação ou infiltração tumoral de células T CD8+ (52).

Especificamente em relação à expressão de citocinas, o aumento dos níveis das mesmas e também de mediadores pró-inflamatórios tem sido observados após a aplicação da TFD. A liberação local e sistêmica dessas substâncias é relatada tanto em modelos experimentais em animais como em pacientes com câncer submetidos à TFD, sendo uma conseqüência de vários efeitos independentes (12, 54). A indução inicial da expressão das primeiras citocinas pró-inflamatórias é um resultado do dano direto às células e ao estroma tumoral. Algumas horas após a TFD, a liberação das citocinas é ocasionada pela ativação de várias vias de transdução de sinal e fatores de transcrição, principalmente NF- κ B e AP-1.

Em modelos murinos, a TFD induz a expressão de diversas citocinas como IL-1 β , IL-6 e TNF- α e IFN- γ . A liberação desses mediadores está associada não só à indução de neutrofilia local, como também influencia a função de inúmeras células do sistema imune, como os macrófagos, contribuindo na regulação de sua migração e função (30, 36-37, 55).

O balanço entre a expressão de fatores pró-inflamatórios e anti-inflamatórios influencia fortemente a indução de resposta imune mediada pela TFD. Estudos demonstram que o bloqueio de IL-1 β está relacionado à diminuição da cura do tumor, ao passo que a inibição de citocinas conhecidamente imunossupressoras como IL-10 e TGF- β potencializam os efeitos terapêuticos da TFD (56-57).

Com isso, as implicações da imunidade anti-tumoral mediada pela TFD e a geração eficiente de vacinas é significativa e fornecem possibilidade promissora de utilizar a TFD no tratamento de distúrbios metastáticos e também como adjuvante em combinação com outras terapêuticas (20, 53).

1.5 FOTOSSENSIBILIZADORES

Os fotossensibilizadores são componentes chaves para o êxito da TFD. Desde 1930, quando o primeiro fármaco fotossensibilizador foi desenvolvido buscou-se o aprimoramento de propriedades fotofísicas e fotoquímicas, com o intuito de potencializar a eficiência anti-tumoral da terapia, bem como reduzir efeitos adversos (58). Dentre as características idealmente presentes nos fármacos fotossensibilizadores, encontram-se a pureza química, o acúmulo preferencial em células ou tecidos tumorais, a ativação em comprimentos de onda elevados, entre 650-800nm, a capacidade de geração de altas quantidades de EROS e a rápida eliminação tecidual, minimizando danos a tecidos normais, evidenciada pela Tabela 1.1 (59). Dentre os fotossensibilizadores presentes no mercado atualmente, destacam-se três grandes gerações.

A primeira geração de fotossensibilizadores foi desenvolvida no começo do século XX, composta principalmente de porfirinas e seus derivados, sendo seu principal representante o Photofrin. Esse fotossensibilizador, também conhecido como porfirina sódica, foi o primeiro a ser aprovado para aplicação clínica nos Estados Unidos e Europa no tratamento de diversas neoplasias malignas, tais como: pulmão, esôfago, pâncreas, pele, mama, cabeça e pescoço e cérebro (Tabela 1.2) (60). Apesar do sucesso na sua aplicação clínica e de ainda ser o fotossensibilizador mais utilizado, o Photofrin possui inúmeras desvantagens: trata-se de uma mistura de derivados de porfirinas, possuindo elevada heterogeneidade química, além de baixo comprimento de onda de ativação, na faixa de 630nm, restringindo sua aplicação a cânceres superficiais, uma vez que a luz incidente penetra aproximadamente 4 mm (Figura 1.6) e ainda tempo de retenção prolongada, favorecendo sua toxicidade cutânea após TFD (61).

Tabela 1.1. Características ideais de um fármaco fotossensibilizador.

| | |
|----------------------------|---|
| Pureza | Substância pura, única, com composição conhecida e estável a temperatura ambiente. |
| Toxicidade | Toxicidade mínima na ausência de luz e citotoxicidade apenas na presença de luz em comprimento de onda definido. Não deve gerar metabólitos tóxicos. |
| ADME | Ótimas propriedades de absorção, distribuição, metabolismo e excreção. |
| Ativação | Comprimento de onda de absorção entre ~700 a 800 nm para máxima penetração tecidual e mínimo espalhamento. |
| Rendimento quântico | Alto rendimento quântico de geração de oxigênio para os eventos fotoquímicos – usualmente geração de ROS e oxigênio singleto. |
| Custo e viabilidade | Inexpressivo custo, associado a alta viabilidade comercial para ampla utilização. |
| Seletividade | Acúmulo no tecido tumoral é favorável. Localização intracelular em organelas que induzam preferencialmente a apoptose, como estruturas mitocondriais. |
| Carcinogenicidade | Nenhum efeito mutagênico ou carcinogênico deve resultar da atividade do fotossensibilizador. |

Fonte: O'Connor et. al,2009

Tabela 1.2. Fotossensibilizadores disponíveis para uso clínico.

| Fotossensibilizador | Estrutura | λ (nm) | Aprovação | Ensaio | Tipo de Câncer |
|--------------------------------------|------------------------|----------------------------------|------------------|---------------|---|
| Porfirina Sódica (Photofrin) | Porfirina | 630 | Mundial | _____ | Pulmão, esôfago, ducto biliar, cérebro, ovário |
| ALA | Precursor de Porfirina | 635 | Mundial | _____ | Pele, bexiga, cérebro, esôfago |
| Ésteres de ALA | Precursor de Porfirina | 635 | Europa | _____ | Pele, bexiga |
| Termoporfin (Foscan) | Clorina | 652 | Europa | EUA | Cabeça e pescoço, pulmão, cérebro, pele, ducto biliar |
| Verteporfin | Clorina | 690 | Mundial | Reino Unido | Oftálmico, pancreático, pele |
| HPPH | Clorina | 665 | _____ | EUA | Cabeça e pescoço, esôfago, pulmão |
| SnEt2 (Purlitina) | Clorina | 660 | _____ | EUA | Pele, mama |
| Talaporfin (Npe6) | Clorina | 660 | _____ | EUA | Fígado, colon, cérebro |
| Radaclorina | Clorina | 660 | _____ | Rússia | Nasofaríngeo, sarcoma, cérebro |
| Ftalocianina siliconada (Pc4) | Ftalocianina | 675 | _____ | EUA | Linfoma cutâneo de células T |
| Padoporfina | Bacterioclorina | 762 | _____ | EUA | Próstata |
| Lutex | Texafirina | 732 | _____ | EUA | Mama |

Fonte: Agostinis, 2011.

A segunda geração de fotossensibilizadores, por sua vez, foi estabelecida com o intuito de contornar os efeitos limitantes dos fármacos de primeira geração. As principais famílias de fármacos de segunda geração são compostas por porfirinas, clorinas e alguns corantes. Dentre as clorinas, a mais empregada é o Foscan, também conhecido como mTHPC (meta-tetrahydroxylphenylchlorina) (62). O Foscan é um potente fotossensibilizador com propriedades fotoquímicas interessantes, possuindo maior pureza química, comprimento de onda de ativação de 652 nm, o que aparentemente permite uma penetração tecidual de 10 mm, como observado na Figura 1.6. Possui ainda maior eliminação tecidual, se comparado ao Photofrin.

Apesar da eficácia, o Foscan desencadeia fotossensibilidade cutânea elevada, que pode permanecer por várias semanas pós-tratamento (63).

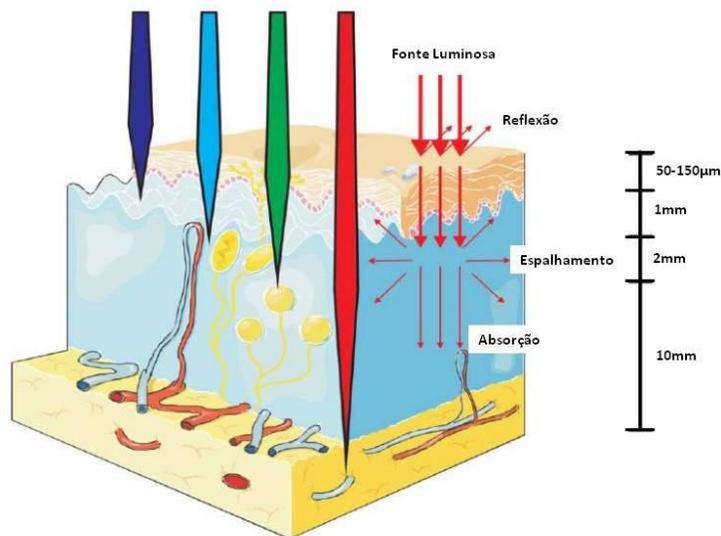


Figura 1.6. Profundidade de penetração cutânea das diferentes fontes luminosas com comprimentos de onda específicos no espectro de luz. Adaptado de Agostinis, 2011.

Outro fármaco de segunda geração amplamente empregado, principalmente para o tratamento de câncer de pele é o Levulin – formulação de Ácido Aminolevulínico, também conhecido como ALA ou fotoporfirina IX. Assim como Photofrin, é uma porfirina aprovada pela FDA e também ocorre naturalmente na forma de precursor biossintético, sendo uma pró-droga (60). O ALA é metabolizado endogenamente na mitocôndria em uma porfirina fotoativa (PpIX), possuindo absorção máxima em quatro picos: 410, 510, 580 e 635 nm, permitindo a irradiação por múltiplas fontes de luz. As principais desvantagens desse fotossensibilizador decorrem da intensa dor durante o tratamento, da baixa profundidade de penetração da fonte luminosa limitada a aproximadamente 1 mm e do tempo de retenção prolongado de 24 a 72h (63).

Assim como as porfirinas e clorinas supracitadas, fazem parte também da segunda geração de fotossensibilizadores promissores as ftalocianinas. As

ftalocianinas são substâncias comumente empregadas em diversas áreas que não biológicas, tal como a industrial na forma de corantes e agentes catalisadores, sendo sua finalidade como fotossensibilizador para a terapia fotodinâmica descoberta recentemente (64). Tratam-se de compostos estruturalmente relacionados com as porfirinas (figura 1.7), possuindo ótimas propriedades fotofísicas e fotoquímicas quando comparados aos demais fotossensibilizadores. Possuem alta absorção luminosa em uma faixa do espectro eletromagnético entre 670 e 800 nm, o que confere alta penetração tecidual da fonte luminosa no tecido-alvo (63). Além disso, muitas ftalocianinas possuem complexados aos centros, metais em forma hidrofílica, tais como Índio, Zinco, Gálio e Alumínio. Tais metais beneficiam fortemente as características fotofísicas desses compostos no tocante a redução de agregação, que reduz significativamente a eficiência da TFD, bem como o aprimoramento na internalização celular e principalmente, por conferirem aos compostos amplos estados tripletos de energia e longos períodos de vida - essenciais para a eficiência da TFD (65). Além disso, os complexos metalizados de ftalocianinas têm demonstrado baixa toxicidade no escuro e eliminação tecidual rápida, reduzindo os efeitos tóxicos comumente encontrados nos fotossensibilizadores já empregados comercialmente (65).

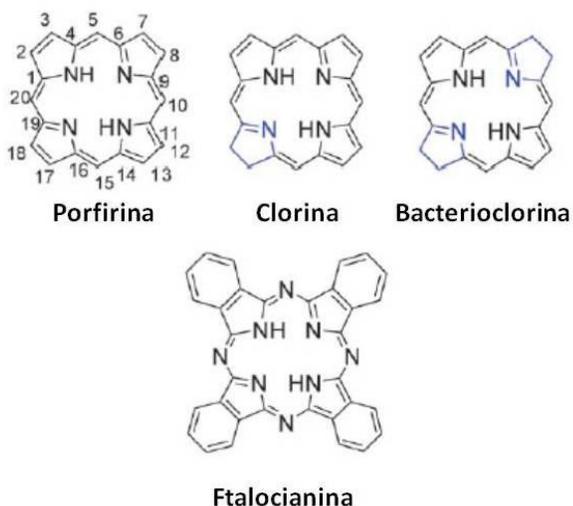


Figura 1.7. Estrutura dos fármacos fotossensibilizadores. Adaptado de Erithajan, 2011.

Apesar de tantas características promissoras, as ftalocianinas, bem como grande parte dos fotossensibilizadores disponíveis atualmente tem grande caráter hidrofóbico, o que, inviabiliza sua aplicação em soluções aquosas, uma vez que esse estado leva a formação de agregados e interfere significativamente na eficiência fotossensibilizadora. Outro aspecto negativo é a baixa seletividade tumoral, exigindo altas doses de medicamento para que as concentrações efetivas estejam presentes para a irradiação tecidual (66). Com isso, houve necessidade do desenvolvimento de sistemas carreadores que possibilitem a administração do fármaco, bem como potencializem sua seletividade tumoral. Nesse contexto, surgiram os fármacos fotossensibilizadores de terceira geração que correspondem aos mesmos fármacos de primeira e segunda geração acima descritos, associados a sistemas como lipossomas, nanopartículas, micelas e anticorpos conjugados (67-71).

O sistema de carreamento de fármacos mais comumente empregado é o lipossomal (70, 72). Lipossomos são esferas constituídas de uma bicamada lipídica e centro aquoso, possibilitando a incorporação tanto de fármacos com características hidrofílicas quanto hidrofóbicas. Diversos estudos têm relatado a aplicação de fotossensibilizadores em formulação lipossomal no tratamento de neoplasias malignas na terapia fotodinâmica, sendo observado maior eficiência fototóxica, bem como redução de toxicidade cutânea e aumento de seletividade tumoral (69, 73).

1.6 JUSTIFICATIVA

A partir do exposto acima, o presente estudo insere-se no contexto de aprimoramento biotecnológico de fármacos fotossensibilizadores de segunda geração, especificamente as ftalocianinas, em formulações nanoestruturadas por meio da terapia fotodinâmica no tratamento da neoplasia de maior relevância clínica em mulheres: o câncer de mama.

Para que os fármacos desenvolvidos sejam de fato empregados futuramente, faz-se necessária a avaliação de sua toxicidade, bem como de sua efetividade terapêutica, seus mecanismos de ação tanto em modelos *in vitro* e *in vivo* como também a exploração de seu potencial uso como estimulante imunológico no combate ao câncer de mama.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAIS

Avaliar os efeitos da Terapia Fotodinâmica mediada por Alumínio-Cloro-Ftalocianina em formulação lipossomal no tratamento de câncer de mama *in vitro* e *in vivo*, bem como avaliar o perfil de resposta imunológica induzida.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1 - Avaliar o potencial de utilização do fármaco fotossensibilizador Alumínio-Cloro-Ftalocianina em formulação lipossomal na terapia fotodinâmica em modelo *in vitro* com células de carcinoma mamário murino – 4T1 quanto a:

- toxicidade isolada em diferentes concentrações;
- perfil de liberação e localização intracelular ;
- eficiência fotodinâmica e via de morte celular.

2 - Avaliar o potencial de utilização do fármaco fotossensibilizador Alumínio-Cloro-Ftalocianina em formulação lipossomal na terapia fotodinâmica em modelo *in vivo* com tumores derivados de células de carcinoma mamário murino – 4T1 quanto a:

- análise clínica;
- eficiência terapêutica e;
- perfil de expressão de citocinas associadas a indução de resposta imunológica anti-tumoral

3. METODOLOGIA

3.1 FÁRMACO FOTOSSENSIBILIZADOR

O fármaco fotossensibilizador empregado foi o composto Alumínio-Cloro-Ftalocianina - AICIFc, um derivado de ftalocianinas, em formulação lipossomal, sintetizado e caracterizado pelo laboratório de Química da Universidade de São Paulo – Ribeirão Preto e gentilmente cedido pelo Prof. Dr. Antonio Cláudio Tedesco. A concentração de uso fornecida foi de 5 μ M.

3.2 EQUIPAMENTO LASER

Para a irradiação das células *in vitro* e dos tumores *in vivo*, foi utilizado o equipamento de laser diodo de baixa intensidade (BWF – Tech In) com comprimento de onda de emissão a 670 nm, luz vermelha, intensidade de 80 mA e potência máxima de 50 mW. Periodicamente o aparelho foi submetido à aferição de intensidade luminosa por meio de equipamento PowerMeter no Laboratório de Física da Universidade de Brasília.

3.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

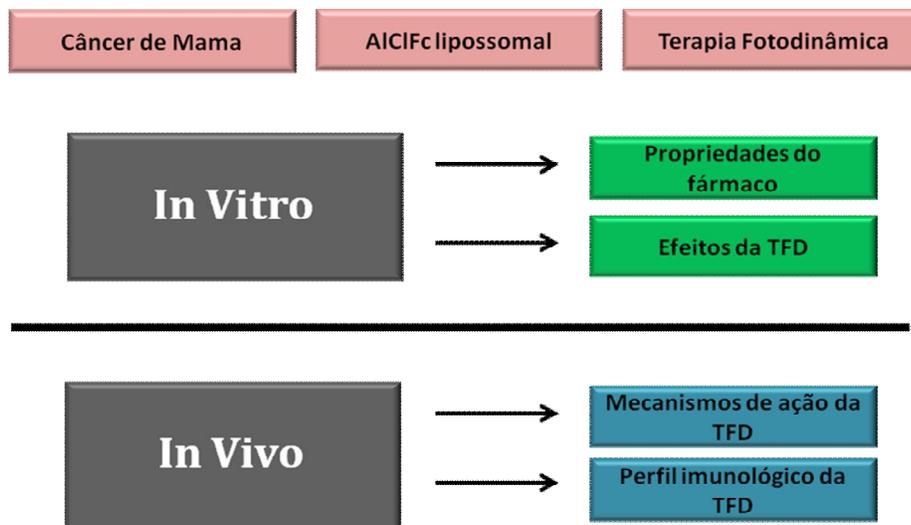


Figura 3.1. Delineamento experimental empregando modelo de câncer de mama, e terapia fotodinâmica mediada por AICIFc lipossomal.

3.4 EXPERIMENTAÇÃO *IN VITRO*

3.4.1 Cultura de Células

Os experimentos foram conduzidos com linhagens celulares – 4T1 – derivadas de carcinoma mamário murino. Após serem descongeladas, as células foram mantidas em garrafas de cultura de 75 cm² em estufa a 37 °C, 5% de CO₂ e 70-80% de umidade. O meio de cultivo DMEM foi utilizado durante a manutenção celular, suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibiótico (100 UI/mL de penicilina e 100 µg/mL de streptomomicina).

Após a cultura atingir entre 70 a 80% de confluência, as células foram tripsinizadas (Tripsina-EDTA 0,25%), centrifugadas a 1100 rpm por três minutos, contadas em câmara de Neubauer e repicadas para novas garrafas de cultura ou

utilizadas para experimentação. O plaqueamento das células foi realizado 24h antes do início da experimentação uma vez que as células precisavam aderir à placa e atingir equilíbrio metabólico previamente aos testes.

3.4.2 Toxicidade do fármaco no escuro

Após 24 horas do plaqueamento de 7×10^3 células 4T1 em placas de 96 poços foram adicionadas diferentes concentrações do fármaco fotossensibilizador com o intuito de avaliar sua toxicidade relativa em função da concentração administrada. As células foram incubadas por 24 h com concentrações de 5; 2,5; 1,25; 0,67 e 0,31 μM de AICIFc lipossomal em meio de cultivo DMEM sem vermelho fenol suplementado com 1% de antibiótico. Transcorrido o tempo de incubação, o meio de cultivo foi removido e o teste de MTT realizado de acordo com o protocolo de viabilidade celular descrito no tópico 3.3.5.

3.4.3 Internalização do fármaco

3.4.3.1 Análise em espectrofotômetro

Com o intuito de avaliar o sistema nanoestruturado desenvolvido para aplicação na TFD e, conseqüentemente determinar o tempo ideal para a irradiação da cultura celular, a taxa de internalização do fármaco em função do tempo de incubação foi analisada. Após 24 horas do plaqueamento de 7×10^3 células 4T1 em placas de 96 poços foi adicionado 75 μL de AICIFc lipossomal a 5 μM em meio de cultivo DMEM sem vermelho fenol. Após 5, 15, 30 e 60 minutos de incubação em estufa a 37 °C, 5% de CO_2 e 70-80% de umidade, os sobrenadantes foram coletados e os poços lavados três vezes com PBS. Foram adicionados a cada poço de cultivo 150 μL de DMSO para solubilização das células e do fármaco internalizado. A medida de fluorescência foi realizada em espectrofotômetro SpectraMax N5 – Molecular Devices. Os comprimentos de emissão e excitação foram respectivamente

350 e 670 nm. Para a correspondência dos valores de fluorescência encontrados, uma curva de calibração foi determinada a partir de padrões conhecidos de AICIFc em formulação lipossomal. A porcentagem de AICIFc em formulação lipossomal foi expressa em função da concentração inicial de fármaco incubado.

3.4.3.2 Microscopia Confocal

Após a determinação do tempo de incubação com a maior taxa de internalização de AICIFc lipossomal, optou-se por avaliar microscopicamente a localização celular do fármaco, com o objetivo de compreender os mecanismos de ação da TFD.

Após 24 horas do plaqueamento de 1×10^4 células 4T1 em placas de 24 poços recobertas com lamínulas estéreis, foi adicionado 125 μ L de AICIFc lipossomal a 5 μ M em meio de cultivo DMEM sem vermelho fenol. A incubação com o fármaco foi realizada por 30 minutos em estufa a 37 °C, 5% de CO₂ e 70-80% de umidade. Após incubação, os poços foram lavados com PBS estéril por três vezes e submetidos à fixação com paraformaldeído 4% tamponado, estéril, por 40 minutos. Após a fixação, as amostras foram processadas com protocolo de desidratação e coloração com marcadores celulares de núcleo (Hoescht, 33442, Molecular Pobes, Invitrogen Excitação: Luz ultravioleta. Emissão: 415-450 nm) e citoesqueleto (Alexa-Fluor 488, Molecular Pobes, Invitrogen. Excitação: 495 nm. Emissão: 510 nm). Imediatamente após serem confeccionadas, as lâminas foram submetidas à análise em microscópio confocal SP5 (Leica, São Paulo, Brasil) do laboratório de microscopia eletrônica da Universidade de Brasília. Os parâmetros de Smart gain, Smart Offset e pinhole foram os mesmos para todas as lâminas.

3.4.4 Terapia Fotodinâmica

Após 24 horas do plaqueamento em placas ou de 96 poços ou de 12 poços (a depender do experimento a ser realizado), as células foram incubadas com AICIFc em formulação lipossomal a 5 μ M em meio de cultivo DMEM por 30 minutos. Após a

liberação e internalização celular, o meio de cultivo contendo o fármaco foi removido e adicionado novo DMEM sem vermelho fenol com 1% de antibiótico. Em seguida, as células foram irradiadas por cinco minutos a 50 mW, 670 nm totalizando uma dose final de energia por poço de 4,25 J/cm², como sintetizado na Tabela 3.1. Esta dose de trabalho e a concentração do fármaco de 5 µM foram previamente definidas em estudos anteriores do laboratório. Após o tratamento, as células foram re-incubadas em estufa com meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibiótico até os tempos de 6 e 24 h para a avaliação dos testes abaixo descritos. Como controles, células foram incubadas com o fármaco AICIFc lipossomal, porém não foram irradiadas e um segundo grupo de células foram submetidas apenas a irradiação do laser sem a adição prévia do fármaco.

Tabela 3.1. Protocolo da Terapia Fotodinâmica *in vitro*.

| Grupos experimentais | Meio de incubação | Tempo de incubação | Irradiação |
|----------------------|---|--------------------|-----------------------|
| Controle | DMEM sem vermelho fenol | 30 minutos | – |
| TFD | DMEM sem vermelho fenol + AICIFc lipossomal a 5µM (1:1) | 30 minutos | 4,25J/cm ² |

3.4.5 Viabilidade Celular

Para a análise de viabilidade celular foi utilizado o teste MTT. Este ensaio avalia a taxa de proliferação celular e, quando existem eventos metabólicos que levem a apoptose ou necrose, avalia a redução na viabilidade celular. O MTT (3-(4, 5- dimethylthiazolyl-2)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide) é reduzido por células metabolicamente ativas, pela ação de enzimas dehidrogenases, e gerando produtos como o NADH e o NADPH. O composto de cor roxa formado intracelularmente (formazan) pode ser solubilizado e quantificado por métodos espectrofotométricos.

Após os tempos experimentais de 6 e 24 h do término do tratamento, as culturas celulares em placas de 96 poços foram incubadas com solução de MTT a 5 mg/mL em meio de cultivo DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibiótico, incubadas em estufa a 37 °C, 5% de CO₂ e 70-80% de umidade. Transcorridas 3 h de incubação, o meio de cultivo foi descartado e os cristais de formazan solubilizados com 150 µL de DMSO por poço. Após homogeneização dos cristais, foi realizada leitura de absorbância a 595 nm em espectrofotômetro (SpectraMax N5 – Molecular Devices). A viabilidade celular foi expressa em porcentagem, sendo normatizada em relação à absorbância avaliada no grupo controle.

3.4.6 Análise Morfológica

Após 1, 6 e 24 h do término do tratamento, as culturas celulares em placas de 12 poços foram avaliadas em microscópio de luz invertido com contraste de fase. Foram avaliados qualitativamente aspectos como densidade celular, volume celular, presença de condensação nuclear, adesividade à placa e às células circunvizinhas, bem como a presença de debris. Fotomicrografias foram capturadas utilizando o programa computacional Motic Image Plus 2.0 (Motic China Group CO., Ltd) em microscópio invertido (Zeiss Axioskop, II Alemanha) em objetiva de 25x com lente especial para contraste de fase.

3.3.7 Análise da (exposição) de fosfatidilserina A por citometria de fluxo

A fosfatidilserina A é um fosfolípídeo presente na face interna da membrana celular. A exposição da fosfatidilserina A ocorre durante o processo de apoptose. A anexina V é uma molécula que apresenta alta afinidade pela fosfatidilserina A, ligando-se a esta especificamente, emitindo fluorescência entre comprimentos de onda de 515-530 nm. A marcação positiva para o iodeto de propídeo, que ocorre pela emissão de fluorescência em comprimentos de onda entre 560-580 nm, por sua vez, ocorre quando há fragmentação da membrana celular. Isoladamente a

marcação com iodeto de propídeo não é indicativa de apoptose e pode estar associada à ocorrência de necrose celular. Casos em que ocorrem dupla emissão de fluorescência correspondentes tanto à exposição de fosfadilserina A quanto à fragmentação de membrana estão relacionados à morte celular pelo processo de necrose celular, associada à apoptose tardia.

Após os tempos experimentais pós-TFD de 6 e 24h, os sobrenadantes das culturas celulares em placas de 12 poços foram coletados e armazenados em microtubos de centrifugação. As células foram tripsinizadas (Tripsina-EDTA 0,25%) por três minutos e adicionadas nos microtubos de centrifugação que continham os respectivos sobrenadantes. Após a centrifugação por cinco minutos a 1100 rpm, os sobrenadantes foram removidos e as células ressuspensas em 100 μ L de tampão de ligação do kit Annexin-V-FITC (invitrogen – Molecular Probes). Foi adicionado 5 μ L de Anexina por microtubos e os mesmos foram incubados por 15 minutos no escuro. Transcorrido o tempo de incubação, às células foram adicionados 400 μ L de tampão de ligação e 1 μ L de solução de iodeto de propídeo (20 μ g/mL) imediatamente antes da leitura em citômetro de fluxo FlowMax®. Para a aquisição no equipamento, completou-se o volume para o total de 1 mL em tampão fosfato salina (PBS). Os canais de fluorescência selecionados foram FL1 – 530 nm para detecção de anexina V marcados e FL3 > 575 nm para detecção de iodeto de propídeo marcados. As análises foram feitas a partir da contagem de 10.000 eventos e os resultados percentuais expressos de acordo com o número total de eventos.

No mesmo experimento, a análise de tamanho e granulosidade de superfície das células foi obtida pela seleção de canais SSC e FSC em citômetro de fluxo FlowMax®. As análises foram feitas a partir da aquisição de 10.000 eventos e os resultados percentuais expressos de acordo com o número total de eventos.

3.5 EXPERIMENTAÇÃO *IN VIVO*

3.5.1 Animais

Os experimentos *in vivo* foram conduzidos em camundongos Balb/C fêmeas, com idades entre sete e 10 semanas de vida, e peso aproximado de 20 – 25 g. Os animais foram adquiridos do Biotério Central de Goiânia, na Universidade Federal de Goiânia – UFG. Sua manutenção se deu no biotério do Departamento de Morfologia e Morfogênese do Instituto de Biologia – IB, da Universidade de Brasília. Os animais permaneceram em gaiolas com temperatura controlada (23-24 °C), ciclo circadiano automatizado e filtragem de ar. A água e alimentação estavam disponíveis *ad libidum* em todo o tempo de experimentação. A condução da pesquisa foi autorizada pelo comitê de ética em pesquisa animal da Universidade de Brasília – UnB (Anexo A).

3.5.2 Indução Tumoral

A indução tumoral ocorreu após os camundongos atingirem entre sete e oito semanas de idade. Neste período, células 4T1 foram inoculadas na região de flanco esquerdo do animal. Sob anestesia geral com Ketamina 80 mg/kg e Xylasina 10 mg/kg, o volume de 50 µL de meio de cultivo DMEM sem suplementação contendo 2×10^4 células foi injetado via subcutânea. Os animais foram avaliados diariamente. Após os tumores atingirem volumes aproximados de 70-100 mm³ deu-se início aos tratamentos e análises. Os grupos experimentais foram divididos em animais Sadios (sem indução tumoral, n=10), animais Tumor (indução tumoral, sem tratamento, n=20) e animais TFD (indução tumoral, com tratamento com TFD mediada por AICIFc lipossomal, n=30).

3.5.3 Protocolo de Terapia Fotodinâmica

Após o crescimento tumoral, o protocolo de terapia fotodinâmica foi iniciado. Os animais foram submetidos à anestesia geral com Ketamina 80 mg/kg e Xylasina 10 mg/kg. O regime terapêutico empregado consistiu na injeção de AICIFc em formulação lipossomal em dose terapêutica de 10 mg/kg, via peritumoral. Após 15 minutos da injeção do fármaco, procedeu-se à irradiação do tumor. A irradiação foi feita em contato, com incidência do feixe luminoso perpendicular à superfície do tecido, de forma contínua com laser a 670 nm, 50 mW e dose total de irradiação foi de 72 J/cm². Este regime terapêutico foi realizado três vezes, com intervalo entre sessões de 72 horas.

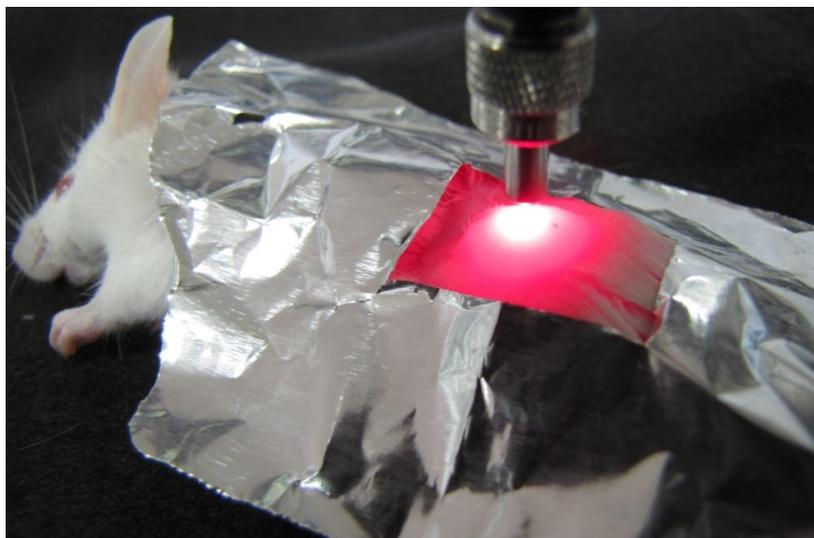


Figura 3.1. Modelo de aplicação da TFD. Irradiação tumoral após tempo de incubação com Alumínio-Cloro-Ftalocianina em formulação lipossomal no tratamento de câncer de mama induzido com linhagem 4T1.

3.5.4 Análise clínica

3.5.4.1 Peso corporal

Com o intuito de avaliar o impacto do protocolo terapêutico empregado na saúde geral, o peso dos animais foi avaliado desde a indução tumoral até o sacrifício. A medição foi realizada em balança de alta precisão e o peso comparado entre os grupos experimentais.

3.5.4.2 Volume tumoral

O volume tumoral dos animais foi avaliado com o objetivo de determinar a eficiência da Terapia Fotodinâmica mediada pela formulação lipossomal da AICIFc. A medição foi realizada com paquímetro de alta precisão e o volume determinado pela fórmula **(Comprimento) X (Largura²) X 0,5**, previamente descrita na literatura (74). Antes do início de cada sessão de tratamento e antes do sacrifício dos animais, os valores eram aferidos. Para normatizar a comparação entre grupos, optou-se por expressar a variação do volume tumoral levando-se em consideração os tamanhos iniciais de tumor de cada animal.

3.5.5 Análise histopatológica

Após 24 horas da última sessão de TFD, os animais do grupo Tumor e do grupo TFD foram sacrificados pelo mesmo protocolo anestésico da indução tumoral e os tumores foram coletados para análise histopatológica. Os tecidos foram dissecados e fixados em solução de Paraformaldeído 4% tamponado por 2 h a temperatura ambiente. Após o tempo de fixação, os órgãos foram submetidos a processamento histológico em equipamento Histo-Tec DM-20 (Oma, São Paulo, Brasil). Os tecidos foram emblocados em paraplast e os cortes histológicos

realizados em ultra-micrótomo RM2125RT (Leica, São Paulo, Brasil), com espessura de 5 μ M.

A coloração das lâminas foi realizada com Hematoxilina e Eosina (H&E) e as análises realizadas em microscópio óptico (Zeiss Axioskop II, Alemanha). As fotomicrografias foram capturadas com programa computacional Motic Image Plus 2.0 (Motic China Group CO, Ltd).

Foram observadas as seguintes características morfológicas: presença de células neoplásicas viáveis, presença de necrose tumoral, presença de infiltrado inflamatório, presença de edema, ruptura vascular e descamação epitelial. Em seguida, análises morfométricas foram realizadas com o objetivo de determinar a razão tecido tumoral sadio/tecido tumoral ablacionado, naqueles animais tratados pela TFD mediada por AICIFc em formulação lipossomal.

3.5.6 Análise de expressão de citocinas – ELISA

A análise da expressão de citocinas foi realizada para determinar o papel das mesmas na indução de resposta imune anti-tumoral. Após 6, 24 e 72 horas do término do regime terapêutico descrito anteriormente, os animais foram anestesiados, o sangue coletado por punção cardíaca e imediatamente centrifugado a 10000 rpm por 20 minutos, o soro foi então coletado e congelado a -80 °C para posterior análise. A análise de citocinas foi expressa em pg/ μ L de soro.

A homogeneização dos tecidos foi realizada com homogeneizador mecânico, com haste de 5mm e rotação a 30000 rpm em tampão de homogenato (300 mM sacarose; 100 mM EDTA; 0,3% Triton X-100; 1M KH₂PO₄; 20 mM Tris; coquetel de inibidores de protease - Roche; pH 7,4)., em gelo, no volume correspondente a 10 vezes o volume do órgão por até 3 minutos. Após a homogeneização, as amostras foram centrifugadas a 10000 rpm por 20 minutos e o sobrenadante coletado para dosagem de proteínas e análise de citocinas.

Após a homogeneização dos tecidos, as amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm por 20 minutos e o sobrenadante coletado para dosagem de proteínas e

análise de citocinas. A dosagem de proteínas das amostras de tecido tumoral foi realizada pelo método de Bradford, uma vez que a análise de citocinas nos tumores foi expressa em pg/mg de proteína.

Após todo o processamento dos tecidos e soro, os mesmos foram submetidos à análise das citocinas IL-10, IL-6, IL-1 β , TNF- α e TGF- β . Os protocolos experimentais foram de acordo com os kits de ELISA empregados (e-Bioscience e BD, Estados Unidos).

3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Após a coleta e tratamento dos dados, a análise estatística foi realizada em software GraphPad Prism versão 5.0, onde optou-se pela realização de teste paramétrico de variância ANOVA, seguido do pós-teste estatístico de Tukey. O índice de significância dos experimentos foi considerado $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1 EXPERIMENTAÇÃO IN VITRO

4.1.1 Toxicidade do fármaco no escuro

Após a incubação com concentrações crescentes do fármaco fotossensibilizador AICIFc em formulação lipossomal em células 4T1, pelo tempo de 24h, pôde-se observar ao teste de MTT, uma redução estatisticamente significativa na viabilidade celular em todas as concentrações estudadas quando comparadas à viabilidade aferida nas células Controle. A redução na viabilidade celular variou entre a faixa de 20% para as concentrações de 0,31 e 0,62 μM e 35% para a maior concentração estudada, no caso, 5 μM (figura 4.1).

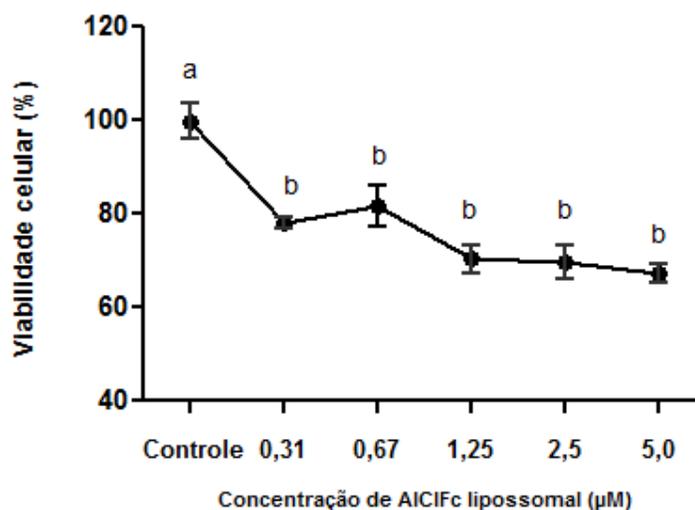


Figura 4.1. Toxicidade no escuro do fármaco AICIFc em formulação lipossomal em diferentes concentrações em células 4T1, derivadas de carcinoma mamário murino,. Análise estatística: Teste de Tukey, $p < 0,05$.

4.1.2 Internalização do fármaco por células 4T1

Após a incubação das células 4T1 com o fotossensibilizador AICIFc em formulação lipossomal, pôde-se observar aumento gradativo da concentração de fármaco, atingindo pico de internalização 30 minutos após o início da incubação. Neste tempo, observou-se a internalização de aproximadamente 40% da concentração inicial estimada de AICIFc em formulação lipossomal a 5 μ M. Esta concentração foi estatisticamente significativa quando comparada aos valores de 20 e 21% encontrados respectivamente após cinco e 15 minutos de incubação. Pôde-se observar, ainda, um decaimento da internalização 60 minutos após o início da incubação para aproximadamente 34%, não sendo este valor estatisticamente significativo em relação ao tempo de 30 minutos, permanecendo, porém, estatisticamente superior em relação aos dois tempos iniciais observados (figura 4.2).

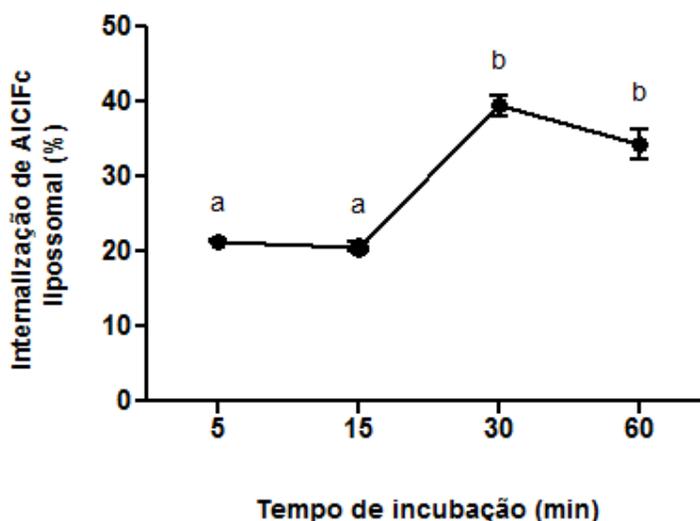


Figura 4.2. Internalização do fármaco AICIFc lipossomal *in vitro* em células 4T1. Imediatamente após a incubação, pode-se observar a internalização de 20% do fármaco. Após 30 minutos, 40% do fármaco é detectado por espectrofluorimetria. Após 60 minutos, há decaimento da concentração de fármaco no interior das células. Em ambos os tempos, 30 e 60 minutos, a concentração de AICIFc em formulação lipossomal é estatisticamente superior em relação aos demais tempos experimentais de cinco e 15 minutos. Análise estatística: Teste de Tukey, $p < 0,05$.

4.1.3 Localização intracelular do fármaco

Após a determinação do tempo ideal de incubação para o andamento da TFD, optou-se por avaliar a localização intracelular do fármaco AICIFc em formulação lipossomal, uma vez que essa informação é determinante para a eficiência da TFD, pois determina o sítio primário de dano celular após a irradiação com luz em comprimento de onda específico e, conseqüentemente, pré-determina a via de morte celular induzida.

Na figura 4.3. é possível notar os resultados obtidos após a análise em microscópio confocal, com marcadores celulares de núcleo e citoplasma associado à fluorescência intrínseca do fármaco fotossensibilizador.

Após 30 minutos de contato com a linhagem celular derivada de carcinoma mamário murino – 4T1, pode-se observar grande acúmulo do fármaco AICIFc em formulação lipossomal a 5 μ M no interior das células. Nota-se difusão do fármaco em toda extensão citoplasmática, observado pela emissão de fluorescência vermelha na figura 4.3.coluna 2C. Há maior concentração de fluorescência na região perinuclear (figura 4.3. coluna 2D), sugestivo de acúmulo preferencial em estruturas como retículo endoplasmático e complexo de Golgi, associado a diversos pontos de emissão espalhados no citoplasma, característico de lisossomos.

Não houve acúmulo nuclear do fármaco (figura 4.3. colunas 2C e 2D). Paralelamente ao acúmulo do fármaco fotossensibilizador, ao comparar às células Controle, observa-se que não há alteração morfológica tanto no citoplasma, que se mantém íntegro, quanto no núcleo, com nucléolos evidentes (figura 4.3. coluna 2A).

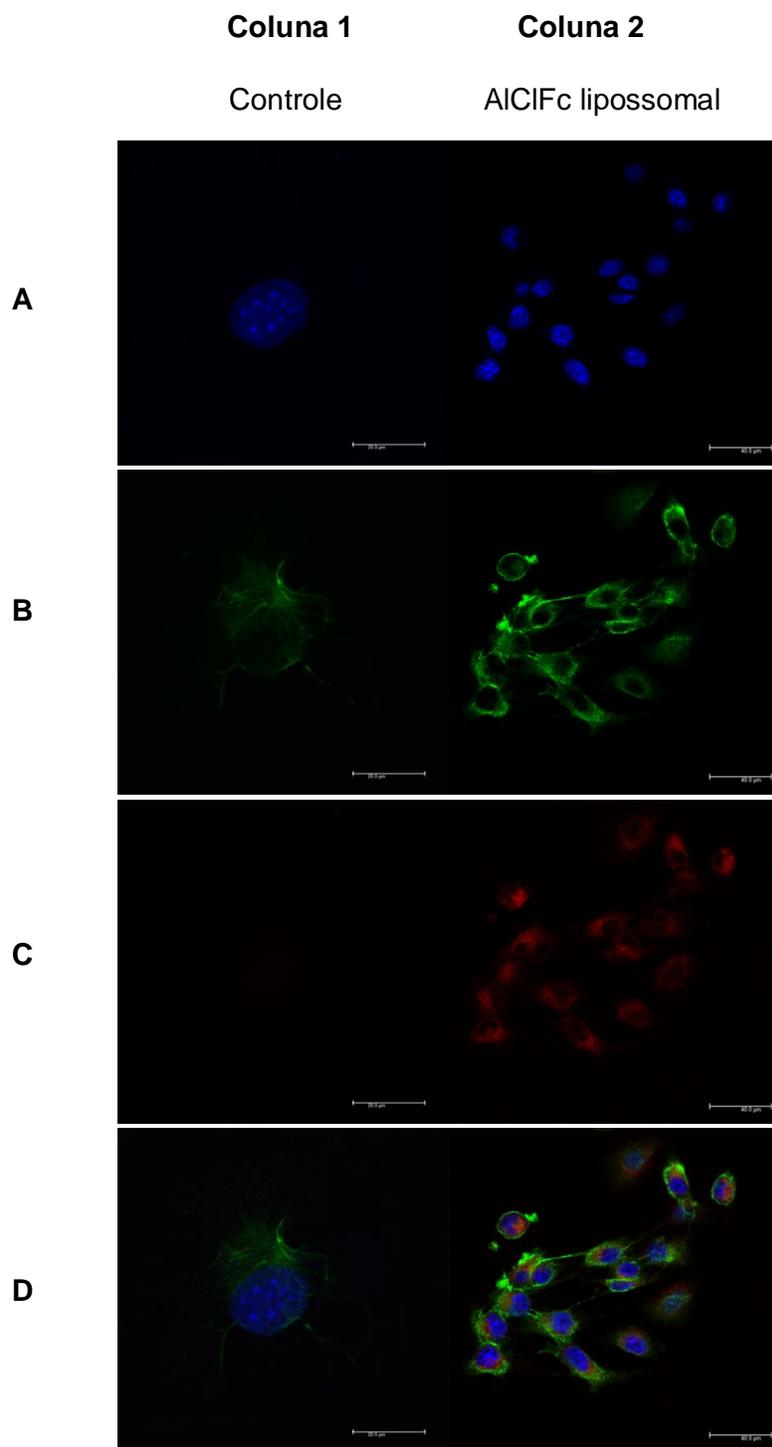


Figura 4.3. Localização intracelular do fármaco AICIFc lipossomal a 5 μ M após 30 minutos de incubação em células de carcinoma mamário murino - 4T1. Coluna 1, célula Controle. Coluna 2, células incubadas com o fármaco. Em A, marcador nuclear - Hoescht; em B, marcador citoplasmático - Alexa; em C, AICIFc em formulação lipossomal; em D, sobreposição de marcações. É evidente a internalização massiva de fármaco fotossensibilizador, intracelularmente difundido no citoplasma, com acúmulo sugestivo de compartimentos lisossomais e reticulares nas células tratadas.

4.1.4 Efeitos da Terapia Fotodinâmica

4.1.4.2 Viabilidade celular

A avaliação da citotoxicidade celular após a TFD mediada por AICIFc em formulação lipossomal a 5 μM foi realizada separadamente para os diferentes grupos experimentais pelo método de MTT. Dois tempos experimentais pós-TFD foram determinados – 6 e 24 horas - com o intuito de avaliar os efeitos iniciais e tardios pós-tratamento.

A viabilidade celular dos grupos experimentais foi determinada em função da absorbância observada no grupo Controle, sendo, portanto expressos percentualmente em relação a este (figura 4.4.).

Seis horas após a experimentação, pôde-se observar redução na viabilidade celular no grupo tratado somente com o fármaco fotossensibilizador a 5 μM por 30 minutos. A redução em 15,2% na viabilidade das células 4T1 neste tempo não foi estatisticamente significativa quando comparada ao grupo Controle. Em contrapartida, 24h após o tratamento isolado com fármaco fotossensibilizador houve um aumento na morte celular para 36,04%, sendo este resultado estatisticamente significativo em relação ao grupo Controle, em ambos os tempos experimentais.

Outro componente da TFD avaliado isoladamente no teste de viabilidade celular foi a irradiação das células 4T1 com dosagem de 4,25 J/cm^2 . Pôde-se observar no tempo experimental pós-TFD de 6h, um aumento da viabilidade de 15% comparativamente aos grupos Controles (6 e 24h) não sendo, entretanto, estatisticamente significativo. Após 24 horas da TFD não foi observada alteração na viabilidade celular de 4T1 em relação aos grupos Controles.

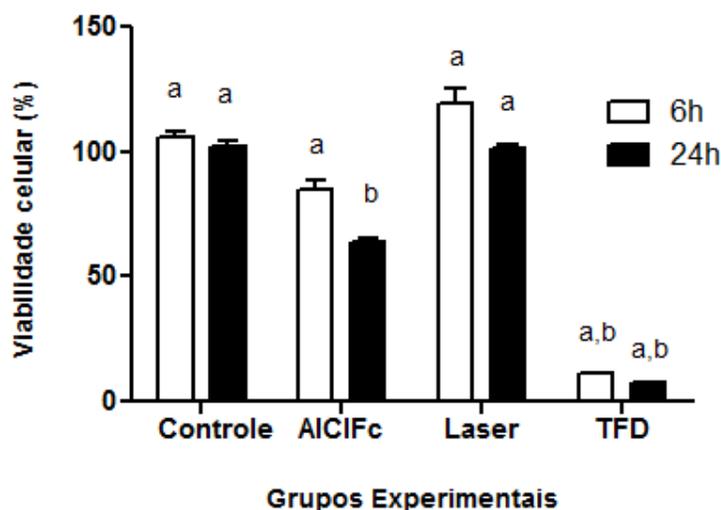


Figura 4.4. Viabilidade celular pelo teste MTT em células 4T1 em diferentes grupos experimentais. Há redução estatisticamente significativa no grupo de células tratadas com TFD para níveis entre 11 e 7,2% nos tempos experimentais pós-TFD de 6 e 24h respectivamente. Também há redução significativa de 36,04% na viabilidade celular após 24h do tratamento com a incubação do fármaco AICIFc em formulação lipossomal isoladamente. Análise estatística: Teste de Tukey, $p < 0,05$.

No grupo TFD, pôde-se observar a redução drástica da viabilidade celular tanto nos tempos experimentais de 6h quanto de 24 horas pós tratamento, com índices de 89,96% e 92,72%, respectivamente (figura 4.4). Estes valores foram estatisticamente significativos a todos os demais grupos experimentais, nos diferentes tempos pós-TFD estudados, comprovando a eficiência da TFD mediada por AICIFc lipossomal na ablação de células tumorais derivadas de carcinoma mamário murino – 4T1.

4.1.4.3 Morfologia celular

Para a caracterização das alterações morfológicas das células 4T1 dos diferentes grupos TFD e Tumor, foram realizadas fotomicrografias por contraste de fase em diferentes tempos experimentais: 1, 6 e 24 h pós tratamento.

Na figura 4.5. é possível observar a caracterização morfológica de células tanto do grupo Controle como do grupo TFD. Uma hora após o tratamento, pode-se

observar densidade celular semelhante em ambos os grupos experimentais, entretanto é possível constatar redução do volume celular devido à retração citoplasmática das células do grupo TFD, bem como perda inicial de adesão à superfície da placa e também com outras células, comparativamente ao grupo Controle.

Seis horas após o tratamento, a diferença entre as densidades celulares se acentua, com ligeiro aumento da mesma no grupo Controle e redução no grupo TFD. É possível também avaliar a acentuação das alterações morfológicas quando comparadas com o mesmo grupo experimental no tempo de 1h e a presença de condensação nuclear nas células do grupo TFD.

Após 24 horas do tratamento, a diferença entre as densidades celulares é ainda mais evidente. As células do grupo Controle proliferaram continuamente até este tempo experimental pós-TFD, permanecendo fortemente aderidas à placa de cultura e também umas às outras. É possível observar o formato estrelado, com projeções do citoplasma, presença de núcleo e múltiplos nucléolos evidentes e tamanho aproximado de 15 μm . Em contrapartida, a fotomicrografia das células do grupo TFD 24h após o tratamento evidencia a morte celular de um número considerável de células, resultando em redução significativa da densidade celular e do volume celular, perda total de adesão e contato entre células, presença de debris celular, rugosidade na membrana citoplasmática e fragmentação nuclear, evidenciando a eficiência da TFD mediada pelo fármaco AICIFc em formulação lipossomal na indução de morte celular e corroborando os níveis de viabilidade anteriormente encontrados no ensaio de MTT.

Para corroborar a análise morfológica por meio da microscopia óptica por contraste de fase, as análises por citometria de fluxo de tamanho e granulosidade celular também foram realizadas. Como pode ser observado nos histogramas (figura 4.6.), há um deslocamento da população celular com redução significativa no volume celular e também na granulosidade de superfície das células do grupo TFD, principalmente 24h após o tratamento, evidenciada pela diferença entre as populações de volume normal (Q2) encontrada no grupo Controle (90,16%) comparada ao grupo TFD (59,54%), dos 10.000 eventos avaliados. Tais achados confirmam a análise morfológica realizada por microscopia de luz e confirmam,

juntamente com os resultados apresentados anteriormente, a efetividade da TFD na mediação de morte celular de células derivadas de carcinoma mamário murino, 4T1.

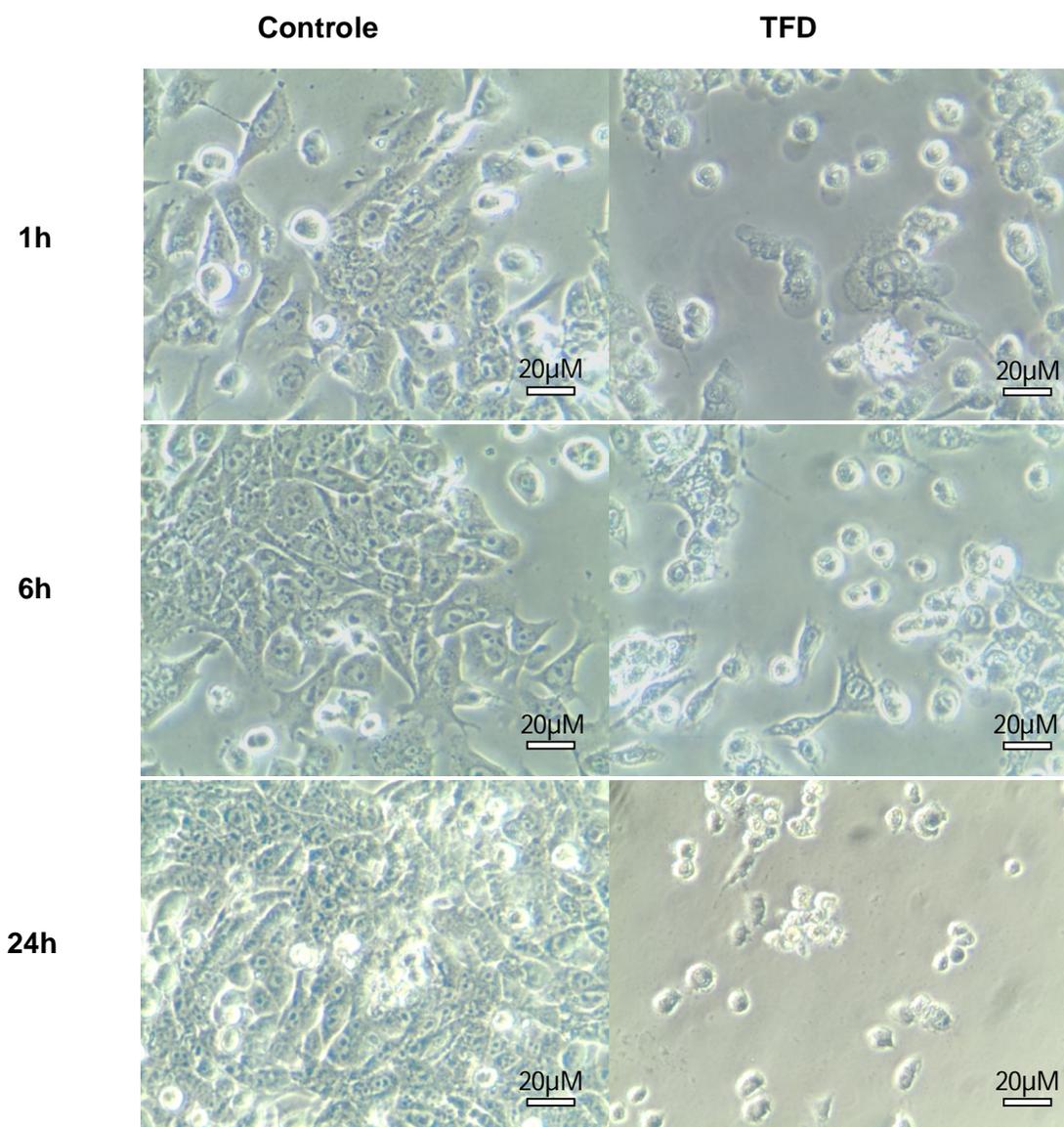


Figura 4.5. Análise morfológica de células 4T1 por microscopia óptica de contraste de fase. É possível observar redução do número de células no grupo TFD, acentuada pela proliferação constante das células do grupo Controle. Com o decorrer do tempo após a TFD, é possível observar perda de adesão celular, redução no volume e projeção citoplasmática, condensação nuclear e presença de debris, características essas de morte celular.

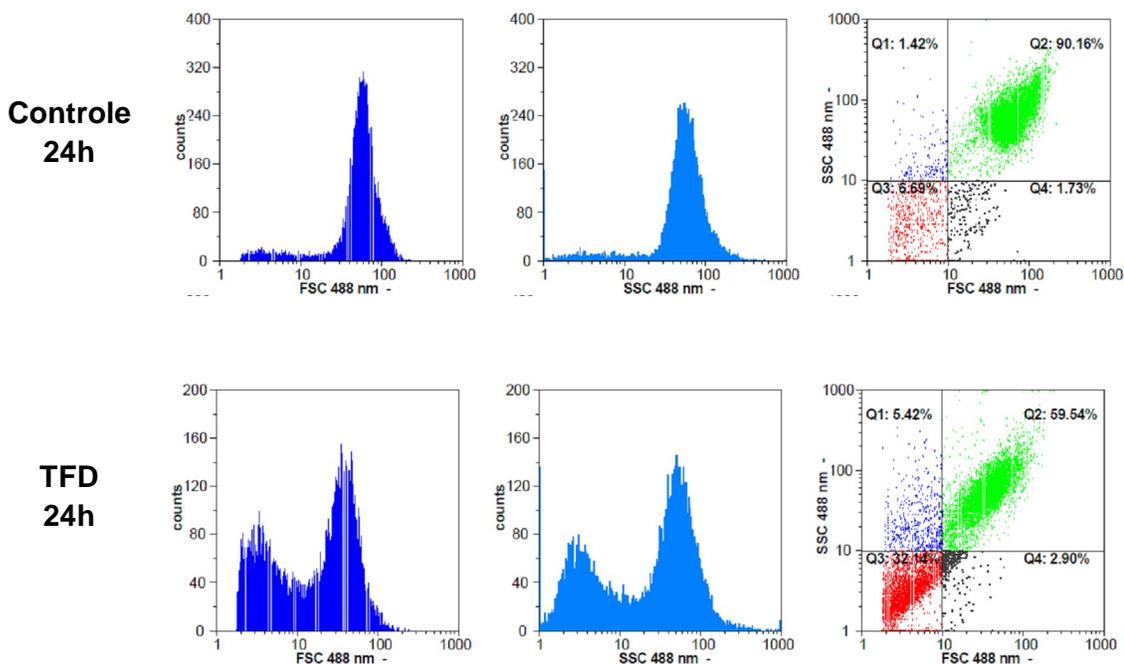


Figura 4.6. Análise de tamanho e granulosidade celular por citometria de fluxo. Há nítido deslocamento da população de células 4T1 do quadrante Q2 para o quadrante Q3, evidenciando a redução simultânea tanto no tamanho das células quanto na sua granulosidade de superfície após 24h do tratamento por TFD mediada por AICIFc em formulação lipossomal.

4.1.4.4 Morte celular

Pode-se observar, na figura 4.7 tanto seis quanto 24h após o tratamento que, células derivadas de carcinoma mamário murino são duplamente marcadas tanto com Anexina V, como com iodeto de propídeo, sendo este resultado estatisticamente significativo em relação ao grupo Controle, onde não é possível observar os processos supracitados. A observação desse resultado, associada aos testes de localização intracelular do fármaco, viabilidade celular e análise morfológica sugerem a ocorrência de ambos os processos, apoptose e necrose, com predominância da última, dada a rápida ocorrência de morte celular em quantidades expressivas, maiores que 90%.

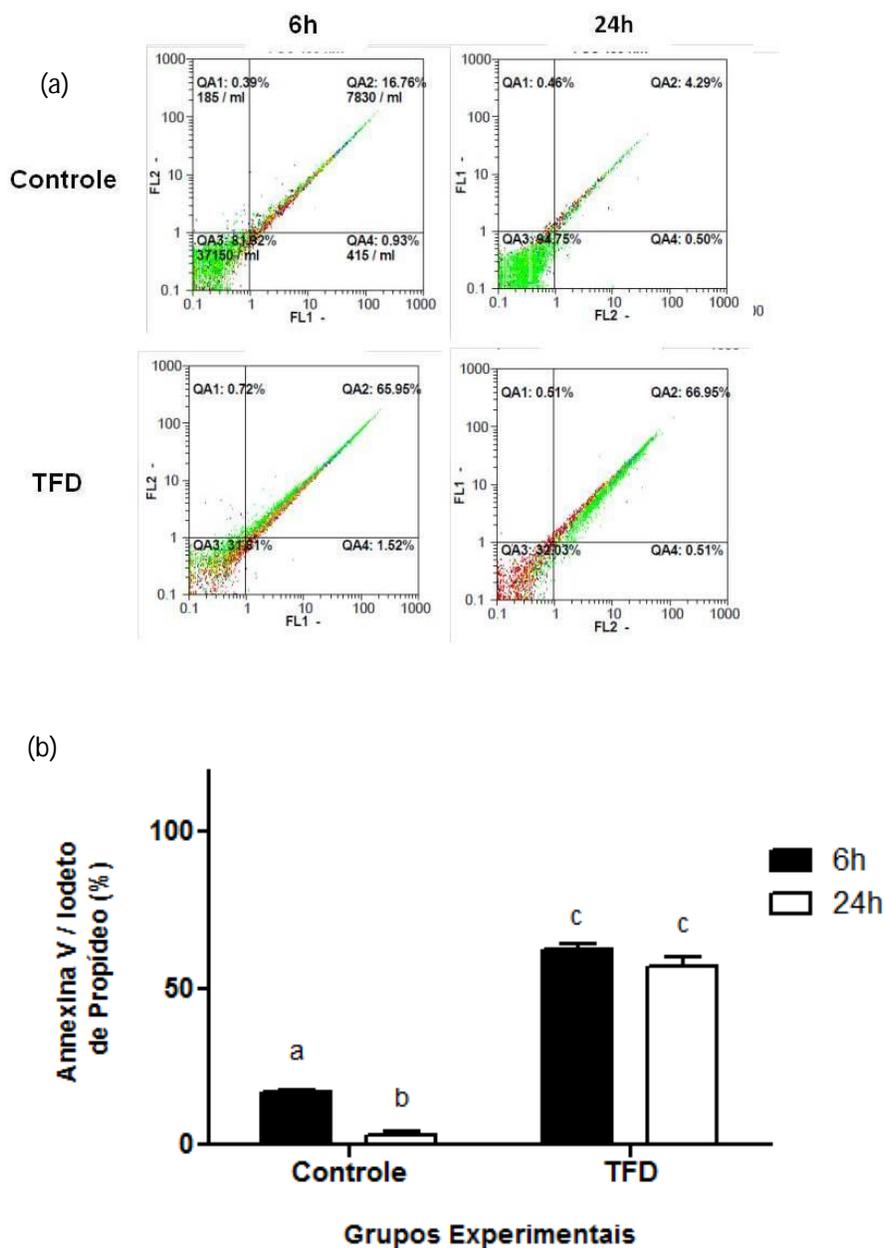


Figura 4.7. (a) Análise de exposição de fosfatidilserina A e fragmentação de DNA por citometria de fluxo. É possível observar no histograma os valores representativos da dupla marcação com Anexina V e iodeto de propídeo respectivamente, no Quadrante 2 (Q2) nos grupos Controle (acima) e TFD (abaixo). (b) O gráfico demonstra que os valores percentuais da razão Anexina V/Iodeto de Propídeo obtidos no grupo TFD são estatisticamente significativos em relação ao grupo Controle nos dois tempos experimentais pós-TFD, confirmando a morte celular por necrose imediata e apoptose tardia. Análise estatística: Teste de Tukey, $p < 0,05$.

4.2 EXPERIMENTAÇÃO *IN VIVO*

4.2.1 Análise clínica

Como pode ser observado na figura 4.8, todos os grupos experimentais avaliados, animais Sadios – sem tumor, animais Tumor - com tumor, sem tratamento e animais TFD – com tumor e com tratamento por TFD, apresentaram peso inicial médio de 18 g, compatível com a raça Balb/C com sete semanas de idade. A partir do 13º dia após indução tumoral houve aumento na pesagem dos três grupos experimentais para média de 21 g. Após a segunda sessão de TFD, houve pequeno aumento no peso corporal dos animais tratados pela TFD, não sendo, entretanto, estatisticamente significativo em relação aos demais, mantendo-se estável até a morte dos animais. Em contrapartida, os animais sem tumores e com tumores não tratados apresentaram ligeira queda de peso corporal no 16º dia após a indução, recuperando a pesagem normal no 19º dia, não sendo esse resultado estatisticamente significativo. Não foi observado debilidade ou presença de dor nos animais.

A análise do volume tumoral demonstrou grande diferença entre o grupo de animais com tumor sem tratamento e o grupo de animais com tumor submetidos ao tratamento mediado pela TFD com AICIFc em formulação lipossomal. Nos animais com tumor e sem TFD, como pode ser observado na figura 4.9, partindo-se da média de 100 mm³, correspondente ao 13º dia após a indução tumoral, pode-se notar um aumento de aproximadamente 40% no volume tumoral no 16º dia e, um aumento de mais de 60% após o 19º dia. Em contrapartida, o grupo de animais submetidos a tratamento com TFD mediada por AICIFc em formulação lipossomal, pode-se observar que após a 1ª sessão de TFD, houve decréscimo de 7-10% no volume tumoral, seguido de pequeno aumento do volume após a última sessão de tratamento, retornando aos valores aproximados do início da aplicação da terapia.

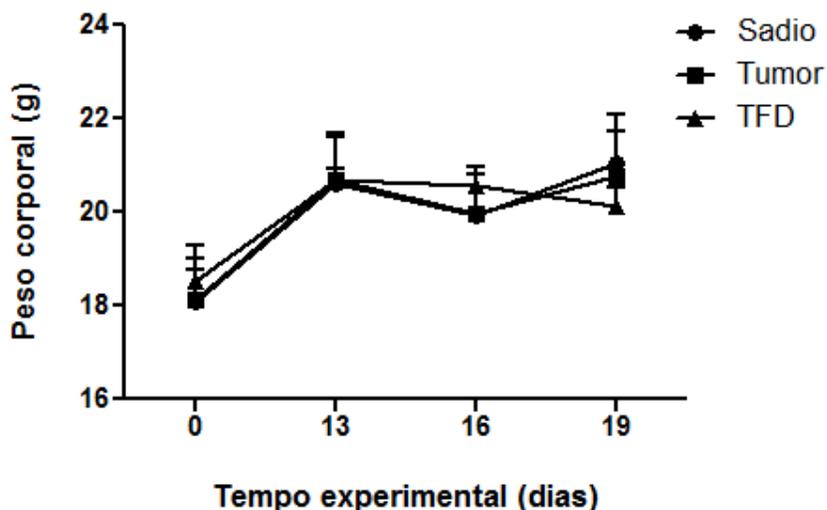


Figura 4.8. Avaliação da variação do peso corporal desde a indução tumoral até a última sessão de tratamento. Em todos os grupos experimentais, observou-se ganho de peso corporal compatível com raça e idade dos animais. Não houve alteração estatisticamente significativa entre os mesmos nos tempos experimentais correspondentes. Análise estatística: Teste de Tukey, $p < 0,05$.

Apesar de não promover uma redução significativa do volume tumoral *per se*, comparativamente ao perfil de desenvolvimento tumoral dos animais não tratados, a TFD mediada pela AICIFc em formulação lipossomal apresentou resultado expressivo na inibição de crescimento tumoral, sendo a diferença dos volumes observados no 19º dia após a indução tumoral estatisticamente significativa entre o grupo sem tratamento e o grupo submetido à TFD.

Após a dissecação tumoral, pôde-se observar os efeitos anti-vasculares promovidos pela TFD mediada por AICIFc em formulação lipossomal. É claramente notado, na figura 4.10, a riqueza de vasos neoformados em tumores de animais não submetidos a tratamento, comparativamente aos animais submetidos à TFD. Neste último, há nítido aspecto de ablação vascular, com minimização expressiva de irrigação tumoral.

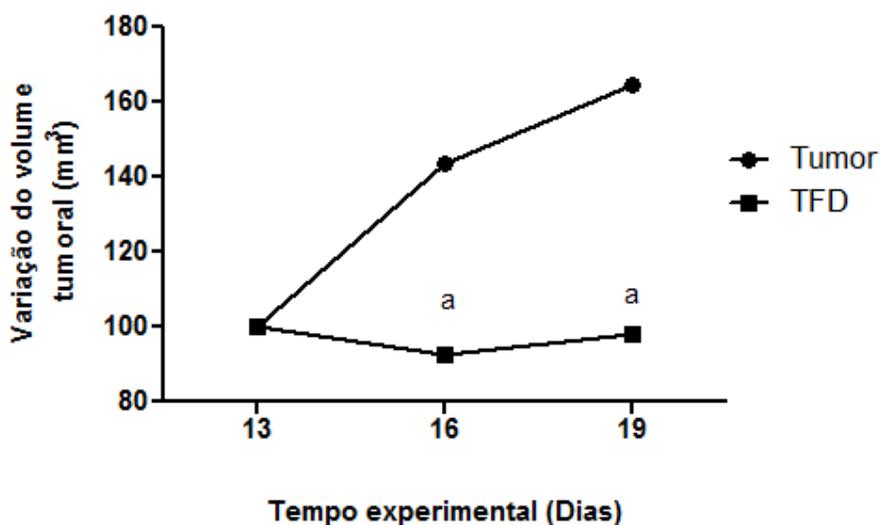


Figura 4.9. Avaliação da variação do volume tumoral desde a indução tumoral até a última sessão de tratamento. Pode-se observar crescimento exponencial nos tumores sem tratamentos com o decorrer dos dias, ao passo que os animais submetidos à TFD obtiveram significativa contenção nos mecanismos de crescimento tumoral - a. Análise estatística: Teste de Tukey, $p < 0,05$

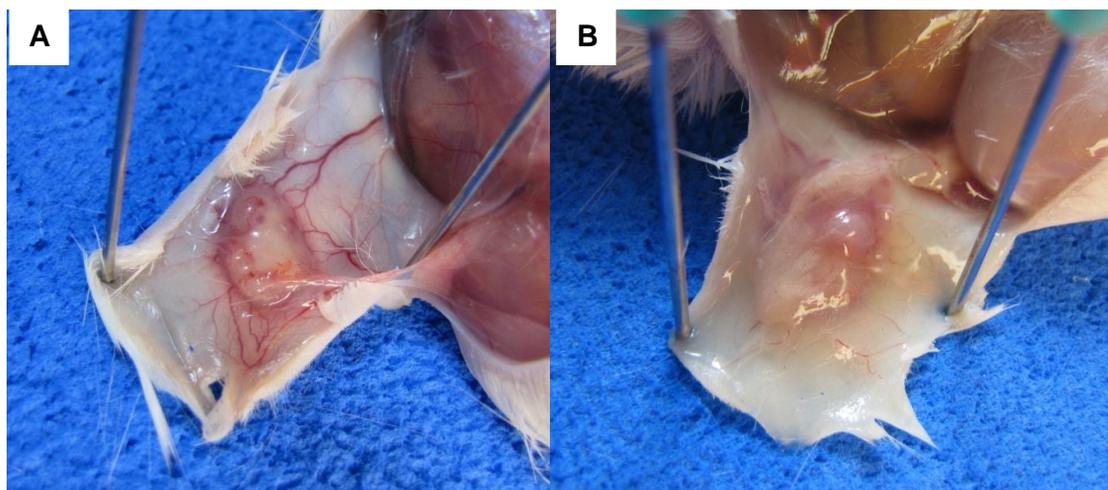


Figura 4.10. Análise macroscópica de vascularização tumoral. Em A, tumor de animal sem tratamento, amplamente vascularizado. Em B, tumor de animal submetido à TFD mediada por AICIFc em formulação lipossomal, com nítida ablação vascular.

4.2.2 Análise histopatológica

Após a confirmação clínica da efetividade da TFD mediada por AICIFc em formulação lipossomal, os tecidos tumorais de ambos os grupos experimentais foram submetidos à análise histopatológica por microscopia óptica (figura 4.11). Comparativamente aos tumores não tratados, onde pode-se observar um lençol de células tumorais circunscrito por inúmeros vasos sanguíneos neoformados, nos tumores tratados pela TFD pode-se observar nítida separação de células viáveis de células necróticas (atingidas pela TFD), caracterizando um processo central de necrose por coagulação com grandes áreas de hemorragia e edema, bem como a ablação vascular caracterizada pelo extravasamento de eritrócitos em todo o leito tumoral.

Adicionalmente à morte celular direta observada pela indução de necrose e à lesão vascular observada pelas áreas de hemorragia, observa-se o terceiro mecanismo de ação da TFD pela presença de células de infiltrado inflamatório adjacentes às áreas necróticas, caracterizada principalmente pela presença de linfócitos, inexistentes nos achados histológicos do grupo Tumor.

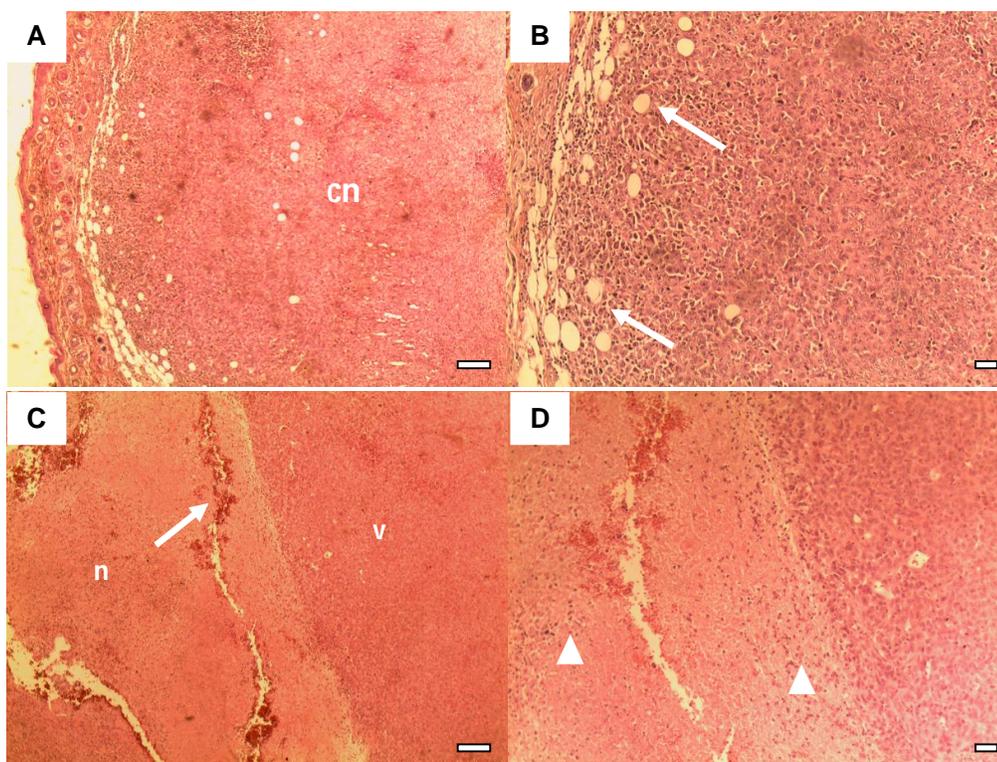


Figura 4.11. Análise histopatológica dos tecidos tumorais de animais do grupo Tumor (A e B) e animais tratados pela TFD mediada por AICIFc em formulação lipossomal (C e D). Coloração pelo método de H&E. Em A e B, pode-se observar maciço de células neoplásicas (cn) associadas à rica vascularização adjacente (seta). Pode-se observar em C e D, linha nítida entre células viáveis (v) e a grande área de necrose por coagulação (n), associada à ablação vascular, com inúmeras áreas de edema e hemorragia (seta). Pode-se observar também, presença de infiltrado de células inflamatórias no leito tumoral atingido pela TFD (ponta de seta). Em A e C, barra de 40 μ m. Em B e D, barra de 30 μ m.

4.2.3 Expressão de citocinas

A avaliação procedeu-se tanto para citocinas associadas a processos imunossupressores, como IL-10 e TGF- β quanto para citocinas associadas à inflamação e indução de resposta imunológica, como IL-1 β , IL-6 e TNF- α .

Como pode ser observado na figura 4.12, os níveis de IL-1 β no tecido tumoral sem tratamento permaneceu em níveis basais de 18,79 pg/mg de proteína, ao passo que houve aumento nos tecidos tumorais de animais submetidos à TFD mediada por AICIFC em formulação lipossomal nos tempos de 6, 24 e 72h para 68,56 ; 42,45 e 50,08 pg/mg de proteína, respectivamente, sendo os valores de 6 e 72h estatisticamente significativos em relação ao grupo com tumor sem tratamento. O mesmo padrão de expressão foi observado nos níveis tumorais de TNF- α , também conhecida uma citocina imunoestimulatória. Os níveis tumorais dos animais submetidos à TFD mediada por AICIFc em formulação lipossomal atingiram um pico de 122,79 pg/mg de proteína 6h após o tratamento, seguida de redução no tempo seguinte de 24h para aproximadamente 37,78 pg/mg de proteína e novamente um aumento na expressão 72h para níveis de 85,09 pg/mg de proteína. Comparativamente ao grupo de animais com tumor sem tratamento, cujos níveis se mantiveram em 26,24 pg/mg de proteína, as mensurações obtidas no grupo TFD 6 e 72h após o tratamento foram estatisticamente significativas.

Não foram detectáveis os níveis séricos de ambas as citocinas IL-1 β e TNF- α , em ambos os grupos experimentais

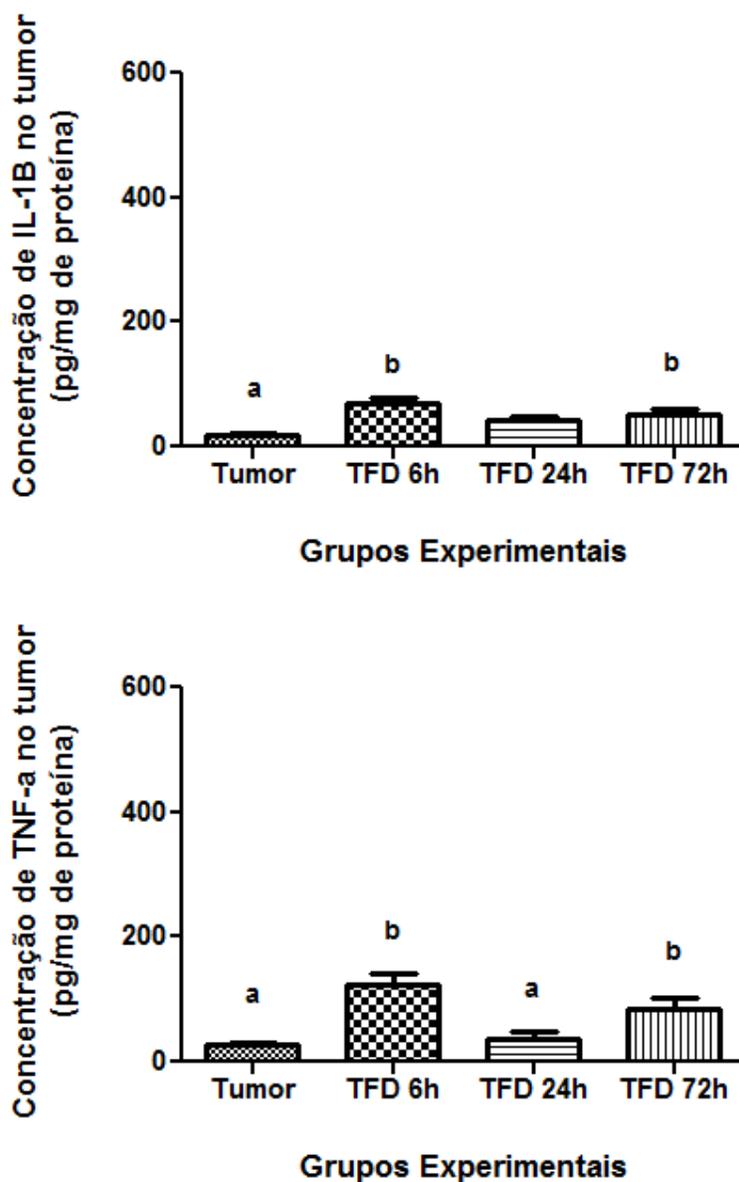


Figura 4.12. Expressão de IL-1 β e TNF- α em tecido tumoral. Houve aumento estatisticamente significativo na expressão de ambas as citocinas 6h e 72h após a última sessão terapêutica de TFD mediada por AICIFc em formulação lipossomal, comparada ao grupo controle. b estatisticamente significativo em relação a a. Análise estatística: Teste de Tukey, $p < 0,05$.

Ainda na família de citocinas conhecidamente inflamatórias, procedeu-se à análise de IL-6, amplamente descrita na indução de resposta imunológica anti-tumoral. Como pode ser observado na figura 4.13, os níveis de IL-6 são naturalmente maiores comparativamente aos observados para IL-1 β e TNF- α , o que

já é descrito na literatura. O tecido tumoral sem tratamento expressou níveis médios de 444,69 pg/mg de proteína, enquanto os níveis encontrados nos animais submetidos à TFD mediada por AICIFc em formulação lipossomal não alteraram significativamente em relação aos tumores não tratados, permanecendo nos níveis de 381,99 pg/mg de proteína 6h após a TFD, 471,30 pg/mg de proteína 24h após a TFD e decrescendo 72h após a TFD aos níveis de 373,12 pg/mg de proteína. Tais alterações não foram estatisticamente significativas entre si.

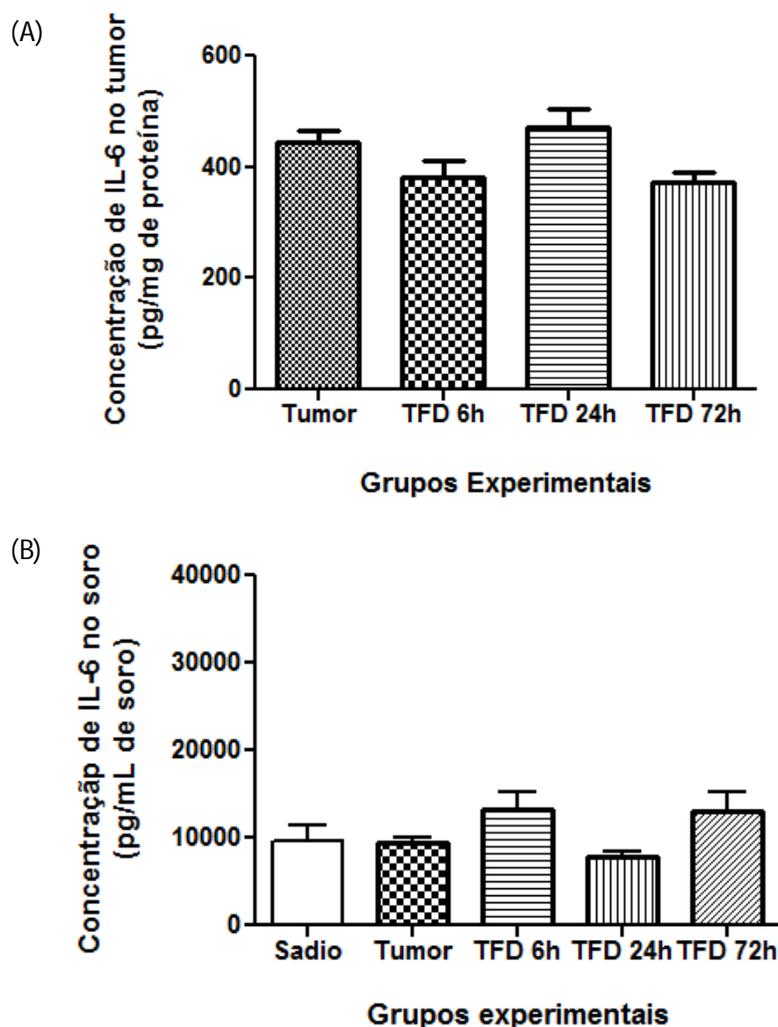


Figura 4.13. Expressão de IL-6 local (A) e sistêmico (B). Não houve diferença estatisticamente significativa entre os diferentes grupos experimentais tanto nos níveis tumorais quanto nos níveis séricos. Análise estatística: Teste de Tukey, $p < 0,05$.

Os níveis séricos de IL-6 foram passíveis de mensuração não sendo estatisticamente significativos entre os diferentes grupos experimentais estudados. Os animais sem tumor apresentaram níveis séricos de 9.709 pg/mL de soro, ao passo que os animais com tumor, sem tratamento apresentaram níveis similares de 9.503 pg/mL de soro. Os níveis de IL-6 observados nos animais tratados pela TFD variaram, com aumento para 13.226 pg/mL de soro 6h após, decaindo para níveis basais de 7.853 pg/mL de soro 24h após a TFD e sofrendo novamente um aumento para 12.945 pg/mL de soro 72h após a TFD.

Na análise da expressão de citocinas com caráter imunossupressor foram avaliados os níveis locais tumorais e séricos de IL-10 e TGF- β . A partir da figura 4.14, pode-se observar a expressão de IL-10. No tumor, não foram observadas variações de expressão, permanecendo em níveis aproximados de 104,9 pg/mg de proteína nos animais com tumor sem tratamento. Nos animais submetidos à TFD mediada por AICIFc em formulação lipossomal, foram observados níveis de 90,9 pg/mg de proteína 6h após a TFD, 133,23 pg/mg de proteína 24h após a TFD e decaindo novamente para 107,72 pg/mg de proteína 72h após a última sessão de TFD. As variações observadas nos grupos experimentais não foram, portanto, estatisticamente significativas entre si.

Quanto aos níveis séricos de IL-10, assim como os de IL-6, os animais sadios apresentaram níveis de 19.047 pg/mL de soro, similarmente aos animais com tumor sem tratamento, que expressaram 19.549 pg/mL de soro de IL-10. Os animais submetidos à TFD apresentaram aumento inicial, em 6h, para 22.037 pg/mL de soro, não sendo essa variação estatisticamente significativa, decaindo aos níveis basais nos tempos de 24 e 72h pós TFD para valores de 19.299 e 20.818 pg/mL de soro, respectivamente.

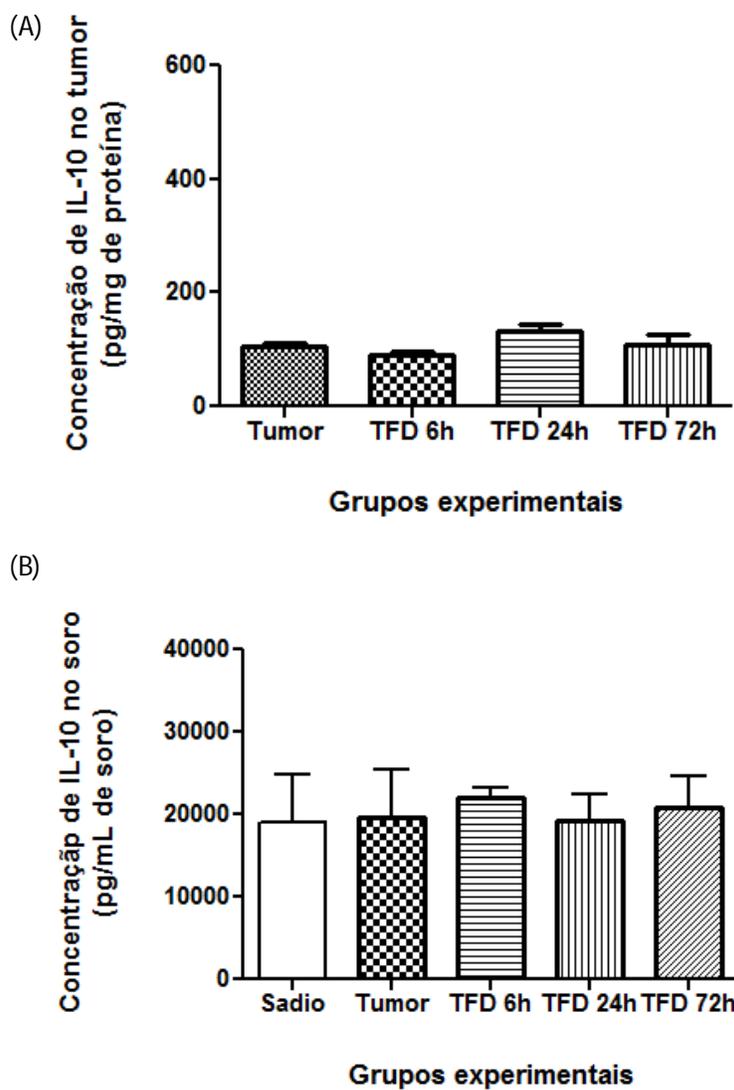


Figura 4.14. Expressão de IL-10 local (A) e sistêmico (B). Não houve diferença estatisticamente significativa entre os diferentes grupos experimentais tanto em níveis locais tumorais quanto nos níveis sistêmicos séricos. Análise estatística: Teste de Tukey, $p < 0,05$.

A expressão de TGF- β sofreu alteração significativa nos animais submetidos à TFD, principalmente tardiamente à última sessão de TFD mediada por AICIFc em formulação lipossomal, no período de 72h (figura 4.15). Neste tempo experimental, a expressão de TGF- β foi de 104,52 pg/mg de proteína, três vezes maior que a observada nos animais com tumor, sem tratamento, cujo valor aferido foi de 35,23 pg/mg de proteína. Intermediariamente, 6h e 24h após a TFD foram aferidos níveis de 50,4 e 69,67 pg/mg de proteína, respectivamente. Dos valores observados, a diferença estatisticamente significativa foi provada somente no grupo de TFD 72h, comparativamente ao grupo Tumor e ao grupo TFD 6h. Notadamente, é possível observar um aumento gradativo da expressão de TGF- β com o decorrer do tempo após a última sessão de TFD mediada por AICIFc em formulação lipossomal.

A nível sistêmico, os animais sadios, como esperado, apresentaram níveis basais de expressão de TGF- β , em torno de 1.817 pg/mL de soro. Os animais com tumor, sem tratamento, apresentaram níveis aumentados à terça parte, sendo aferidos 6.383 pg/mL de soro. Similarmente, a TFD não alterou significativamente a expressão de TGF- β nos dois tempos iniciais de avaliação em relação ao grupo com tumor e sem tratamento, permanecendo em 6.929 pg/mL de soro 6h após a TFD e 6.577 pg/mL de soro 24h após a TFD. Os níveis aferidos 72h após a TFD foram de 3.298 pg/mL de soro, Apesar da variação grande no tempo tardio de avaliação da TFD, nenhuma diferença estatisticamente significativa foi observada.

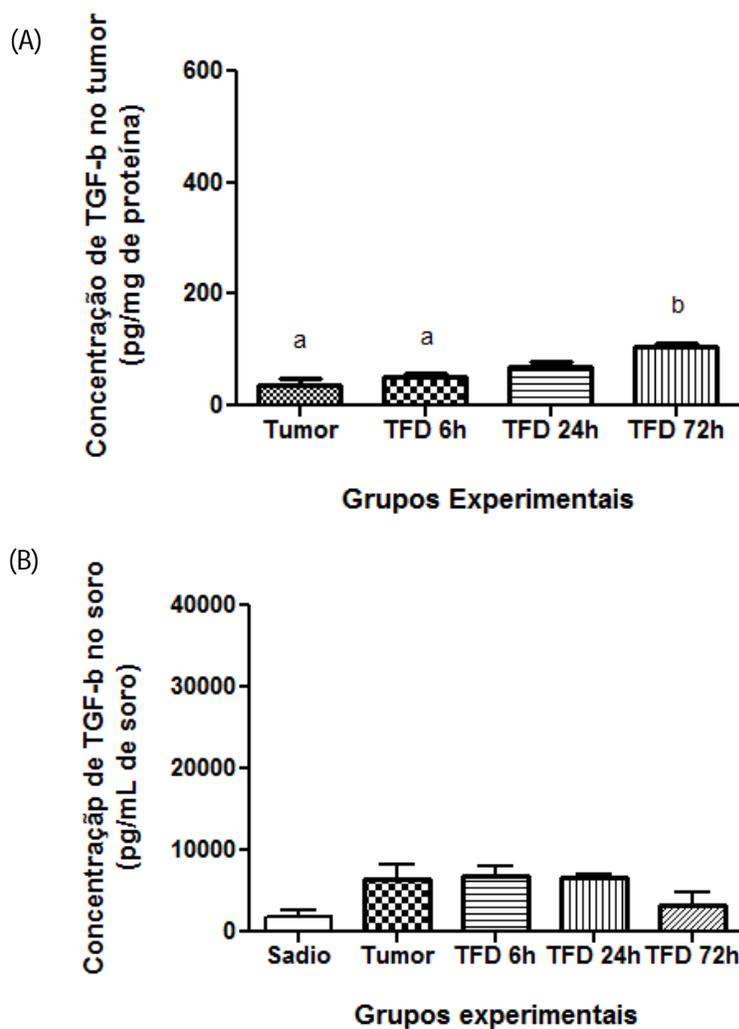


Figura 4.15. Expressão de TGF- β local (A) e sistêmico (B). Sistemicamente não houve diferença estatisticamente significativa, entretanto, a nível tumoral, pode-se observar aumento gradativo da expressão de TGF- β com o decorrer do tempo após a aplicação da última sessão de TGF- β . Sendo a expressão no tempo de 72h estatisticamente significativa se comparado ao tecido tumoral e ao grupo TFD 6h. Análise estatística: Teste de Tukey, $p < 0,05$

5. DISCUSSÃO

O desenvolvimento e aplicação de fármacos exigem estudos *in vitro*, que determinam, de forma inicial - por se tratar de um sistema isolado, a aplicabilidade da nova formulação e conseqüentemente a continuidade das avaliações. A formulação lipossomal de AICIFc vem sendo aplicada pela Terapia Fotodinâmica (TFD) em testes pré-clínicos no tratamento de câncer de boca e câncer de pele não melanoma. Os resultados *in vitro* e *in vivo* observados remetem à alta eficiência do tratamento, com casos de erradicação completa do sítio tumoral primário (73). A aplicação desse fármaco no tratamento de câncer de mama, entretanto, nunca foi antes avaliada em modelos animais, sendo unicamente avaliada em culturas celulares primárias de carcinoma mamário de cães (75). Portanto, novos estudos *in vitro* e *in vivo* para essa finalidade terapêutica são ainda necessários para sua aplicabilidade futura.

O presente estudo demonstrou a alta eficiência da TFD mediada pela formulação lipossomal de AICIFc no tratamento de carcinoma mamário murino derivado de células 4T1. No sistema *in vitro*, por exemplo, pôde-se observar a erradicação de células tumorais em níveis superiores a 90% após o tratamento, sendo possível também verificar a localização intracelular difusa no citoplasma e da via de morte celular caracterizada pela presença de ambos os processos de necrose inicial (predominante) e apoptose tardia, caracterizadas morfológica e bioquimicamente. Comparativamente a estudos com formulações livres de ftalocianinas e outros fotossensibilizadores como Photofrin e ALA, os valores de citotoxicidade aqui alcançados são superiores. Tal superioridade pode estar relacionada à ampla internalização do fármaco fotossensibilizador, em decorrência do emprego do sistema nanoestruturado, com conseqüente geração massiva de espécies reativas de oxigênio após a irradiação (71, 76).

A indução de morte celular observada *in vitro* pode estar associada a diversos fatores, dentre os quais a localização intracelular do fotossensibilizador e principalmente à concentração do fotossensibilizador e à dose de irradiação da TFD (77). Sabe-se que a localização intracelular de fármacos em membranas de

organelas e em lisossomos é preditiva de processo celular de necrose dada a rápida fragmentação celular conseqüente da rápida depleção intracelular de ATP e do influxo massivo de Ca^{+2} no meio intracelular após o dano oxidativo (78-79). Associada à localização intracelular do fármaco, altas doses de TFD também estão relacionadas à rápida ablação celular por necrose. Firzuk et al 2011(12) descrevem que a ocorrência de apoptose, necrose ou autofagia de forma isolada como vias de morte celular é rara e, ainda que controladas, sua replicação *in vivo* é um evento difícil.

A mesma eficiência terapêutica encontrada *in vitro* nas células 4T1 após a aplicação de TFD mediada por AICIFc em formulação lipossomal não foi transportada ao sistema biológico *in vivo*, uma vez que a erradicação tumoral não ocorreu em níveis tão elevados. Puderam ser observadas, clinicamente, desaceleração significativa no crescimento tumoral, comparativamente aos tumores não tratados, e que foram confirmadas histopatologicamente pela grande área de necrose por coagulação central nos tumores submetidos à aplicação local da TFD mediada pela formulação lipossomal de AICIFc a 5 μM . Tal comportamento terapêutico pode estar associado a diversos fatores, dentre os quais: (i) o tipo celular empregado; (ii) a distribuição e concentração do fármaco fotossensibilizador e; (iii) a dose de energia total empregada na irradiação tumoral (80-81). A linhagem celular 4T1 possui elevado grau de proliferação celular, bem como potencial metastático elevado, o que pode ter restringido o sucesso terapêutico da TFD mediada pela AICIFc em formulação lipossomal. Adicionalmente, a distribuição do fármaco fotossensibilizador pode ter ocorrido de forma heterogênea no leito tumoral, favorecendo a ocorrência de morte celular em uma área, em detrimento de áreas adjacentes, reduzindo assim, a eficiência terapêutica da TFD (82). É descrito ainda, que doses de energia subestimadas podem aumentar a proliferação de células tumorais sendo necessário a modulação das variáveis aplicadas no presente estudo para a determinação de protocolos terapêuticos mais eficientes. Ainda assim, a acentuada redução no crescimento tumoral observada fornece um dado interessante já que a TFD pode, no mínimo, ser empregada como terapia adjuvante a procedimentos cirúrgicos sendo, ainda, seletiva ao tecido tumoral e imunomoduladora, capacitando ainda mais o hospedeiro ao combate ao câncer (35).

À ação direta dos danos oxidativos *in vivo* caracterizados pela necrose celular também se somatizaram a ablação vascular, clinicamente caracterizada pelo desaparecimento do aporte sanguíneo ao sítio tumoral, sendo confirmada histologicamente pela destruição de vasos no interior do tumor, bem como o surgimento de áreas hemorrágicas e formação de trombos nos leitos vasculares.

Atualmente, o dano oxidativo direto associado aos lesões vasculares tem demonstrado as maiores eficiências terapêutica em modelos animais submetidos a tratamentos com diversos fármacos fotossensibilizadores sendo, portanto, altamente desejada nos protocolos terapêuticos. Dolmans et al. 2002 demonstraram que a modulação da atividade anti-vascular da TFD pode ser obtida pela redução do intervalo de tempo entre a aplicação do fármaco fotossensibilizador e a fonte luminosa (80). Com um tempo reduzido, foi constatado que o fármaco fotossensibilizador ainda se distribui completamente para compartimentos intracelulares, permanecendo na corrente sanguínea adjacente ao tumor. A irradiação tumoral, portanto, atingirá não só as células tumorais propriamente ditas, como também as células endoteliais presentes no microambiente tumoral, atuando na indução de necrose tecidual secundária por hipóxia (83).

A ablação vascular contribui na redução tumoral já que cessa o fornecimento de nutrientes e o aporte de oxigênio ao microambiente tumoral, potencializando os efeitos terapêuticos da TFD. Em contrapartida, sabe-se também que o sucesso da TFD está intimamente relacionado à concentração de oxigênio tecidual, que é a principal fonte de oxigênio singlete e espécies reativas de oxigênio responsáveis pela destruição célula (83). Portanto, a ablação vascular apesar de ser um efeito desejado à TFD já que contribui significativamente com a remissão tumoral, pode ser um limitante terapêutico à mesma, uma vez que inviabiliza o dano oxidativo dada a condição de hipóxia subsequente (84). Adicionalmente, Henderson et. al, 2004, relata que o efeito vascular também é um limitante à infiltração de células imunes à área tratada e, conseqüentemente, reduz a resposta imune anti-tumoral (85). Esse efeito, de acordo com o autor, está associado a altas doses terapêuticas de TFD associadas à necrose tecidual secundária. Entretanto, não se sabe ainda qual o real envolvimento da vascularização na mediação dos danos decorrentes da TFD e estudos moleculares se fazem necessários para a determinação dos mecanismos celulares decorrentes de tal evento (86).

Mroz et al, 2011 relatam que a TFD possui efeito significativo no sistema imunológico, tanto com efeitos imunoestimulatórios, quanto com efeitos imunossupressores (52). O fator determinante, descrito por esses autores, pode estar associado à via de morte induzida preferencialmente no sistema *in vivo*. Para eles, a indução de dano oxidativo discreto, com atuação de forma direta nas células tumorais, está associada à preleção por apoptose. As células que morrem por apoptose após a TFD têm sido associadas à liberação de citocinas conhecidamente imunossupressoras, tais quais a TGF- β e a IL-10. Essas citocinas, como é descrito, podem atuar na inibição de células dendríticas e também de células T CD4+ e; sem as células T CD4+, as células T CD8+ podem se tornar anérgicas e tolerogênicas.

Adicionalmente, a apoptose está associada, em alguns estudos, ao aumento da expressão de VEGF (Fator de Crescimento endotelial vascular) que também tem características imunossupressoras de inibição da maturação das células dendríticas. Entretanto, estudos demonstram que a imunidade anti-tumoral também pode ser alcançada de forma independente da ativação de células T CD4+ e que a apoptose, determinada em protocolos terapêuticos de baixa dose de energia pode, em muitos casos, favorecer a indução de resposta imune. Por sua vez, a morte celular por mecanismo de necrose, causada predominantemente por alta dose de energia associada aos danos vasculares, tem sido relatada como estimuladora da ativação, pelas células dendríticas, de células T CD4+ e CD8+, potencializando os efeitos anti-tumorais da TFD, contrariando a hipótese de que a ablação vascular inviabiliza a indução de resposta inflamatória efetiva (85-86).

Pôde-se observar no presente estudo, que a TFD mediada pela aplicação local da formulação lipossomal de AICIFc no tratamento de câncer de mama em camundongos Balb/C atuou por múltiplos mecanismos que contribuíram para a expressão de citocinas inflamatórias, resultando em uma conseqüente resposta inflamatória anti-tumoral. Como observado, houve aumento significativo da expressão tumoral de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β e TNF- α em curto intervalo de tempo após a aplicação da TFD. O aumento da expressão de IL-1 β e principalmente de TNF- α é descrita como a principal efetora da ativação de estruturas MHC I, associada ao aumento no reconhecimento imunológico, sendo altamente desejada em tratamentos mediados pela TFD (87). Estudos em modelos animais e em modelos humanos têm demonstrado o papel do aumento de TNF- α na

indução de resposta imune inata e conseqüentemente na indução de resposta imune adaptativa mediada por células T efectoras, uma vez que essa molécula tem papel tanto na maturação de células apresentadoras de antígeno, como na maturação de linfócitos T efetores (45).

Em contrapartida, o aumento tardio da expressão de TGF- β (72h após o protocolo terapêutico) vem ao encontro dos resultados obtidos até então. De acordo com Carpi, et al 2009, a molécula TGF- β é sintetizada majoritariamente por linfócitos T e monócitos, sendo considerada um sinal silenciador à resposta imunológica ao inibir a diferenciação, ativação e proliferação de linfócitos (87). A citocina TGF- β também pode ser liberada por células que morrem por apoptose, o que reafirma a hipótese do presente estudo de que as vias de morte celular induzidas pela TFD mediada por AICIFc em formulação lipossomal ocorrem tanto por mecanismo de necrose inicial, quanto de apoptose tardia, como sugerido *in vitro* e *in vivo*. Tal observação confirma a indução de resposta inflamatória anti-tumoral nos primeiros momentos após a TFD e demonstra a tentativa do microambiente tumoral em minimizá-la como medida evasora de defesa (88). Associada à expressão aumentada de TGF- β , a expressão de IL-10 permaneceu inalterada, o que corrobora os achados de que a TFD mediada por AICIFc em formulação lipossomal não é imunossupressora a partir da avaliação desses parâmetros.

A partir dos resultados obtidos, entretanto, não foi possível caracterizar a indução de efetiva resposta imunológica anti-tumoral, o que requer avaliação extensa da presença de células linfocíticas efectoras como T CD4+ e T CD8+ e dos mecanismos moleculares envolvidos. Nossa hipótese, a partir das análises aqui descritas, é que a TFD mediada por AICIFc lipossomal seja uma modalidade terapêutica imunoestimuladora, dado o balanço positivo entre a expressão de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatória e também pelas observações histológicas encontradas. A alta eficiência da TFD mediada pela administração local de AICIFc em formulação lipossomal, se deve, portanto, pela associação de múltiplos mecanismos de atuação dessa modalidade, evidenciado pelos experimentos de análise clínica, histopatológica, expressão de citocinas inflamatórias que, conjuntamente, demonstraram a atuação sinérgica da morte celular direta por processos de necrose e apoptose secundária, da ablação vascular, evidenciada clínica e histologicamente e da indução de resposta inflamatória, demonstrada pela

expressão de citocinas. Todos os fatores, além de contribuírem para a eficiência do tratamento local do tumor, não afetaram sítios inespecíficos e aparentemente não afetaram a capacidade imunológica dos camundongos, diferentemente da imunossupressão observada em tratamentos quimioterápicos e radioterápicos comumente empregados (89). Tem-se, portanto, que a TFD mediada pela AICIFc em formulação lipossomal é uma modalidade promissora e deve ser melhor estudada para futura implementação médica.

6. CONCLUSÃO

Com os resultados obtidos neste estudo, puderam ser observadas as características da formulação lipossomal de AICIFc, tais como toxicidade, perfil de liberação e localização intracelular, que possibilitaram a sua aplicação como fotossensibilizador na TFD, levando à alta eficiência terapêutica *in vitro* em células 4T1. Os experimentos *in vivo*, por sua vez, demonstraram eficiência terapêutica da formulação lipossomal de AICIFc evidenciado principalmente pelo perfil imunoestimulatório observado pela análise da expressão de citocinas.

A partir do exposto, pôde-se concluir que a nanotecnologia inserida no contexto da Terapia Fotodinâmica mediada por uma formulação lipossomal de Alumínio-Cloro-Ftalocianina no tratamento de câncer de mama em modelos experimentais *in vitro* e *in vivo* é altamente efetiva, mantendo características desejáveis dessa modalidade terapêutica, tais quais a alta seletividade ao tecido tumoral e a capacitação imunológica para controle tumoral e, principalmente, reduzindo significativamente danos celulares inespecíficos associados aos tratamentos convencionalmente aplicados como a quimioterapia e a radioterapia.

Por meio desse estudo, foi demonstrado que mesmo em aplicações locais, a TFD mediada pela formulação lipossomal de AICIFc é capaz de ativar todos os mecanismos de ação da TFD descritos: dano celular direto por necrose e apoptose, dano vascular e indução de resposta inflamatória, fornecendo suporte científico para que essa modalidade associada à essa nova formulação farmacêutica sejam empregadas, no mínimo, como adjuvantes terapêuticos a tratamentos cirúrgicos, permitindo maior controle tumoral por longos períodos e, possivelmente, maior controle dos focos metastáticos decorrentes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. INCA. Estimativa 2012: Incidência de câncer no Brasil. 2012:1-122.
2. Balducci L, W.B. E. Cancer and ageing: a nexus at several levels. *Nature Reviews Cancer*. 2005;5:655 - 62.
3. Dillman RO. Cancer immunotherapy. *Cancer biotherapy & radiopharmaceuticals*. 2011;26(1):1-64.
4. Zhu H-H, Hu C-H, Strickland P. Perspectives of breast cancer etiology: synergistic interaction between smoking and exogenous hormone use. *Chin J Cancer*. 2011;30(7):433- 41.
5. Jemal A, Ward E, Thun MJ. Recent trends in breast cancer incidence rates by age and tumor characteristics among U.S. women. *Breast cancer research : BCR*. 2007;9(3):R28.
6. A. CG, T.A. S, E. T. Epidemiology — identifying the causes and preventability of cancer? *Nat Rev Cancer*. 2006;6:75-83.
7. Dawood S, Ueno NT, Valero V, Woodward WA, Buchholz TA, Hortobagyi GN, et al. Identifying factors that impact survival among women with inflammatory breast cancer. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology* 2011 Jul 15.
8. Anderson WF, Katki HA, Rosenberg PS. Incidence of breast cancer in the United States: current and future trends. *Journal of the National Cancer Institute*. 2011; 103(18):1397-402.
9. Li CI. Risk of mortality by histologic type of breast cancer in the United States. *Hormones & cancer*. 2010;1(3):156-65.
10. Jung SY, Sereika SM, Linkov F, Brufsky A, Weissfeld JL, Rosenzweig M. The effect of delays in treatment for breast cancer metastasis on survival. *Breast cancer research and treatment*. 2011 Jul 8.
11. Guarneri V, Conte PF. The curability of breast cancer and the treatment of advanced disease. *European journal of nuclear medicine and molecular imaging*. [Review]. 2004;31:S149-61.
12. Firczuk M, Nowis D, Golab J. PDT-induced inflammatory and host responses. *Photochem Photobiol Sci*. 2011;10(5):653-63.

13. Brown SB, Brown EA, Walker I. The present and future role of photodynamic therapy in cancer treatment. *The Lancet Oncology*. 2004;5(8):497-508.
14. Kargiotis O, Geka A, Rao JS, Kyritsis AP. Effects of irradiation on tumor cell survival, invasion and angiogenesis. *Journal of neuro-oncology*. [Review]. 2010; 100(3):323-38.
15. Maddams J, Parkin DM, Darby SC. The cancer burden in the UK in 2007 due to radiotherapy. *International Journal of Cancer*. 2011; 129(12):2885-93.
16. Baxevas CN, Perez SA, Papamichail M. Combinatorial treatments including vaccines, chemotherapy, and monoclonal antibodies for cancer therapy. *Cancer Immunol Immunother*. 2009;58:317 - 24.
17. Barnes LD, Giuliano EA, Ota J, Cohn LA, Moore CP. The effect of photodynamic therapy on squamous cell carcinoma in a murine model: evaluation of time between intralesional injection to laser irradiation. *Vet J*. 2009 Apr;180(1):60-5.
18. Bagnato V, Kurachi C, Ferreira J, Marcassa L, Sibata C, Allison R. PDT experience in Brazil: A regional profile. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. 2005;2(2):107-18.
19. Arumainayagam N, Moore CM, Ahmed HU, Emberton M. Photodynamic therapy for focal ablation of the prostate. *World journal of urology*. 2010 ;28(5):571-6.
20. Friedberg JS, Mick R, Stevenson JP. Phase II trial of pleural photodynamic therapy and surgery for patients with non-small-cell lung cancer with pleural spread. *J Clin Oncol* 2004; 22:2192-201.
21. Triesscheijn M, Baas P, Schellens JH, Stewart FA. Photodynamic therapy in oncology. *The oncologist*. 2006 11(9):1034-44.
22. Mroz P, Yaroslavsky A, Kharkwal GB, Hamblin MR. Cell Death Pathways in Photodynamic Therapy of Cancer. *Cancers*. 2011;3(2):2516-39.
23. Almeida RD, Manadas BJ, Carvalho AP, Duarte CB. Intracellular signaling mechanisms in photodynamic therapy. *Biochimica et biophysica acta*. 2004 20;1704(2):59-86.
24. Berkovitch-Luria G, Weitman M, Nudelman A, Rephaeli A, Malik Z. Multifunctional 5-aminolevulinic acid prodrugs activating diverse cell-death pathways. *Investigational new drugs*. 2011 Apr 21.
25. Nowis D, Makowski M, StokLosa T, Legat M, Issat T, Golab J. Direct tumor damage mechanisms of photodynamic therapy. *Acta Biochemica Polonica*. 2005;52(2):339-52.

26. Robertson CA, Evans DH, Abrahamse H. Photodynamic Therapy (PDT): A short review on cellular mechanisms and cancer research applications for PDT. *J Photochem Photobiol B*. 2009;96:1-8.
27. Agostinis P, Berg K, Cengel KA, Foster TH, Girotti AW, Gollnick SO, et al. Photodynamic therapy of cancer: an update. *CA: a cancer journal for clinicians*. 2011;61(4):250-81.
28. Hilf R. Mitochondria are targets of photodynamic therapy. *Journal of bioenergetics and biomembranes*. [Research Support, N.I.H., 2007;39(1):85-9.
29. Harrod-Kim P. Tumor ablation with photodynamic therapy: introduction to mechanism and clinical applications. *Journal of vascular and interventional radiology : JVIR*. 2006;17(9):1441-8.
30. Cecic I, Serrano K, Gyongyossy-Issa M, Korbelik M. Characteristics of complement activation in mice bearing Lewis lung carcinomas treated by photodynamic therapy. *Cancer letters*. 2005 28;225(2):215-23.
31. Castano AP, Mroz P, Hamblin MR. Photodynamic therapy and anti-tumour immunity. *Nat Rev Cancer*. 2006 ;6(7):535-45.
32. Gollnick SO, Brackett CM. Enhancement of anti-tumor immunity by photodynamic therapy. *Immunologic research*. 2010;46(1-3):216-26.
33. Canti G, Nicolin A, Cubeddu R, Taroni P, Bandieramonte G, Valentini G. Antitumor efficacy of the combination of photodynamic therapy and chemotherapy in murine tumors. *Cancer letters*. 1998;125(39-44).
34. Canti G, De Simone A, Korbelik M. Photodynamic Therapy and the immune system in experimental oncology. *Photochem Photobiol Sci*. 2002;1:79-80.
35. St Denis TG, Aziz K, Waheed AA, Huang YY, Sharma SK, Mroz P, et al. Combination approaches to potentiate immune response after photodynamic therapy for cancer. *Photochem Photobiol Sci*. 2011;10(5):792-801.
36. Cecic I, Korbelik M. Mediators of peripheral blood neutrophilia induced by photodynamic therapy of solid tumors. *Cancer Letters*. 2002;183(43-51.).
37. Gollnick SO, Evans SS, Baumann H, Owczarczak B, Maier P, Vaughan L, et al. Role of cytokines in photodynamic therapy-induced local and systemic inflammation. *British journal of cancer*. 2003 Jun 2;88(11):1772-9.
38. Kessel D, Luo Y. Photodynamic therapy: A mitochondrial inducer of apoptosis. *Cell Death and Differentiation*. 1999;6:28 ± 35.

39. Preise D, Oren R, Glinert I, Kalchenko V, Jung S, Scherz A, et al. Systemic antitumor protection by vascular-targeted photodynamic therapy involves cellular and humoral immunity. *Cancer Immunol Immunother.* 2009; 58(1):71-84.
40. Preise D, Scherz A, Salomon Y. Antitumor immunity promoted by vascular occluding therapy: lessons from vascular-targeted photodynamic therapy (VTP). *Photochem Photobiol Sci.* 2011; 10(5):681-8.
41. Garg AD, Nowis D, Golab J, Agostinis P. Photodynamic therapy: illuminating the road from cell death towards anti-tumour immunity. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death.* 2010;15(9):1050-71.
42. Garg AD, Nowis D, Golab J, Vandenabeele P, Krysko DV, Agostinis P. Immunogenic cell death, DAMPs and anticancer therapeutics: an emerging amalgamation. *Biochim BiophysActa.* 2010;1805:53-71.
43. Korbelik m, Sun J, Cecic I. Photodynamic therapy-induced cell surface expression and release of heat shock proteins: relevance for tumor response. *Cancer Research.* 2005;65:1018-26.
44. Evans S, Matthews W, Perry R, Fraker D, Norton J, Pass H. Effect of photodynamic therapy on tumor necrosis factor production by murine macrophages. *J Natl Cancer Inst* 1990;82:34-9.
45. Kick G, Messer G, Goetz A, Plewig G, Kind P. Photodynamic Therapy Induces Expression of Interleukin 6 by Activation of AP-1 but not NF-KB DNA Binding1. *Cancer Research.* 1995;55:2373 - 9.
46. Evangelou G, Farrar MD, White RD, Sorefan NB, Wright KP, McLean K, et al. Topical aminolaevulinic acid-photodynamic therapy produces an inflammatory infiltrate but reduces Langerhans cells in healthy human skin in vivo. *The British journal of dermatology.* 2011 Sep;165(3):513-9.
47. Granville DJ, Levy JG, Hunt DWC. Photodynamic treatment with benzoporphyrin derivative monoacid ring A produces protein tyrosine phosphorylation events and DNA fragmentation in murine P815 cells. . *Photochem Photobiol.* 1998;67:358-62.
48. Hunt DW, Levy JG. Immunomodulatory aspects of photodynamic therapy. . *Expert Opin Investig Drugs.* 1998;7:57-64.
49. Matthews YJ, Damian DL. Topical photodynamic therapy is immunosuppressive in humans. *The British journal of dermatology.* 2010 ;162(3):637-41.

50. Ohtani K, Usuda J, Ichinose S, Ishizumi T, Hirata T, Inoue T, et al. High expression of GADD-45 α and VEGF induced tumor recurrence via upregulation of IL-2 after photodynamic therapy using NPe6. *International Journal of Oncology*. 2008;32:397-403.
51. Guo S, Colbert LS, Fuller M, Zhang Y, Gonzalez-Perez RR. Vascular endothelial growth factor receptor-2 in breast cancer. *Biochimica et biophysica acta*. 2010;1806(1):108-21.
52. Mroz P, Hamblin MR. The immunosuppressive side of PDT. *Photochem Photobiol Sci*. 2011;10(5):751-8.
53. Akens MK, Hardisty MR, Wilson BC, Schwock J, Whyne CM, Burch S, et al. Defining the therapeutic window of vertebral photodynamic therapy in a murine pre-clinical model of breast cancer metastasis using the photosensitizer BPD-MA (Verteporfin). *Breast cancer research and treatment*. 2010 Jan;119(2):325-33.
54. Wei LH, Baumann H, Tracy E, Wang Y, Hutson A, Rose-John S, et al. Interleukin-6 trans signalling enhances photodynamic therapy by modulating cell cycling. *British journal of cancer*. 2007; 3;97(11):1513-22.
55. Du H, Bay BH, Mahendran R, Olivo M. Hypericin-mediated photodynamic therapy elicits differential interleukin-6 response in nasopharyngeal cancer. *Cancer letters*. 2006 28;235(2):202-8.
56. Sun J, Cecic I, Parkins CS, Korbelik M. Neutrophils as inflammatory and immune effectors in photodynamic therapy-treated mouse SCCVII tumours. *Photochem Photobiol Sci*. 2002;1:690-5.
57. Volanti C, Matroule JY, Piette J. Involvement of oxidative stress in NF-kappaB activation in endothelial cells treated by photodynamic therapy, *Photochem. Photobiol. Photochem Photobiol Sci*. 2002;75:36-45;.
58. Dror SB, Bronshtein I, Garini Y, O'Neal WG, Jacobi PA, Ehrenberg B. The localization and photosensitization of modified chlorin photosensitizers in artificial membranes. *Photochem Photobiol Sci*. 2009 ;8(3):354-61.
59. Berlanda J, Kiesslich T, Engelhardt V, Krammer B, Plaetzer K. Comparative in vitro study on the characteristics of different photosensitizers employed in PDT. *J Photochem Photobiol B*. 2010; 2;100(3):173-80.
60. Ethirajan M, Chen Y, Joshi P, Pandey RK. The role of porphyrin chemistry in tumor imaging and photodynamic therapy. *Chemical Society reviews*. 2011; 40(1):340-62.

61. Jori G. Tumour photosensitizers: approaches to enhance the selectivity and efficiency of photodynamic Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology 1996;36:87 - 93.
62. Kiesslich T, Berlanda J, Plaetzer K, Krammer B, Berr F. Comparative characterization of the efficiency and cellular pharmacokinetics of Foscan- and Foslip-based photodynamic treatment in human biliary tract cancer cell lines. Photochem Photobiol Sci. 2007 Jun;6(6):619-27.
63. O'Connor AE, Gallagher WM, Byrne AT. Porphyrin and nonporphyrin photosensitizers in oncology: preclinical and clinical advances in photodynamic therapy. Photochemistry and photobiology. 2009;85(5):1053-74.
64. Durmus M, Nyokong T. Synthesis, photophysical and photochemical studies of new water-soluble indium(III) phthalocyanines. Photochem Photobiol Sci. 2007;6(6):659-68.
65. Durmus M, Ahsen V. Water-soluble cationic gallium(III) and indium(III) phthalocyanines for photodynamic therapy. Journal of inorganic biochemistry. 2010;104(3):297-309.
66. Schneider R, Schmitt F, Frochot C, Fort Y, Lourette N, Guillemin F, et al. Design, synthesis, and biological evaluation of folic acid targeted tetraphenylporphyrin as novel photosensitizers for selective photodynamic therapy. Bioorganic & medicinal chemistry. 2005;13(8):2799-808.
67. Sobolev AS, Jans DA, Rosenkranz AA. Targeted intracellular delivery of photosensitizers. Progress in Biophysics & Molecular Biology 2000;73:51 - 90.
68. Bovis MJ, Woodhams JH, Loizidou M, Scheglmann D, Bown SG, MacRobert AJ. Improved in vivo delivery of m-THPC via pegylated liposomes for use in photodynamic therapy. Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society. 2011 Oct 1.
69. Dadashzadeh S, Mirahmadi N, Babaei MH, Vali AM. Peritoneal retention of liposomes: Effects of lipid composition, PEG coating and liposome charge. Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society. 2010;148(2):177-86.
70. Maftoum-Costa M, Naves KT, Oliveira AL, Tedesco AC, da Silva NS, Pacheco-Soares C. Mitochondria, endoplasmic reticulum and actin filament behavior after PDT with chloroaluminum phthalocyanine liposomal in HeLa cells. Cell biology international. 2008;32(8):1024-8.

71. Malam Y, Loizidou M, Seifalian AM. Liposomes and nanoparticles: nanosized vehicles for drug delivery in cancer. *Trends in pharmacological sciences*. 2009 ;30(11):592-9.
72. Misra R, Acharya S, Sahoo SK. Cancer nanotechnology: application of nanotechnology in cancer therapy. *Drug discovery today*. 2010;15(19-20):842-50.
73. Longo JP, Lozzi SP, Simioni AR, Morais PC, Tedesco AC, Azevedo RB. Photodynamic therapy with aluminum-chloro-phthalocyanine induces necrosis and vascular damage in mice tongue tumors. *J Photochem Photobiol B*. 2009 ;94(2):143-6.
74. Schuh JCL. Trials, Tribulations, and Trends in Tumor Modeling in Mice. *Toxicologic Pathology*. 2004;32(53-66).
75. Rocha MST, Lucci CM, Longo JP, Galera PD, Simioni AR, Lacava ZGM, et al. Aluminum-chloride-phthalocyanine encapsulated in liposomes: activity against naturally occurring dog breast cancer cells. *Developments in Biomedical Nanotechnology in Latin America*. 2012.
76. Bechet D, Couleaud P, Frochet C, Viriot ML, Guillemin F, Barberi-Heyob M. Nanoparticles as vehicles for delivery of photodynamic therapy agents. *Trends in biotechnology*. 2008;26(11):612-21.
77. Kolarova H, Bajgar R, Tomankova K, Nevrelova P, Mosinger J. Comparison of sensitizers by detecting reactive oxygen species after photodynamic reaction in vitro. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA*. 2007;21(7):1287-91.
78. Vanlangenakker N, Vanden Berghe T, Krysko DV, Festjens N, Vandenabeele P. Molecular mechanisms and pathophysiology of necrotic cell death. *Curr Mol Med*. 2008;8:207-20.
79. Zong WX, Thompson CB. Necrotic death as a cell fate. *Genes Dev*. 2006;20:1-15.
80. Dolmans DE. Targeting tumor vasculature and cancer cells in orthotopic breast tumor by fractionated photosensitizer dosing photodynamic therapy. *Cancer Res*. 2002;62(4289-4294).
81. Zhao B, He YY. Recent advances in the prevention and treatment of skin cancer using photodynamic therapy. *Expert review of anticancer therapy*. 2010;10(11):1797-809.

82. Cheng Y, Meyers JD, Broome AM, Kenney ME, Basilion JP, Burda C. Deep penetration of a PDT drug into tumors by noncovalent drug-gold nanoparticle conjugates. *Journal of the American Chemical Society*. 2011;133(8):2583-91.
83. Huang Z, Xu H, Meyers AD, Musani AI, Wang L, Tagg R, et al. Photodynamic therapy for treatment of solid tumors - potential and technical challenges. *Technol Cancer Res Treat*. 2008 7(4):309-20.
84. Goldshaid L, Rubinstein E, Brandis A, Segal D, Leshem N, Brenner O, et al. Novel design principles enable specific targeting of imaging and therapeutic agents to necrotic domains in breast tumors. *Breast cancer research : BCR*. 2010;12(3):R29.
85. Henderson BW, Gollnick SO, Snyder JW. Choice of oxygen-conserving treatment regimendetermines the inflammatory response and outcome of photodynamic therapy of tumors. . *Cancer Res*. 2004;64:2120-6.
86. Kousis PC, Henderson BW, Maier PG, Gollnick SO. Photodynamic therapy (PDT) enhancement of antitumor immunity is regulated by neutrophils.. *Cancer Res*. 2007;67:10501-10.
87. Carpi A, Nicolini A, Antonelli A, Ferrari P, Rossi G. Cytokines in the Management of High Risk or Advanced Breast Cancer: An Update and Expectation. *Current Cancer Drug Targets*. 2009;9:888-903.
88. Du C, Wang Y. The immunoregulatory mechanisms of carcinoma for its survival and development. *Journal of experimental & clinical cancer research : CR*. 2011;30:12.
89. Daayana S, Winters U, Stern PL, Kitchener HC. Clinical and immunological response to photodynamic therapy in the treatment of vulval intraepithelial neoplasia. *Photochem Photobiol Sci*. 2011;10(5):802-9.

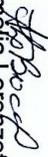
ANEXO A – Documento de aprovação em Comitê de Ética

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA - UnB
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - IB
COMITÊ DE ÉTICA NO USO ANIMAL - CEUA

Brasília, 25 de setembro de 2007

DECLARAÇÃO

Declaramos que o projeto intitulado “**APLICAÇÃO DA TERAPIA FOTODINÂMICA EM MODELOS IN VIVO**”, UNBDOC n° 66063/2007, sob responsabilidade do Prof. Ricardo Bentes de Azevedo, foi avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética no Uso Animal (CEUA) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília.


Prof. Angriella Lorenzetti Bocca
Coordenadora do CEUA