

Universidade de Brasília  
Instituto de Ciências Biológicas  
Programa de Pós-Graduação em Nanociência e Nanobiotecnologia

Khellida Loiane Vieira Ramos Rocha

**TERAPIA FOTODINAMICA EM CAMUNDONGOS BALB/C JOVENS E IDOSOS  
PORTADORES DE TUMORES DE MAMA SENSIBILIZADOS COM SELOL**

Orientador: Maria de Fátima Menezes Almeida Santos

Brasília, DF

2018

Universidade de Brasília

Instituto de Ciências Biológicas

Programa de Pós-Graduação em Nanociência e Nanobiotecnologia

Khellida Loiane Vieira Ramos Rocha

TERAPIA FOTODINAMICA EM CAMUNDONGOS BALB/C JOVENS E  
IDOSOS PORTADORES DE TUMORES DE MAMA SENSIBILIZADOS COM  
SELOL

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nanociência e Nanobiotecnologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, como parte integrante dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Nanociência e Nanobiotecnologia.

Orientadora: Profa. Dra. Maria de Fátima Menezes Almeida Santos

Brasília-DF

2018

Tese de Doutorado

**KHELLIDA LOIANE VIEIRA RAMOS ROCHA**

TERAPIA FOTODINAMICA EM CAMUNDONGOS BALB/C JOVENS E  
IDOSOS EM TUMORES DE MAMA SENSIBILIZADOS COM SELOL

**Comissão Examinadora**

Profa. Dra. Maria de Fátima Menezes Almeida Santos  
Presidente/Orientador- UnB

Dr. Itajaí Oliveira de Albuquerque  
Membro Titular Externo não Vinculado ao Programa

Prof. Dra. Zulmira Guerrero Marques Lacava  
Membro Titular Interno Vinculado ao Programa Instituto de Ciências  
Biológicas - UnB

Prof. Dr. José Garrofe Dórea  
Membro Titular Interno não Vinculado ao Programa – UnB

Prof. Dr. Luis Alexandre Muehlman  
Membro Suplente Interno Vinculado ao Programa Instituto de Ciências  
Biológicas – UnB

Brasília, 27 de dezembro, 2018

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço

primeiramente ao Senhor pela vida, pela saúde e pela graça da oportunidade de estar nesta instituição e concluir mais uma etapa tão importante;

aos meus amados pais, Miguel e Héliida, por todo o esforço e o empenho dedicados a mim para que eu pudesse estudar nas melhores escolas e viabilizar minha entrada na Universidade. Também agradeço a eles pelo estímulo para a conclusão desse projeto bem como toda a ajuda dispensada a mim para facilitar minha rotina. Só cheguei até aqui porque vocês me ajudaram!

ao meu amado esposo, Ezequiel, por todo o amor e o carinho dedicado a este sonho e projeto meu; toda a paciência e tolerância comigo. Agradeço por toda a força que me deu e o apoio dedicados para que eu finalizasse o doutorado e conquistasse mais essa vitória!

a minha amada e querida sogra, Catarina, por toda a força e ajuda que me deu para que eu concluísse essa etapa em minha vida! Infelizmente não está mais entre nós a partir desta última etapa de conclusão, mas sempre me apoiou e torceu a favor do meu sucesso! Muito obrigada meu anjo!

às minhas queridas irmãs, Jéssica e Nathália, e ao meu cunhado e irmão Thiago, por tudo sempre! Todo o carinho, a força, as palavras positivas e a compreensão comigo!

aos meus orientadores, professora Dra. Maria de Fátima Menezes Almeida Santos e professor Dr. Ricardo Bentes, por todo o conhecimento científico e a ajuda dispensada a mim, por toda a paciência e compreensão!

aos meus queridos amigos, Maria, Willie, Thamara, Alícia, Grazi, Gabriel e Dani. A rotina no laboratório teria sido muito triste se não existissem vocês para alegrar cada dia. Os amigos são como as flores enfeitando o jardim. E vocês foram essas flores.

a todo o grupo do laboratório pela colaboração e trabalho em equipe.

Pelo ambiente organizado e salutar que tanto me ensinaram.

Agradeço à Capes e ao CNPq pelo financiamento e apoio.

A todos, o meu muito obrigado!

Dedico este estudo ao meu amado e querido avô José Ramos. Apesar de ter tão pouco estudo, o senhor sustentou a grande família com honra e era louvável o tanto que se orgulhava dos filhos e dos netos. Era um grande defensor e admirador da família. Agradeço por toda a força e estímulo nos meus estudos. Por todas as palavras positivas a mim ditas e por todas as vezes que profetizava bênçãos na minha vida. Agradeço e dedico este estudo ao senhor, meu amado avô.

O câncer de mama é uma das principais causas de mortalidade em mulheres em todo o mundo. Assim, considerando as estatísticas nada promissoras e o fato de que a efetividade das terapias utilizadas contra o câncer de mama é limitada, realizou-se este estudo com o objetivo de avaliar se sensibilização com Selol, uma mistura semissintética de selenitotriacilglicerídeos em nanocápsulas (NcSe) potencializaria os efeitos da Terapia Fotodinâmica (TFD), mediada pelo fotossensibilizante Alumínio-Cloro-Ftalocianina em nanoemulsão (NE-AICIFt), na erradicação de tumores de mama em camundongos Balb/c jovens e idosos. Para tal, realizaram-se estudos *in vitro* e *in vivo*. Nos estudos *in vitro* avaliaram-se, as características das nanoestruturas. Os resultados mostraram que as NcSe e a NE-AICIFt possuem características favoráveis à aplicação biológica, além de estabilidade ao longo de 360 dias. O ensaio *in vitro* mostrou que o Selol potencializou em células das linhagens 4T1 e NIH/3T3 o efeito da Terapia Fotodinâmica, pois induziu diminuição da concentração mínima necessária da AICIFt para reduzir a viabilidade celular. O Selol não induziu fragmentação do DNA, ele reduz a fragmentação promovida pela Terapia Fotodinâmica nas células 4T1. No ensaio *in vivo* os tumores foram transplantados para a 5ª mama dos camundongos, idosos e jovens, utilizando células 4T1. Dez dias após o implante das células, os tumores foram tratados com NcSe e depois submetidos à TFD. Os resultados mostraram que o tumor induz inflamação mais intensa nos animais idosos. O tumor induziu hepatoesplenomegalia e aumento de células da linhagem mielóide nos animais idosos e jovens. Nos animais jovens o Selol reduziu a esplenomegalia. O Selol e a Terapia Fotodinâmica não se mostraram tóxicos para os animais. A Terapia Fotodinâmica reduziu o volume dos tumores somente nos animais idosos. Já o Selol induziu redução do volume tumoral em todos os animais, chegando a 90% a redução tumoral quando o Selol foi aplicado sozinho nos animais jovens. Em 3 animais jovens o Selol promoveu regressão total dos tumores.

Palavras chave: Terapia Combinada; Ftalocianina, Selol; câncer de mama; linhagem celular 4T1; idade biológica.

Breast cancer is one of the leading causes of mortality in women around the world. Thus, considering the unpromising statistics and the fact that the effectiveness of the therapies used against breast cancer is limited, this study was carried out to evaluate whether the sensitization with Selol, a semi-synthetic mixture of selenitotriacylglycerides, in nanocapsules (NcSe) would potentiate the effects of Photodynamic Therapy (PDT), mediated by the aluminum-chloro-phthalocyanine photosensitizer contained in a nanoemulsion (NE-AICIFt), in the eradication of breast tumors in young and old Balb/c mice. For this purpose, *in vivo* and *in vitro* studies were performed. In the *in vitro* studies, the characteristics of the nanostructures were first evaluated. The results showed that NcSe and NE-AICIFt have characteristics favorable to the biological application besides stability over 360 days. The *in vitro* assay also showed that Selol enhanced the effect of Photodynamic Therapy in cells of the 4T1 and NIH/3T3 by reducing the minimum required concentration of AICIFt to reduce cell viability. Selol did not induce DNA fragmentation; it reduces the fragmentation promoted by Photodynamic Therapy in 4T1 cells. In the *in vivo* assay, tumors were transplanted in the 5th breast of the mice, the elderly and the young, using 4T1 cells. Ten days after the implantation of these cells, the tumors were treated with NcSe and then submitted to PDT. The results showed that the inflammatory process is more intense in the elderly animals. The hepatosplenomegaly and increased myeloid cells in the elderly and young animals were induced by the 4T1 tumor model. In the young animals, Selol reduced splenomegaly. Selol and Photodynamic Therapy were not toxic to animals. Photodynamic Therapy alone reduced the volume of tumors only in the elderly animals. Selol induced reduction of tumor volume in all animals, reaching a reduction of 90% when applied alone in young animals. In 20% of young animals (3/15), Selol promoted total regression of tumors.

Keywords: Combination Therapy; Phthalocyanine Selol; breast cancer; 4T1 cell line; biologic age

		Página.
<b>Figura 1</b>	Representação esquemática de nanocápsulas e de nanoesferas poliméricas: Fonte: Schaffazick, S.R. 2003.	14
<b>Figura 2</b>	Representação esquemática da estrutura química do Selol. Fonte: Flis e colaboradores, 2015.	16
<b>Figura 3</b>	Diagrama de Jablonsky simplificado. Mecanismo geral de geração de espécies reativas de oxigênio mediadas pela luz. Adaptado Robertson <i>et alli</i> , 2009.	19
<b>Figura 4</b>	Janela ótica do espectro de absorção para aplicação da Terapia Fotodinâmica. Fonte: Plaetzar, et alli, 2009.	21
<b>Figura 5</b>	Distribuição do diâmetro hidrodinâmico das nanocápsulas de Selol e da nanoemulsão de Alumínio-Cloro-Ftalocianina.	44
<b>Figura 6</b>	Características coloidais das nanocápsulas com Selol ao longo de 360 dias.	45
<b>Figura 7</b>	Características coloidais da nanoemulsão de Alumínio Cloro Ftalocianina ao longo de 360 dias.	46
<b>Figura 8</b>	Morfologia das nanocápsulas com Selol e da nanoemulsão com Alumínio-Cloro-Ftalocianina .	47
<b>Figura 9</b>	Viabilidade da linhagem 4T1 determinada por meio do ensaio de MTT após tratamento com nanocápsulas com Selol por 24, 48 e 72h.	48
<b>Figura 10</b>	Viabilidade da linhagem NIH/3T3 determinada por meio do ensaio de MTT após tratamento com nanocápsulas com Selol por 24, 48 e 72h.	49

- Figura 11** Viabilidade da linhagem 4T1 determinada por meio do ensaio de MTT após incubação com NE-AICIFt. Células avaliadas 24 h, 48 h e 72 h após irradiação. 50
- Figura 12** Viabilidade da linhagem NIH/3T3 determinada por meio do ensaio de MTT após incubação com NE-AICIFt. Células avaliadas 24 h, 48 h e 72 h após irradiação. 51
- Figura 13** Citotoxicidade induzida pela Terapia Fotodinâmica em células da linhagem 4T1 sensibilizadas com Selol e avaliada por meio do ensaio de MTT. 54
- Figura 14** Citotoxicidade induzida pela Terapia Fotodinâmica em células da linhagem NIH/3T3 sensibilizadas com Selol e avaliada por meio do ensaio de MTT. 55
- Figura 15** Análise por citometria de fluxo do potencial de membrana mitocondrial em células 4T1 sensibilizadas com Selol na concentração de 200 e 400 µg/mL e depois submetidas à Terapia Fotodinâmica. 56
- Figura 16** Taxa de fragmentação de DNA determinada por citometria de fluxo em células 4T1 sensibilizadas com Selol na concentração de 200 e 400 µg/mL e depois submetidas à Terapia Fotodinâmica. 57
- Figura 17** Dinâmica do ciclo celular determinada por meio de citometria de fluxo em células 4T1 sensibilizadas com Selol na concentração de 200 e 400 µg/mL e depois submetidas à Terapia Fotodinâmica. 58
- Figura 18** Morfologia celular analisada por citometria de fluxo. Células

- 4T1 sensibilizadas com Selol na concentração de 200 e 400 µg/mL e submetidas à Terapia Fotodinâmica. 61
- Figura 19** Níveis da enzima Mieloperoxidase mensurados por meio de reação de luminescência do Luminol, medida por radiância média [p/s/cm<sup>2</sup>/sr] em camundongos Balb/c idosos sensibilizados com Selol na concentração de 12 mg/mL e submetidos à Terapia Fotodinâmica. 63
- Figura 20** Níveis da enzima Mieloperoxidase mensurados por meio de reação de luminescência do Luminol, medida por radiância média [p/s/cm<sup>2</sup>/sr] em camundongos Balb/c jovens sensibilizados com Selol na concentração de 12 mg/mL e submetidos à Terapia Fotodinâmica. 64
- Figura 21** Peso de órgãos de camundongos Balb/c sensibilizados com Selol (12 mg/mL) e submetidos à Terapia Fotodinâmica. 68
- Figura 22** Fotomicrografia de cortes histológicos de pulmão, rim e baço, corados com H&E de camundongos BALB/c com tumores sensibilizados com Selol e submetidos à Terapia Fotodinâmica. 75
- Figura 23** Fotomicrografias de cortes histológicos de fígados, corados com H&E de camundongos BALB/c com tumores sensibilizados com Selol e submetidos à TFD. 76
- Figura 24** Volume dos tumores de camundongos Balb/c 79
- Figura 25** Fotomicrografias de cortes histológicos corados com H&E de tecido mamário com e sem tumor de camundongos Balb/c. 80

**Figura 26** Fotomicrografias de cortes histológicos corados com H&E de linfonodos sentinelas de camundongos Balb-c com e sem tumor.

82

<b>Tabela I</b>	Grupos experimentais utilizados para avaliar a eficácia da Terapia Fotodinâmica na erradicação de tumores em camundongos Balb-c previamente sensibilizados com Selol.	38
<b>Tabela II</b>	Caracterização coloidal das nanocápsulas com Selol e da nanoemulsão com Alumínio Cloro Ftalocianina.	43
<b>Tabela III</b>	Dinâmica do ciclo celular induzida pela Terapia Fotodinâmica em células 4T1 sensibilizadas com Selol.	59
<b>Tabela IV</b>	Níveis da enzima Mieloperoxidase em camundongos Balb/c.	62
<b>Tabela V</b>	Variação do peso corporal de camundongos Balb/c sensibilizados com Selol e submetidos à Terapia Fotodinâmica.	65
<b>Tabela VI</b>	Peso de órgãos de camundongos Balb/c sensibilizados com Selol e submetidos à Terapia Fotodinâmica.	67
<b>Tabela VII</b>	Dosagens bioquímicas de camundongos Balb/c sensibilizados com Selol e submetidos à Terapia Fotodinâmica.	70
<b>Tabela VIII</b>	Eritrograma e contagem de plaquetas em camundongos Balb/c com tumor sensibilizado com Selol e submetido à Terapia Fotodinâmica.	73
<b>Tabela IX</b>	Leucograma de camundongos Balb/c com tumor sensibilizado com Selol e submetido à Terapia Fotodinâmica.	74

<b>Tabela X</b>	Volume dos tumores de camundongos Balb/c sensibilizados com Selol e submetidos à Terapia Fotodinâmica.	78
<b>Tabela XI</b>	Incidência de metástase em linfonodos sentinelas de camundongos Balb/c cujos tumores foram sensibilizados com Selol e submetidos à Terapia Fotodinâmica.	81

	Página
<b>1. Introdução</b>	1
<b>2. Justificativa</b>	24
<b>3. Objetivos</b>	25
<b>4. Materiais e Métodos</b>	27
4.1 Ensaio <i>in vitro</i> .	27
4.1.2. Preparo das nanocápsulas com Selol	27
4.1.3. Preparo da Nanoemulsão de Alumínio-Cloro-Ftalocianina	28
4.1.4. Caracterização coloidal da Nanoemulsão de Alumínio-Cloro-Ftalocianina e das Nanocápsulas com Selol	29
4.1.5. Caracterização morfológica da nanoemulsão de Alumínio-Cloro-Ftalocianina e das nanocápsulas com Selol	29
4.1.5.1 <i>Microscopia Eletrônica de Transmissão</i>	30
4.1.5.2 <i>Microscopia Eletrônica de Varredura</i>	30
4.1.6. Linhagens Celulares	30
4.1.6. 1. <i>Manutenção e propagação das células</i>	31
4.1.7. Determinação das concentrações de Alumínio-Cloro-Ftalocianina e de Selol a serem utilizadas nos tratamentos	32
4.1.8. Determinação da toxicidade da Terapia Fotodinâmica em células sensibilizadas com Selol.	33
4.1.9. Avaliação de alterações celulares induzidas pela Terapia Fotodinâmica em células previamente sensibilizadas com Selol	32
4.1.9.1. <i>Análise da alteração do potencial elétrico de membranas mitocondriais e da morfologia celular</i>	35
4.1.9.2. <i>Análise da fragmentação do DNA e da dinâmica do ciclo celular.</i>	35
4.2 Ensaio <i>in vivo</i> .	36
4.2.1. Modelo Animal	36
4.2.1.2 Delineamento experimental e grupos experimentais	37
4.2.3. Quantificação da enzima Mieloperoxidase	39
4.2.4. Coleta de sangue, dos tumores e de órgãos dos animais dos diferentes grupos experimentais.	39
4.2.4.1 <i>Ensaio Bioquímico</i>	40

4.2.4.2 <i>Ensaio Hematológico</i>	40
4.2.4.3 <i>Avaliação histopatológica</i>	41
4.3 <i>Análise estatística</i>	42
<b>5. Resultados.</b>	<b>43</b>
5.1. Estudo <i>in vitro</i>	43
5.1.1 Características coloidais e morfológicas das nanocápsulas de Selol e da nanoemulsão de Alumínio Cloro Ftalocianina.	43
5.1.2. Citotoxicidade das nanocápsulas de Selol e nanoemulsão de Alumínio Cloro Ftalocianina em linhagens celulares.	47
5.1.2.1 Citotoxicidade das nanocápsulas de Selol.	48
5.1.1.3 Citotoxicidade da nanoemulsão de Alumínio Cloro Ftalocianina.	49
5.1.3. Eficácia da Terapia Fotodinâmica mediada por uma nanoemulsão de Alumínio Cloro Ftalocianina em células sensibilizadas com Selol	52
5.1.4. Alterações celulares induzidas pela Terapia Fotodinâmica em células previamente sensibilizadas com Selol.	56
5.1.4.1. <i>Análise da alteração do potencial elétrico de membranas mitocondriais</i>	56
5.1.4.2. <i>Análise da fragmentação do DNA e da dinâmica da proliferação celular.</i>	57
5.1.4.3. <i>Análise da morfologia celular</i>	60
5.2. Estudo <i>in vivo</i>	61
5.2.1. Quantificação da enzima Mieloperoxidase	61
5.2.2. Toxicidade induzida pelos diferentes tratamentos	64
5.2.2.1. <i>Peso corporal</i>	64
5.2.2.2. <i>Peso de órgãos</i>	65
5.2.2.3. <i>Análise Bioquímica e Hematológica</i>	68
5.2.2.3.1. <i>Análise Bioquímica</i>	68
5.2.2.3.2. <i>Análise Hematológica.</i>	71
5.2.2.3.4. <i>Análise histopatológica do baço, rins, fígado e pulmão de animais com tumor sensibilizados pelo Selol e submetidos à terapia fotodinâmica.</i>	75

5.2.3. Avaliação da eficácia da Terapia Fotodinâmica na erradicação de tumores sensibilizados pelo Selol.	77
5.2.3.1. <i>Volume tumoral</i>	77
5.2.3.2 Análise histopatológica dos tumores e de linfonodos sentinelas	80
5.2.3.2.1. <i>Análise histopatológica dos tumores</i>	80
5.2.3.2.2. <i>Análise histopatológica dos linfonodos sentinelas</i>	81
<b>6. Discussão</b>	<b>83</b>
<b>7. Conclusões</b>	<b>103</b>
<b>8. Referências Bibliográficas</b>	<b>104</b>

## **1. INTRODUÇÃO**

## **CÂNCER**

Câncer é um nome genérico designado a um grupo de mais de duzentas doenças (Hanahan, 2011). A formação de um câncer é um processo de múltiplas etapas durante o qual as células passam por alterações genéticas que lhes conferem características biológicas tais como: sustentação da sinalização proliferativa, escape dos mecanismos supressores da proliferação, resistência à morte, imortalidade replicativa, instabilidade do genoma, reprogramação do metabolismo energético, indução de angiogênese, capacidade de invasão e metástase, além de escape do sistema imune (Hanahan, 2011). Ressalta-se ainda, que além de células neoplásicas, os tumores contêm células não neoplásicas que contribuem para a manutenção do microambiente tumoral (Hanahan, 2011).

## **CÂNCER DE MAMA**

Os diferentes tipos de câncer podem se desenvolver a partir de qualquer tipo celular, sendo o que se origina em células mamárias, o câncer de mama, o mais comum em mulheres em todo o mundo; em torno de 24% dos cânceres em mulheres são câncer de mama (Azman, 2018). Sua incidência é de mais de um milhão de novos casos a cada ano. No Brasil, de acordo com o Instituto Nacional do Câncer (INCA), para o biênio 2018-2019, estima-se o surgimento de 59.700 novos casos de câncer de mama a cada ano, constituindo assim este tipo de câncer um problema de saúde pública (Estimativa INCA, 2018).

As taxas de sobrevivência ao câncer de mama variam muito em todo o mundo, sendo a segunda causa de morte por câncer nos países desenvolvidos

e a maior causa de morte por câncer nos países em desenvolvimento, onde a maioria dos casos é diagnosticada em estágios tardios. Ressalta-se que as chances de cura são aumentadas quanto mais cedo a doença for diagnosticada (Estimativa INCA, 2016).

O prognóstico do câncer de mama depende do estágio de desenvolvimento do mesmo, sendo utilizada para isso, o sistema de classificação de tumores malignos TNM. Esse sistema descreve a categoria do estágio e progressão do câncer. Nessa classificação, o 'T' representa o tamanho do tumor e o potencial de dispersão das células tumorais para os tecidos adjacentes variando de 0 a IV. Enquanto que o 'N' representa o potencial de disseminação para os linfonodos mais próximos, variando de 0 a III e o 'M' representa a presença ou ausência de metástases variando de 0 a I (American Cancer Society, 2017; Sobin & Wittekind, 2014). Os tumores no estágio 0 correspondem aos tumores *in situ*, os nos estágios I, II e III representam os que tem potencial de invasão, sendo que os que se encontram no estágio I tem diâmetro menor do que dois centímetros, os no estágio II diâmetro entre dois e cinco centímetros e os no estágio III diâmetro maior que cinco centímetros. Já os tumores classificados no estágio IV constituem os tumores invasivos, com extensão à parede torácica. O sistema TNM orienta a classificação para o prognóstico e tratamento adequados (Barros *et alli*, 2011).

Além do tamanho e do fato de serem invasivos ou não, os cânceres de mama também podem ser classificados de acordo com a origem histológica do câncer. Nesse caso, segundo a OMS, existem 20 subtipos histológicos da doença, dentre eles: o adenocarcinoma ductal invasivo, originado do epitélio ductal e responsável por 80% dos casos, o lobular, o tubular, o mucinoso, o

medular, o papilar e o micropapilar, entre outros (Estimativa INCA, 2016). Os mais comuns são os originados nos ductos e nos lóbulos lactíferos. Os demais ocorrem nos tecidos adiposo, conjuntivo e linfático localizados na mama. Os tumores originados nos ductos e nos lóbulos lactíferos podem ser classificados em adenocarcinoma *in situ* ou invasivo (American Cancer Soc, 2017). O adenocarcinoma *in situ* é aquele em que células ainda não ultrapassaram a membrana basal e por isso, não atingem vasos sanguíneos ou linfáticos e não dão metástases; eles podem progredir para o tipo invasivo dependendo das alterações genéticas que surgirem nas suas células (American Cancer Soc, 2017). Desse modo, nos adenocarcinomas invasivos ou infiltrantes ocorre rompimento da membrana basal e células invadem o tecido adjacente. A maioria das neoplasias mamárias, como citado anteriormente, é do tipo invasiva, correspondendo a cerca de 70 - 80% (Estimativa INCA 2016; American Cancer Soc., 2017; Equipe ONCOGUIA, 2018).

O câncer de mama pode também ser classificado considerando-se aspectos moleculares das células neoplásicas. Nesses casos, os principais subtipos incluem aqueles cujas células expressam ou não receptores para os hormônios estrógenos (RE) e/ou progesterona (RP); expressam excessivamente ou não o receptor do fator de crescimento epidermal humano 2 (HER2). Considerando esses parâmetros, os tumores de mama são classificados em câncer Luminal A, câncer Luminal B, câncer HER2 positivo (HER2<sup>+</sup>) e câncer triplo-negativo. O câncer Luminal A é um tipo de câncer cujas células expressam receptores hormonais de estrógenos e/ou o da progesterona, porém não expressam excessivamente o HER2, eles tendem a crescer de forma relativamente lenta e corresponde a 71% de todos os

cânceres de mama. O câncer Luminal B inclui os tumores que expressam receptores de estrógenos e/ou da progesterona, além de superexpressarem o HER2; nesses tumores as células proliferam muito aceleradamente e eles correspondem a 12% de todos os cânceres de mama (American Cancer Soc., 2017; Equipe ONCOGUIA). O subtipo HER2<sup>+</sup> não expressa o RE nem o RP, mas superexpressa o HER2, geralmente esse câncer, assim como o Luminal B, tende a crescer rapidamente e representam 5% dos casos (American Cancer Soc., 2017). Os cânceres do tipo triplo-negativo não expressam receptores de estrogênios nem de progesterona e não superexpressam o HER2, representam 12% dos casos (American Cancer Soc., 2017). O marcador Ki-67 é importante para medir a proliferação e crescimento celular e apresenta várias aplicações na terapia neoadjuvante. Assim, tumores que expressam a pKi-67 é indicador prognóstico ou preditivo de metástase (Buitrago *et alli*, 2011).

### **FATORES DE RISCO DO CÂNCER DE MAMA**

Os fatores que favorecem o aparecimento do câncer de mama são diversos tais como: predisposição genética, menarca precoce, menopausa tardia, reposição hormonal, obesidade, entre outros (American Câncer Soc., 2015).

A predisposição genética está associada à presença de alterações genéticas herdadas, sendo que as mais estudadas são as alterações nos genes *BRCA1* e *BRCA2*, cujos produtos participam do reparo do DNA e da regulação da transcrição gênica. Estas alterações estão presentes em 5 a 10% de todos os casos de câncer de mama e em 15 a 20% dos casos com histórico

familiar (American Câncer Soc., 2015).

A história familiar configura-se na presença de algum caso de câncer de mama em parentesco de primeiro grau tal como mãe, filha ou irmã. Deste modo, a probabilidade de desenvolver câncer de mama é aumentada em duas vezes se houver um caso na família e em três vezes se houver dois casos na família; o risco é ainda maior quanto mais jovem for a mulher (American Câncer Soc., 2015).

A menarca precoce, a menopausa tardia e a reposição hormonal influenciam o aparecimento da doença porque expõem por mais tempo o tecido epitelial mamário a hormônios esteroides. Esses hormônios estimulam as células glandulares mamárias à proliferação, aumentando-lhes o risco de adquirirem algum dano no seu DNA. Assim, quanto maior o número de ciclos menstruais, maior o risco de câncer de mama; mulheres em que a menarca acontece tardiamente têm 20% menos chance de desenvolver câncer de mama para cada ano de atraso. Da mesma forma, mulheres em que a menopausa acontece antes dos 36 anos de idade têm 90% menos chance de desenvolver câncer mamário quando comparado às mulheres em que a menopausa aconteceu aos 55 anos de idade. Ressalta-se que mulheres que já passaram da menopausa e têm câncer de mama apresentam níveis de estrógeno plasmático maiores do que mulheres não afetadas, em torno de 15% a mais (Weimberg, 2ª ed). Considerando ainda os fatores hormonais, a amamentação está associada à diminuição do risco de desenvolver câncer de mama, a cada 12 meses de amamentação o risco de aparecimento da doença diminui em 4% segundo a Associação Americana de Câncer (American Câncer Soc., 2015). Já o uso de contraceptivos orais está associado a um discreto aumento na

probabilidade de desenvolver câncer de mama, principalmente se isso ocorrer antes dos vinte anos de idade, ou antes, da primeira gravidez, embora esse risco se extinga após dez anos de interrupção do uso, se igualando a quem nunca ingeriu contraceptivos hormonais (Chan, 2016).

A obesidade é um fator de risco para o câncer de mama, pois nos adipócitos, estimulada pela insulina e cortisol, ocorre a aromatização da androstenediona pela enzima aromatase P450 convertendo-a em estrona, um dos três tipos do hormônio estrogênio (Chan, 2016).

Em diversos países, muitas mulheres consideradas de alto risco optam por fazer a mastectomia profilática ou começam a usar medicamentos antiestrogênicos, tais como o Tamoxifeno ou o Raloxifeno; segundo estudo da Associação Americana de Câncer, essa profilaxia reduz o risco de câncer de mama em até 38% por mais de 10 anos (American Cancer Soc., 2015).

## **TRATAMENTOS DO CÂNCER DE MAMA**

Atualmente, as terapias aplicadas ao tratamento do câncer incluem cirurgia, radioterapia, quimioterapia e hormônio-terapia ou imunoterapia, sendo que a primeira é um tratamento mais local e as outras constituem tratamento sistêmico (Barros, 2001).

Com relação à cirurgia existem dois tipos: a conservadora e a não conservadora. A cirurgia conservadora envolve a retirada do tumor sem margens ou com margens, mantendo a maior parte da mama e é chamada de ressecção segmentar. A ressecção segmentar é indicada em tumores menores que dois centímetros cujas margens cirúrgicas sejam livres de comprometimento (Barros, 2001). Já a cirurgia não conservadora pode consistir

na mastectomia subcutânea, quando são retiradas as glândulas mamárias, preservando-se a pele e a aréola, ou na mastectomia total, quando a mama é retirada por completo, preservando-se ou não o músculo peitoral (Barros, 2001). Esse tipo de cirurgia é indicado para remoção de tumores maiores que dois centímetros ou quando devido à sua extensão, o tumor não apresenta margens livres em função da multicentricidade tumoral; em lesões pré-neoplásicas difusas ou de forma profilática (Barros, 2001). Além disso, pode ser realizada a linfadenectomia, remoção cirúrgica de um ou mais grupos de linfonodos como medida profilática para micrometástases já que o linfonodo sentinela é o primeiro a drenar micrometástases do tumor primário (Barros, 2001). Embora essas intervenções cirúrgicas, mesmo as conservadoras, a mais empregadas atualmente, levem a bons resultados terapêuticos, elas induzem grande impacto psicológico e estético. A linfadenectomia também induz alguns efeitos colaterais como a diminuição da mobilidade do braço, a diminuição da força muscular, linfedema, entre outros (Batiston, 2005).

Após a cirurgia, podem seguir-se as sessões de radioterapia e/ou quimioterapia, uns dos fatores pós-mastectomia são tumores maiores que 5 cm; pele comprometida; dissecação axilar e margens comprometidas. A radioterapia, que em 96% dos casos eleva a sobrevida da paciente em até 15 anos, embora a taxa de recidiva seja de 10% (Barros, 2001), é um método de tratamento local e/ou regional. Já a quimioterapia é um tratamento sistêmico, utilizado com o objetivo de erradicar possíveis micrometástases regionais ou distantes. Ela também pode ser recomendada para tornar tumores irressecáveis em ressecáveis, a fim de se evitar a mastectomia total e assim, realizar a cirurgia conservadora (Barros, 2001; Machado, 2008). Nesse caso

ela é denominada de quimioterapia neoadjuvante. Assim como a radioterapia, a quimioterapia aumenta a sobrevida livre de doença e a sobrevida global, diminuindo o risco de recidivas (Condel, 2006; Machado, 2008).

Enquanto que a radioterapia envolve o emprego de feixe de radiações ionizantes, a quimioterapia envolve a administração de substâncias químicas, isoladas ou em combinação. Os medicamentos antineoplásicos mais empregados incluem substâncias alquilantes, antimetabólitos, antibióticos antitumorais, inibidores mitóticos, entre outros. Os alquilantes inibem a proliferação das células adicionando grupamentos alquila, ( $\text{CH}_3$  ou  $\text{C}_2\text{H}_5$ , por exemplo) a determinadas bases do DNA, um desses alquilantes é a Ciclofosfamida. Os quimioterápicos antimetabólitos, incluindo o Metotrexato e o 5-Fluorouracil, também inibem a replicação celular, mas o fazem bloqueando vias metabólicas, incluindo as envolvidas na síntese de componentes essenciais dos ácidos nucleicos. Os antibióticos antitumorais se ligam ao DNA, intercalando-se entre as suas bases nitrogenadas, o que causa distorções na fita de DNA, provocando a sua quebra e impedindo a duplicação celular. A Doxorrubicina é um tipo de um antibiótico antitumoral. Os inibidores mitóticos ligam-se às proteínas dos microtúbulos, promovendo a sua ruptura o que ao bloqueio da divisão celular durante a metáfase. O Paclitaxel, e o Docetaxel são exemplos de quimioterápicos inibidores da divisão celular empregados na quimioterapia contra o câncer de mama. Alguns quimioterápicos inibem especificamente a topoisomerase, enzima necessária para o término da replicação do DNA. Todas essas ações dos quimioterápicos, devido a pouca seletividade dos fármacos para o tecido neoplásico, ocorrem também em células não neoplásicas, causando toxicidade aos tecidos normais, o que limita

a biodisponibilidade do fármaco, sendo necessárias altas doses de medicamento. Doses muito altas de medicamento podem destruir a medula óssea, causar anemia intensa, sangramentos pela falta de plaquetas e infecções graves associadas à diminuição temporária de leucócitos. Além desses efeitos adversos, a quimioterapia também induz náuseas, vômitos e disfunção cognitiva, além de maior prevalência de sintomas depressivos (Condell, 2006). Vale ressaltar que células neoplásicas podem desenvolver mecanismos de resistência a fármacos (Shapira *et alli*, 2011; Markman, 2013).

As pacientes também podem ser submetidas à hormonoterapia ou a imunoterapia de modo a evitar recidivas. Nos casos em que o tumor é do tipo luminal (A e B), ou seja, receptor hormonal positivo (RE<sup>+</sup> ou RP<sup>+</sup>), as pacientes, durante cinco anos após a quimioterapia, fazem uso contínuo de um antiestrogênico (hormonoterapia) (American Câncer Soc., 2017), de modo a impedir que os estrógenos se liguem a seus receptores e atuem como fator de crescimento das células mamárias malignas sobreviventes. Nesses casos podem ser utilizados medicamentos que se liguem ao receptor de estrógeno, impedindo que ele se ligue ao seu receptor, mas podem também ser utilizados inibidores da aromatase, pois eles impedem a produção de estrogênio nas glândulas suprarrenais e na gordura. Esses inibidores de aromatase normalmente são indicados a mulheres que estejam na pós-menopausa. Além desses, podem também ser utilizados medicamentos que causem a degradação do receptor de estrógenos. Segundo Barros e colaboradores em publicação da Sociedade Brasileira de Mastologia, a hormonoterapia reduz de 1,6 para 0,9% a recidiva pós-cirurgia (Barros, 2001).

Nos casos em que os tumores são HER2<sup>+</sup>, as pacientes são

submetidas a imunoterapia com anticorpos monoclonais específicos, tais como o Trastuzumab, o Pertuzumab, o Trastuzumab-Emtansine e o Lapatinibe (American Cancer Soc., 2015). Esses anticorpos, que normalmente são administrados junto com a quimioterapia, ligam-se à porção extracelular do receptor HER2<sup>+</sup> impedindo a sua dimerização. Os cânceres tipo triplo-negativos possuem pior prognóstico, pois não existem terapias específicas para esse tipo de tumor (American Cancer Soc., 2015; American Cancer Soc., 2017; Equipe Oncoguia, 2018).

Mesmo havendo diversas opções de tratamento, nenhuma delas é plenamente eficaz. No tumor Luminal A, por exemplo, a quimioterapia não traz muitos benefícios, assim como a hormonoterapia, sendo comum a ocorrência de recidiva tardia, depois de cinco anos. Já os tumores HER2<sup>+</sup> e triplos negativos, mesmo aplicando-se as terapias mais indicadas atualmente, há alto índice de recidiva, de três a quatro anos, enquanto que em caso dos tumores luminal B o comportamento é imprevisível (Machado, 2008).

Considerando a diversidade molecular dos tumores de mama e os vários efeitos adversos das terapias aplicadas, bem como a limitação de cada uma delas, é interessante desenvolver uma terapia mais eficaz, com maior seletividade ao tecido tumoral, eliminando assim as células neoplásicas com menos efeitos adversos. Nesse sentido, por meio da nanobiotecnologia possível desenvolver estruturas que possibilitem direcionar o tratamento às células neoplásicas evitando-se danos ao tecido normal, causando menos efeitos adversos e aumentando-se a eficácia terapêutica.

## **NANOTECNOLOGIA**

A nanotecnologia é uma vertente da ciência que manipula a matéria na escala nanométrica em pelo menos uma dimensão. Nessa escala, onde 1 nm compreende um bilionésimo do metro, a matéria adquire propriedades que na escala macrométrica não são observadas. Deste modo, o material pode se tornar condutor de eletricidade, adquirir propriedades ópticas, apresentar tolerância à temperatura, adquirir reatividade química, apresentar maior resistência à força e a dureza. Esta variedade de possibilidades desperta grande interesse da indústria em diversas áreas de atuação, como por exemplo, no automobilismo, no esporte, na engenharia, na informática, na área de cosméticos e na medicina (Pavon, 2007; Gao, 2014). Esta última se beneficia com a nanomedicina, que é a nanotecnologia aplicada ao desenvolvimento de substâncias terapêuticas e para diagnósticos, podendo ser empregada na prevenção, na detecção e no tratamento de doenças, inclusive do câncer. Além destes, as nanoestruturas podem agir como substâncias antimicrobianas, carrear vacinas e genes, entre outras funções (Parveen, 2012; Gao, 2014; Xu, 2015;)

A nanomedicina possibilita a entrega do fármaco a uma taxa específica a um determinado local, melhorando assim a ação terapêutica e reduzindo alguns dos efeitos adversos consequentes da administração convencional. Isso possibilita o uso terapêutico de novos fármacos, que antes era limitado pela segurança e efetividade do sistema de entrega (Parveen, 2012). Muitos fármacos que apresentam baixa solubilidade, alta toxicidade, devem ser administrado em altas concentrações para serem efetivos, possuem alta taxa de degradação, pequeno tempo de circulação e entrega não específica. Assim,

com a nanotecnologia, estes fatores limitantes podem ser contornados e, muitos dos fármacos, usados ou até mesmo abandonados devido a algum efeito adverso, podem ter seu uso inovado e melhorado. Um exemplo é a Doxorrubicina, que teve seu uso otimizado quando foi encapsulada a lipossomos com metoxipolietilenoglicol (MPEG) conjugado na superfície. Assim, ocorre a proteção contra o sistema mononuclear fagocitário, o que prolonga o tempo na circulação sanguínea (meia-vida de aproximadamente 72h ao invés de 24h) além de diminuir a toxicidade. Muitos peptídeos antes facilmente degradados ou proteínas com meia-vida curta podem ser protegidos do meio biológico e ter sua farmacocinética melhorada (Parveen, 2012). Assim, a nanomedicina pode tornar o tratamento do câncer mais eficaz, pois melhora a biodisponibilidade do fármaco, permite a sua liberação de forma sustentada, reduzindo a dose necessária para que seja alcançada a faixa terapêutica, além de ser alvo-específico na entrega do fármaco, pois permite o acoplamento de ligantes à superfície das nanoestruturas, reduzindo os efeitos adversos aos tecidos normais e melhorando a captação celular e a solubilidade de fármacos insolúveis, entre outros (Parveen, 2012; Xu, 2015).

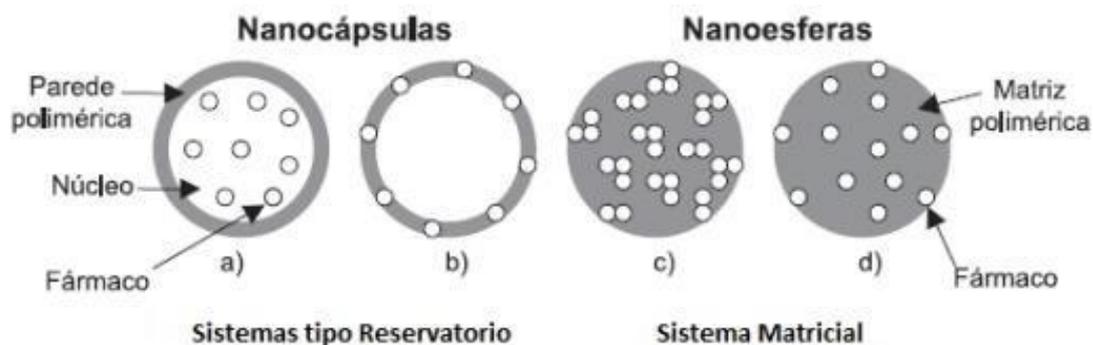
As formulações com tais finalidades podem ser carregadas ao sítio alvo por meio de várias nanoestruturas, como nanopartículas poliméricas, nanocápsulas, nanoesferas, micelas, dendrímeros, lipossomas, entre outros. Estas nanoestruturas podem alcançar o sítio alvo por meio de processo passivo ou ativo (Parveen, 2012; Xu, 2015). No processo passivo, devido ao pequeno tamanho das partículas, a penetração no tumor é favorecida, pois os vasos sanguíneos tumorais possuem fenestras aumentadas, de 10 a 500 nm quando comparadas às dos vasos normais, que têm no máximo dois

nanômetros (Xu, 2015). Desse modo, as nanoestruturas passam facilmente pelas fenestras e se acumulam no tecido tumoral. Ao mesmo tempo, a drenagem linfática também é comprometida no tumor, fazendo com que as nanopartículas fiquem retidas no tumor. Este processo é conhecido como permeação e retenção aumentadas (EPR) (Parveen, 2012; Xu, 2015). Porém, a distribuição das nanopartículas (NP) devido a esse efeito é desigual, pois acaba sobrecarregando o sistema reticuloendotelial, acumulando partículas no fígado e no baço. Além disso, as diferenças na permeabilidade entre tumores e a alta pressão intersticial podem causar extravasamento das NP do interior do tumor para regiões mais externas (Xu, 2015) Além do EPR, no processo passivo ocorre também a entrega localizada, onde é possível entregar o agente terapêutico diretamente ao tumor. Isso vem sendo utilizado nos tratamentos de câncer de próstata e de cabeça e pescoço. Compreendem-se como NP conjugadas as que são capazes de melhorar a captação do fármaco pelas células, além de sustentar a sua retenção dentro da célula quando comparado ao fármaco livre ou às nanopartículas não conjugadas. Por exemplo, segundo estudo publicado de Sahoo e colaboradores em 2006, a conjugação de NP com Paclitaxel e Transferrina permitiu maior captação desses fármacos pelas células, aumentando o efeito antiproliferativo (Sahoo, 2006; Parveen, 2012).

Já no processo ativo é necessário conjugar o fármaco a um ligante receptor-específico para que ele seja direcionado a célula-alvo. Lembrando que o ligante deve ter afinidade e especificidade por um determinado tipo de receptor da superfície celular (Parveen, 2012).

## NANOCÁPSULAS

Os fármacos carregados em nanoestruturas podem ser encapsulados, adsorvidos na superfície ou aprisionados em uma matriz (Parveen, 2012). Os nanocarreadores do tipo nanocápsulas são sistemas vesiculares com envoltório polimérico e com o núcleo interno hidrofílico ou hidrofóbico, dependendo do material e método de preparação. A substância carregada pode estar em sua forma líquida, sólida ou em dispersão molecular. O fármaco pode estar encapsulado no núcleo ou adsorvido na superfície polimérica (Mora-Huertas, 2010; Parveen, 2012). Na Figura 1 estão ilustrados alguns exemplos de nanocápsulas e de nanoesferas.



**Figura 1:** Representação esquemática de nanocápsulas e de nanoesferas poliméricas: a) fármaco dissolvido no núcleo oleoso das nanocápsulas; b) fármaco adsorvido à parede polimérica das nanocápsulas; c) fármaco retido na matriz polimérica das nanoesferas; d) fármaco adsorvido ou disperso molecularmente na matriz polimérica das nanoesferas. Fonte: Schaffazick, 2003.

Para obtenção das nanocápsulas existem seis métodos possíveis, dentre eles: nanoprecipitação, emulsificação por difusão, dupla-emulsificação, emulsificação-coacervação, revestimento por polímero e camada a camada (Mora-Huertas, 2010).

Neste estudo foi utilizado o método de nanoprecipitação. Para que este método seja realizado são necessárias duas fases, uma em que se utiliza um

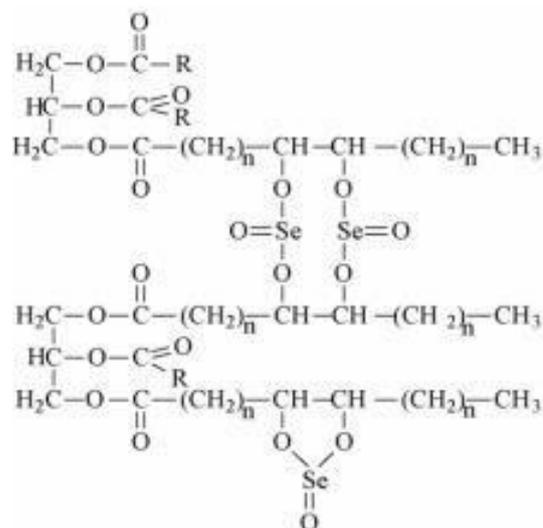
solvente, o polímero, para formar o filme, e a substância de interesse e a outra em que se utiliza uma mistura de não solventes associados a um surfactante. Essas duas fases constituem respectivamente a fase orgânica e a fase aquosa, respectivamente (Mora-Huertas, 2010). Para execução deste método a fase orgânica é dispersa, sob agitação, de forma lenta na fase aquosa e como a tensão superficial desta fase é alta ocorre um turbilhão atraindo a fase orgânica, fazendo com que o polímero se deposite na interface do óleo, formando assim, as nanocápsulas (Mora-Huertas, 2010).

Para a formação das nanocápsulas (NP) é necessário selecionar o polímero, cuja escolha depende do tamanho da NP almejada, da solubilidade e da estabilidade em fase aquosa, da permeabilidade da superfície polimérica e do perfil do fármaco a ser disperso (Santos, 2016). Dentre esses, se destaca o copolímero PVMMMA [poli(metil vinil-éter-co-anidrido maléico)] que vem sendo aplicado de diversas maneiras, como formas bioadesivas para administração de fármacos por via tópica ou oral, como adesivos para dentaduras, adesivos transdérmicos e filmes de revestimento (Li, 2010; Rodriguez, 2010) Esse material é biodegradável, biocompatível (Yoncheva, 2005; Li, 2010; Rodriguez, 2010) e os grupamentos anidridos presentes em sua cadeia favorecem a ligação de moléculas como hidroxilas e aminas; em meio aquoso ocorre hidrólise desses grupamentos (Li, 2010). As NP são eficientes para carrear fármacos lipofílicos ou hidrofílicos, tais como o fármaco Selol.

## **SELOL**

O Selol é uma mistura semissintética de selenitotriacilglicerídeos derivados do óleo de girassol contendo selênio no estado de oxidação (+4)

(Flis, 2015; Staron, 2010), ver Figura 2. O Selênio é um oligoelemento que advém da dieta e é importante para as atividades celulares, pois faz parte do centro ativo de muitas proteínas e enzimas, como a glutathiona peroxidase e a tioredoxina redutase. Em altas doses, o Selênio se torna pró-oxidante inibindo o crescimento celular e apresentando citotoxicidade (Staron, 2010; Fernandes, 2015). Na forma orgânica ele é encontrado em cereais e vegetais e a sua absorção é em torno de 90 a 95%, enquanto que na forma inorgânica ele é encontrado principalmente na água, sendo nesse caso a sua absorção apenas de 10% (Staron R 2010, Pieczynska J, 2015).



**Figura 2:** Representação esquemática da estrutura química do Selol. Fonte: Flis e colaboradores, 2015.

O Selênio é de suma importância já que integra as selenoproteínas, ativa enzimas anticarcinogênicas, previne doenças cardiovasculares, apresenta efeitos antiproliferativo e anti-inflamatório, além de estimular o sistema imunitário (Pieczynska, 2015). Pode estar em diferentes estados de oxidação, variando do neutro (0), na forma de seleneto (-2), selenito (+4) e selenato (+6) (Staron, 2010). O Selênio possui atividade biológica anticâncer na sua forma

tetravalente (+4) Segundo Fernandes e Gandin (2015), o Selênio protege as células não tumorais contra danos oxidativos e inibe a proliferação de células tumorais. Os seus metabólitos são tóxicos e pró-oxidantes às células neoplásicas, que são mais sensíveis a ele do que as células não neoplásicas (Fernandes, 2015). Além disso, o Selênio regula e modula o estado redox do meio circundante, interfere na metilação do DNA, modifica as histonas e inibe a angiogênese (Staron, 2010; Luo, 2012; Miranda, 2014; Flis, 2015) De acordo com Flis e colaboradores (2015), o Selol mostrou atividade antineoplásica em muitas linhagens tumorais, tais como linhagens de melanoma, de câncer de próstata, de cólon, de pele, de mama e de leucemia (Flis, 2015), além de tornar as células mais sensíveis à Doxorubicina, um quimioterápico muito utilizado no tratamento de câncer de mama, aumentar os efeitos terapêuticos da radiação em tumores hormônio-independente e ser seletivo para células resistentes a drogas (Luo, 2012; Arsenyan, 2014; Flis, 2015; Fernandes, 2015). Além de atividade antitumoral, compostos com selênio orgânico apresentaram atividade antimicrobiana, anti-neurodegenerativa e antiviral (Cruz, 2016), o que demonstra que a aplicação do Selol na área médica é bastante diversa e multifatorial.

Porém, se o Selênio for nanoencapsulado, sua eficácia pode ser aumentada. Segundo Huang e colaboradores (2013), o Selol em nanocarreadores apresenta melhor biocompatibilidade, maior bioeficácia e menor toxicidade quando comparado às formas inorgânica e orgânica livre (Huang, 2013). Considerando esta informação, bem como o fato de que o Selol sensibiliza as células neoplásicas tornando-as mais suscetíveis a fármacos e à radiação, é plausível acreditar que células neoplásicas sensibilizadas com Selol seriam menos resistentes à Terapia Fotodinâmica.

## TERAPIA FOTODINÂMICA

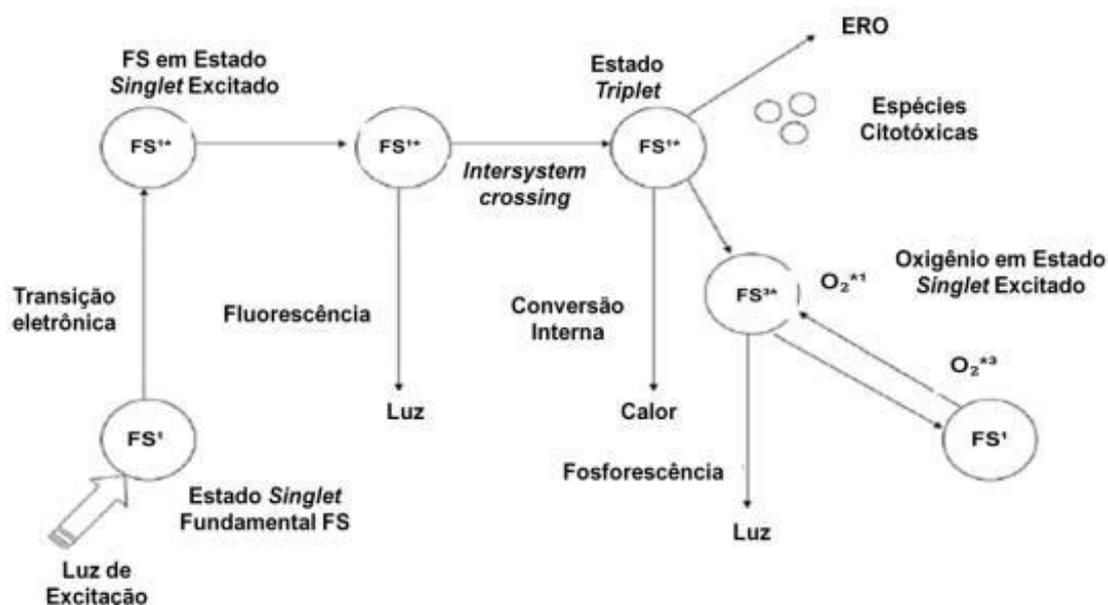
A Terapia Fotodinâmica (TFD) é uma terapia que não provoca tantos efeitos adversos como a quimioterapia e a radioterapia e nem tantos efeitos cosméticos como a cirurgia (Chen, 2014). A TFD é um procedimento aprovado para aplicação clínica em vários tipos de neoplasias e outras doenças, como as superficiais de pele, por exemplo (Master, 2013; Fan, 2014; Hu, 2015). Ela é minimamente invasiva, pode ser aplicada várias sessões e é seletiva à área tumoral, pois se utiliza preferencialmente um fármaco que, além de poder ser administrado diretamente no tumor, só é ativado quando é irradiado, sendo a irradiação administrada apenas no local da neoplasia (Wang, 2013; LIM, 2013; Li, 2014; Wang, 2015).

A TFD envolve três componentes básicos, oxigênio molecular, substância fotossensibilizante e luz em um comprimento de onda específico (Chen, 2014; Hu, 2015; Wang, 2015). O fotossensibilizante (FS) é ativado pela luz, depois de excitado reage com o oxigênio molecular existente no tecido, produzindo espécies reativas de oxigênio. Estes interagem com macromoléculas das células circundantes, causando-lhes morte por apoptose, necrose, autofagia, danos à rede vascular tumoral e estímulo do sistema imunitário (Lim, 2013; Marrache, 2013; Chen, 2014; Wang, 2015).

As espécies reativas de oxigênio incluem o radical hidroxila ( $\text{OH}\cdot$ ), o peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), o radical superóxido ( $\text{O}_2\cdot^-$ ) (Hu *et alli*, 2015), mas o grande responsável pelos danos celulares é o oxigênio singleto. O fenômeno fotofísico é exemplificado na Figura 3. Nessa figura pode se ver que o FS ao ser excitado pela luz sai do estado fundamental e atinge o estado excitado de alta energia, o estado singleto. Ele pode retornar ao estado fundamental

emitindo luz na forma de fluorescência ou pode ocorrer conversão intersistema, responsável pela formação do estado tripleto. Este, por sua vez, interage com as moléculas circunvizinhas, o que envolve a transferência de elétrons, originando radicais livres, reação tipo I. Pode ocorrer a reação tipo II, essa envolve a transferência de energia do fotossensibilizante em seu estado excitado para o oxigênio molecular tecidual, formando o oxigênio singlete que pode interagir com biomoléculas (Paszko, 2011; Wang, 2013; Lim, 2013).

Os danos causados pela interação do oxigênio singlete com as biomoléculas são responsáveis pela morte celular que ocorre por diferentes vias. Se for por apoptose ocorre o encolhimento da célula, condensação da cromatina e fragmentação do DNA, enquanto que se for por necrose, a célula incha e sofre lise, sem compartimentalização prévia (Paszko, 2011). O tipo de morte celular depende da dose de luz aplicada, do tipo de célula e da concentração de FS (Moserova, 2012).



**Figura 3:** Diagrama de Jablonsky simplificado. Mecanismo geral de geração de espécies reativas de oxigênio mediadas pela luz. Adaptado Robertson *et alli*, 2009.

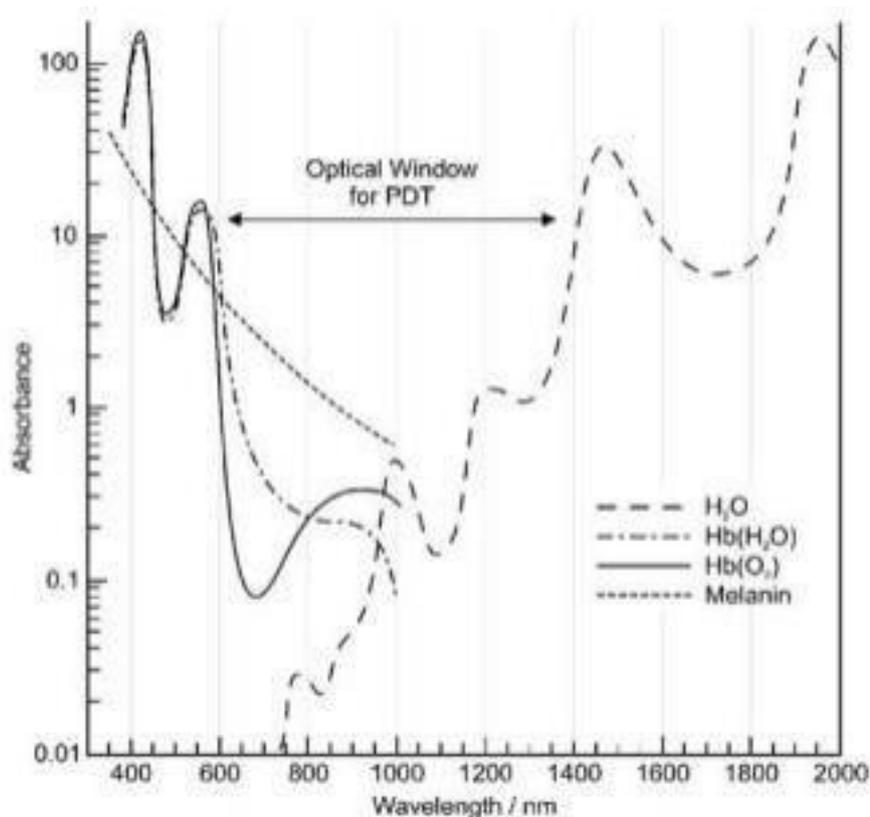
A TFD pode provocar liberação de cálcio pelo retículo endoplasmático, inibição da proteína Bcl-2, fotodano à membrana mitocondrial ou lisossomal (Moserova I, 2012) e lesionar a vasculatura tumoral, causando a ablação da neoplasia já que a vascularização do local é importante para manutenção do tumor. Também induz resposta inflamatória local, podendo desencadear a resposta imunitária antitumoral, visto que a TFD provoca a exposição ou liberação de moléculas associadas ao dano (DAMP) com posterior ativação das células dendríticas e, por conseguinte, ativação da resposta imune adaptativa (Marrache, 2013; Wachowska, 2014).

Para que a TFD seja eficiente é necessário que a luz tenha comprimento de onda capaz de penetrar no tecido biológico e assim interagir com o fotossensibilizante, ou seja, o comprimento de onda emitido pela luz deve coincidir com janela óptica tecidual, que varia de 600-800 nm, Figura 4 (Celli, 2010).

Desse modo o fotossensibilizante deve ter alto coeficiente de absorção na faixa de 650-850 nm, deve induzir quantidade significativa de oxigênio singlete e ser solúvel nas condições fisiológicas. Idealmente, o FS não deve ser tóxico na dose terapêutica, deve ser seletivo para o tecido tumoral e deve ser excretado rapidamente do corpo para não causar fotossensibilização. Além disso, deve, de preferência, ter baixo custo de produção e ser de fácil síntese (Paszko, 2011; Shibu, 2013).

Os fotossensibilizantes são classificados em porfirínicos e não-porfirínicos. Os porfirínicos são classificados em primeira, segunda e terceira geração. Os fotossensibilizantes de primeira geração apresentavam alta toxicidade e período longo de acúmulo no organismo (Paszko, 2011; Shibu,

2013). Por isso, foram desenvolvidos os de segunda geração, cuja faixa de absorção corresponde à janela óptica tecidual, possuem alto coeficiente de extinção molar com menor toxicidade, porém ainda são pouco seletivos ao tecido tumoral e apresentam alta hidrofobicidade (Paszko, 2011; Shibu, 2013). Já os de terceira geração são associados a moléculas carreadoras que aumentam a seletividade ao tecido alvo e também melhoram a sua hidrofobicidade em meio aquoso, resultando em menor acúmulo no tecido não tumoral. Já os não porfirínicos são exemplificados pela hipericina, azul de metileno, rodocianina, entre outros (Paszko, 2011; Shibu, 2013).



**Figura 4:** Janela ótica do espectro de absorção para aplicação da Terapia Fotodinâmica Fonte: Plaetzar *et alli*, 2009.

Nesse contexto, as ftalocianinas despertam grande interesse como FS uma vez que possuem forte absorção na faixa do vermelho, apresentam

elevado rendimento quântico de estado tripleto e meia vida longa para o estado tripleto (Paszko, 2011; Shibu, 2013). Além de poderem ser facilmente carregadas por nanoestruturas tais como: nanopartículas poliméricas, dendrímeros e nanoemulsões.

### **NANOEMULSAO DE FTALOCIANINA**

Nanoemulsão é uma mistura de dois líquidos imiscíveis, podendo ser do tipo óleo em água (O/A) ou água em óleo (A/O). Pode ser obtida por diferentes métodos, podendo ser divididos em alta energia e baixa energia, subdividida em emulsificação espontânea ou inversão de fase por temperatura. Este último é de maior interesse industrial (Divsalar, 2012).

Algumas características das nanoemulsões, tais como a melhora na solubilização de fármacos hidrofóbicos, estabilidade contra floculação, coalescência e sedimentação, além da habilidade em não danificar células não tumorais e a facilidade de produção favorecem o seu uso na medicina. Por isso, esse tipo de formulação tem despertado interesse, pois além de constituir um sistema de entrega de fármacos, pode aumentar o tempo de retenção do mesmo no corpo e assim reduzir a quantidade necessária de fármaco para alcançar a terapêutica pretendida (Divsalar, 2012). Da mesma forma, a Ftalocianina, um FS que possui anel tetrapirrólico aromático capaz de se complexar com diferentes moléculas de metais, tem-se mostrado bastante eficiente na terapia fotodinâmica antineoplásica, pois é excitado no comprimento de onda equivalente ao vermelho, o que corresponde à absorção tecidual, possui no estado excitado alta capacidade de indução de oxigênio singleto por transferência de energia, além de possuir meia vida longa (Souza,

2016). Como fotossensibilizante de segunda geração é rapidamente eliminado do organismo, induzindo fotossensibilização mínima. Todavia, para que não haja redução do seu efeito fotobiológico, devido à sua agregação decorrente da sua hidrofobicidade, é importante associar a Ftalocianina a nanoestruturas tais como nanoemulsões que possibilitem melhorar a sua permeabilidade e aumentar a sua captação pelas células, além de permitir o seu acúmulo seletivamente no tecido acometido e a sua liberação de maneira controlada (Souza, 2016) o que a tornaria ideal para ser utilizada na Terapia Fotodinâmica aplicada ao câncer, inclusive no de mama.

## **2. JUSTIFICATIVA**

Considerando as estatísticas nada promissoras para os acometimentos por câncer, dentre eles o de mama, mais comum em mulheres; o grande desafio atualmente consiste no desenvolvimento de terapias que devem ser eficazes na erradicação do tumor, levando à cura da doença, e induzir efeitos adversos mínimos, melhorando-se assim, a qualidade de vida das pessoas acometidas por essa neoplasia.

Essas terapias poderiam utilizar nanossistemas que carreassem uma ou mais drogas que possibilitem a utilização de uma ou duas modalidades terapêuticas combinadas. Nesse caso, é plausível acreditar em uma terapia que sensibilize as células tumorais à radiação de modo que a aplicação da Terapia Fotodinâmica seja mais eficaz, isto, por si só, justifica esta pesquisa.

### **3. OBJETIVOS**

Diante do exposto nos capítulos anteriores, este estudo se propôs a avaliar se sensibilização com Selol potencializa os efeitos da Terapia Fotodinâmica, mediada pela NE-AIFtCl, na erradicação de tumores de mama.

Para tal, foram realizados estudos, *in vitro* e *in vivo*, e estabelecidos os seguintes objetivos específicos:

- formular, caracterizar e determinar a estabilidade coloidal da nanoemulsão de Alumínio-Cloro Ftalocianina (NE-AIFtCl) e das nanocápsulas contendo Selol (NcSe) tais como diâmetro hidrodinâmico; índice de polidispersão e potencial zeta através de dispersão dinâmica de luz (DLS) e a morfologia através de microscopia eletrônica de transmissão e varredura (MET e MEV);
- determinar a taxa de viabilidade celular induzida pela NE-AIFtCl e pelas NcSe e pela combinação desses dois compostos, por meio do ensaio de metabolização de brometo de 3 (4,5 dimetiltiazol-2il)-2,5-difenil-tetrazólio (MTT);
- determinar o potencial elétrico de membranas mitocondriais e a taxa de fragmentação do DNA induzidos pela Terapia Fotodinâmica aplicada em células previamente sensibilizadas com Selol, por meio de citometria de fluxo;
- analisar a dinâmica do ciclo celular e a morfologia de células sensibilizadas com Selol e depois submetidas à Terapia Fotodinâmica, por meio de citometria de fluxo;
- avaliar os níveis de inflamação, por meio da mensuração da enzima Mieloperoxidase, por bioluminescência, em camundongos Balb/c sensibilizados com Selol e submetidos à Terapia Fotodinâmica;

- analisar a biocompatibilidade da NE-ALCFT e da NcSe, por meio de hemograma e de ensaios bioquímicos, assim como por meio de análises histopatológicas de diferentes órgãos de camundongos Balb/c idosos e jovens;
- avaliar a eficácia da Terapia Fotodinâmica, mediada pelo NE-AIFtCl, na erradicação de tumores de mama, cujas células foram previamente sensibilizadas com Selol em camundongos Balb/c idosos e jovens, por meio de análises histopatológicas dos tecidos tumorais e de linfonodos sentinelas.

#### **4. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **4.1. Ensaio *in vitro***

##### **4.1.2. Preparo das nanocápsulas com Selol**

No presente estudo para tornar as células mais sensíveis à radiação, utilizou-se o composto Selol, cedido pelo Warsaw Medical University (Polônia), contido em nanocápsulas. Essas nanocápsulas apresentam em sua constituição o polímero poli(metil vinil-éter-co-anidrido maléico) (PVMMA) e foram obtidas pelo método de nanoprecipitação, que consiste na precipitação do polímero na interface óleo/água.

Para isso, em um béquer foi formada a fase orgânica, pela mistura do óleo (Selol) e do polímero à acetona (solvente orgânico). Em outro béquer, foi formada a fase aquosa pela mistura da água e do tensoativo Tween-80. Esta fase apresenta alta tensão superficial, responsável pela atração da fase orgânica ao ocorrer a mistura das duas soluções. Desse modo, é gerada uma turbulência interfacial dos sistemas e como consequência, ocorre a deposição do polímero na interface óleo/água.

Para a obtenção da formulação, o Selol foi colocado em contato com a acetona, sob agitação, e o tensoativo polisorbato 80 (Tween80) colocado em dez mL de água nanopura, também sob agitação. Após completa solubilização do Selol, o polímero foi adicionado a esta fase orgânica e mantido sob agitação por aproximadamente dez minutos para sua completa solubilização. Após isso, foram adicionados dez mL de etanol 96 °GL. Após completarem-se as solubilizações, a fase aquosa foi vertida vagarosamente sob a fase orgânica ainda sob agitação. Assim que ocorreu a deposição do polímero e a formação das nanocápsulas, os solventes foram removidos por destilação fracionada a

40 °C, sob pressão reduzida de 50 mbar em rotaevaporador (RotavaporR11®, BuchiSwitzerland, Suíça). A concentração final obtida foi de 12 mg/mL de Selol.

#### **4.1.3. Preparo da nanoemulsão de Alumínio-Cloro-Ftalocianina**

A nanoemulsão de Alumínio-Cloro-Ftalocianina (NE-AICIFt) foi desenvolvida e cedida pelo Dr. Luis Alexandre Muehlmann da Faculdade de Ceilândia, Universidade de Brasília. Ela foi formulada pelo método de emulsificação espontânea, que consiste na exposição da mistura constituída de um surfactante, óleo e o fotossensibilizante, à água nanopura, sob agitação, a 60 °C. Devido ao choque entre as moléculas decorrentes da agitação, são formadas as nanogotículas. Para esta nanoemulsão foi utilizado o Kolliphor como tensoativo e o óleo de rícino como solubilizante do cloreto de alumínio-ftalocianina (AlFtCl) na proporção de 3:1, respectivamente, cuja concentração final foi de 40 µM equivalente a 0,00023 mg/mL.

A NE-AICIFt óleo/água foi desenvolvida pelo método de emulsificação espontânea. Em resumo, a primeira fase composta de nove gramas de Cremophor ELP Kolliphor e três gramas de óleo de rícino e solução de AICIFt (100UM em 40 mL de etanol) e a segunda fase formada por solução salina. Posteriormente, as duas fases foram aquecidas a 70 °C sob agitação. Assim, evaporou-se o etanol. Após a homogeneização da solução da fase 1, misturou-se à fase 2, ainda sob agitação, até a formação de uma mistura homogênea de aspecto transparente e mantidos a 70 °C e sob agitação até a evaporação do etanol. A solução foi então resfriada à temperatura ambiente.

#### **4.1.4. Caracterização coloidal da nanoemulsão de Alumínio-Cloro-Ftalocianina e das nanocápsulas com Selol**

A caracterização coloidal da nanoemulsão de Alumínio-Cloro-Ftalocianina e das nanocápsulas com Selol envolveu a determinação do diâmetro hidrodinâmico (DH), do índice de polidispersão (IPD) das nanogotículas e das nanocápsulas por meio do espalhamento de luz dinâmica, além da determinação do potencial zeta (PZ), utilizando-se para todas essas determinações o Zetasizer(NanoZS90, Malvern EUA). As medidas dos tamanhos das nanogotículas e das nanocápsulas e a carga de superfície existente entre a superfície das partículas e o dispersante - potencial zeta – foram obtidas pela medida do movimento Browniano das partículas dispersas em água por espalhamento dinâmico de luz e pela movimentação das partículas quando aplicado um campo elétrico, respectivamente. Para isso, 50 µL das formulações foram misturadas a 950 µL de água destilada e as variáveis coloidais mensuradas no equipamento. Em acordo com resultados prévios do laboratório sob diferentes condições de armazenamento das amostras, as mesmas foram mantidas a 4 °C e as variáveis analisadas a cada mês ao longo de um ano.

#### **4.1.5. Caracterização morfológica da nanoemulsão de Alumínio-Cloro-Ftalocianina e das nanocápsulas com Selol.**

Para caracterizar morfológicamente a nanoemulsão de Alumínio-Cloro-Ftalocianina (NE-AICIFt) utilizou-se somente a microscopia eletrônica de transmissão e para caracterizar as nanocápsulas com Selol (NcSe) utilizou-se a microscopia eletrônica de transmissão e a de varredura.

#### *4.1.5.1 Microscopia Eletrônica de Transmissão*

Para a caracterização morfológica em microscopia eletrônica de transmissão, diluiu-se 50 µL das nanoformulações em 950 µL água, logo depois cinco microlitros da solução anterior foram colocadas sob uma tela de 300 mesh recoberta com formivar e, em seguida, contrastada com vapor de ósmio por 30 minutos. O material foi mantido sob proteção da luz e à temperatura ambiente em placas de Petri semiabertas por 24 h para que ocorresse a secagem das soluções. Após esse tempo foram realizadas as análises em microscópio eletrônico Jeol 1011C com voltagem de 80 kV. As imagens foram obtidas por meio de câmera e do software Gatan Digital Micrograph TM 3.11.

#### *4.1.5.2 Microscopia Eletrônica de Varredura*

Para a caracterização morfológica em microscopia eletrônica de varredura, diluiu-se 50 µL da nanoformulação em 950L de água; logo depois uma alíquota de 50 µL da suspensão da formulação NcSe foi depositada sobre suportes de metal (stubs). A amostra foi deixada para secar em dessecador contendo sílica por 24 horas, em seguida foi coberta com ouro em metalizador Blazers SCD 050® (Blazers Union AG, Liechtenstein). As imagens foram digitalizadas utilizando uma câmera Nav-Cam™ (FEI Company, EUA).

#### **4.1.6. Linhagens celulares**

A citotoxicidade da nanoformulação de Alumínio-Cloro-Ftalocianina e das nanocápsulas com Selol foi avaliada em uma linhagem cujas células foram isoladas de um adenocarcinoma de mama murino, (células 4T1 - ATCC® CRL-2539™) e em uma linhagem de fibroblastos não tumorais isolados de pele,

(células NIH/3T3 - ATCC® CRL-1658™). Essas linhagens foram adquiridas da American Type Culture Collection (ATCC) e estão sendo preservadas no Laboratório de Nanobiotecnologia do Departamento de Genética e Morfologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, UnB.

#### *4.1.6.1. Manutenção e propagação das células*

Alíquotas de células em concentração de  $2 \times 10^6$  células/mL foram retiradas do estoque de nitrogênio líquido. Quando descongeladas, as células foram transferidas para frascos de cultura de 25 cm<sup>2</sup> (TPP, CHE) contendo meio de cultura Dulbecco's modified Eagle's medium – DMEM (GIBCO, Auckland, NZ), suplementado com 10% de soro fetal bovino (GIBCO, USA) e 1% de antibiótico PenStrep, composto por penicilina, 100 U/mL, e estreptomicina, 100 µg/mL (GIBCO, USA), tamponado com bicarbonato de sódio (NaHCO<sub>3</sub>) (Sigma-Aldrich Co., USA), sendo o pH 7,4, ajustado pela adição de ácido clorídrico (HCL) e mantidas em incubadora, com temperatura de 37 °C, com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> e umidade de 80%.

Para o estabelecimento de subculturas, uma vez atingida 80% de confluência, as células foram desprendidas do fundo dos frascos de cultura por tratamento com solução de tripsina 0,125%/EDTA 0,02% (Gibco, USA), por três minutos a 37 °C. Em seguida, para inativar a enzima tripsina, foram acrescentados aos frascos de cultura contendo as células três mililitros de meio de cultura. Essa solução foi centrifugada (Excelsa baby/Fabricante Fanem, BRA) a 175 g, por três minutos. Após o descarte do sobrenadante, as células foram lavadas em um mililitro de meio de cultura, transferidas ( $10^4$  células)

para novos frascos de cultura e incubadas nas mesmas condições descritas anteriormente.

#### **4.1.7. Determinação das concentrações de Alumínio-Cloro-Ftalocianina e de Selol a serem utilizadas no tratamento combinado**

De modo a determinar as concentrações ideais de Alumínio-Cloro-Ftalocianina e de Selol a serem utilizadas no tratamento combinado realizou-se um teste de viabilidade celular por meio do ensaio de metabolização do brometo de 3 (4,5 dimetiltiazol-2il)-2,5-difenil-tetrazólio), ensaio do MTT, com base no trabalho de Mosmann (1983). Este ensaio é um método colorimétrico sensível e quantitativo que avalia a metabolização celular e assim, a viabilidade e a proliferação celular. Ele tem como base a capacidade que as enzimas desidrogenases, presentes nas mitocôndrias, têm em converter o brometo de 3 (4,5 dimetiltiazol-2il)-2,5-difenil-tetrazólio), MTT, em um composto conhecido como formazan. Como a produção de formazan pode ser correlacionada à presença dessas desidrogenases ativas, esse ensaio é frequentemente utilizado para avaliar a citotoxicidade induzida por diferentes estímulos [Matsuzaki WS, 2006].

Para esse ensaio, células das duas linhagens celulares foram cultivadas em microplacas de cultura de 96 poços, na concentração de  $5 \times 10^3$  células por poço, nas mesmas condições descritas no subitem 4.1.6.1. Após 24 horas, o meio de cultura foi descartado e substituído por 200 mL de meio de cultura contendo NcSe, cujas concentrações de Selol foram iguais a 50 µg/mL; 100 µg/mL; 150 µg/mL, 200 µg/mL ou 400 µg/mL ou contendo a NE-AICIFt, cujas concentrações de AICIFt foram iguais a 2,925 nM; 3,900 nM, 7,800 nM ou

15,6 nM. As células tratadas com NcSe foram incubadas por 24 h, 48h ou 72h. Já as tratadas com NE-AICIFt foram incubadas por 15 minutos, sendo o meio de cultura depois desse tempo substituído por 200 µL de PBS e as células então foram então irradiadas, ou não, com luz LED no comprimento de onda de 660 nm por oito minutos na fluência de 25,2 J/cm<sup>2</sup> e a 10 cm de distância da placa e novamente incubadas por mais 24 h; 48 h ou 72h nas mesmas condições descritas no subitem 4.1.6.1.

Depois do tempo determinado, as células foram lavadas com tampão fosfato salino (PBS), de modo a remover os fármacos; em seguida foi adicionada uma solução de MTT (5 mg/mL, Invitrogen, EUA) e meio de cultura na proporção de 1:10. As células foram então incubadas a 37 °C. Depois de três horas, a solução contendo o MTT foi removida e foram então adicionados 200 µL de DMSO (Dimetilsulfóxido, Sigma-Aldrich, EUA) para a solubilização dos cristais de formazan. A determinação da viabilidade celular foi realizada pela medida do espectro de absorbância, com comprimento de onda de 595 nm em espectrofotômetro SpectraMax M2 (Molecular Devices, USA) conjugado à leitora de microplacas. Este ensaio foi realizado em três experimentos independentes, cada um deles em triplicata.

#### **4.1.8. Determinação da toxicidade da Terapia Fotodinâmica em células previamente sensibilizadas com Selol.**

Para avaliar a eficácia da TFD em células previamente sensibilizadas com Selol, células das duas linhagens celulares foram expostas ao Selol na concentração de 200 e 400 µg/mL e incubadas nas mesmas condições descritas no subitem 4.1.6.1. Após 24 horas, as células foram lavadas com

PBS, tratadas com NE-AICIFt, cujas concentrações eram de 2,9 nM; 3,9 nM; 7,8 nM e 15,6 nM e incubadas por 15 minutos, quando então foram irradiadas, ou não, com luz LED no comprimento de onda de 660 nm por oito minutos na fluência de  $25,2 \text{ J/cm}^2$  e a 10 cm de distância da placa. Após essa etapa, as células foram novamente incubadas. Após 24 h as células foram submetidas ao ensaio do MTT, conforme descrito no subitem 4.1.7. Este ensaio foi realizado em três experimentos independentes, cada um deles em triplicata.

#### **4.1.9. Avaliação de alterações celulares induzidas pela Terapia Fotodinâmica em células previamente sensibilizadas com Selol.**

Este ensaio foi realizado para determinar alterações no potencial de membrana mitocondrial, na taxa fragmentação do DNA, na dinâmica do ciclo celular e na morfologia das células induzidas pela TFD mediada pelo NE-AICIFt em células sensibilizadas com Selol. Para tal, as células da linhagem 4T1 foram expostas ao Selol na concentração de 200 e 400  $\mu\text{g/mL}$  e incubadas nas mesmas condições descritas no subitem 4.1.6.1. Após 24 horas, as células foram lavadas com PBS, tratadas com NE-AICIFt, cuja concentração foi de 3,9 nM e incubadas por 15 minutos, quando então foram irradiadas, ou não, com luz LED no comprimento de onda de 660 nm por oito minutos na fluência de  $25,2 \text{ J/cm}^2$  e a 10 cm de distância da placa e novamente incubadas.

Vinte e quatro horas depois o sobrenadante foi coletado e armazenado, as células lavadas com 500  $\mu\text{L}$  de PBS gelado e então desprendidas do fundo do frasco por tratamento com 300  $\mu\text{L}$  de uma solução de tripsina, 0,125% EDTA 0,02% (Gibco, USA). Após a inativação da tripsina, as células foram preparadas para os diferentes ensaios Os ensaios foram realizados em três experimentos independentes, cada um deles em triplicata.

*4.1.9.1. Análise da alteração do potencial elétrico de membranas*

*mitocondriais e da morfologia celular*

A alteração do potencial elétrico de membranas mitocondriais foi avaliada pelo monitoramento da captação da sonda fluorescente Rodamina (Rh-123 Sigma-Aldrich), um fluorocromo catiônico que é atraído pelo elevado potencial elétrico negativo presente na membrana mitocondrial, incorporando-se no interior destas organelas. Alterações na integridade mitocondrial podem ser detectadas por meio do aumento da fluorescência verde citosólica que indica difusão da Rodamina 123 da mitocôndria para o citosol.

Uma vez inativada a tripsina, as células foram centrifugadas a 175 g por três minutos e então ressuspensas em 500 µL de uma solução Rodamina 123 e deixadas à temperatura ambiente, ao abrigo da luz, por 15 minutos. Depois desse tempo, esse preparado foi novamente centrifugado a 175 g, por três minutos. Depois disso, o sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 500 µL de PBS e levadas então ao citômetro de fluxo FACSVerse BD (Bioscience) para avaliação da fluorescência.

*4.1.9.2. Análise da fragmentação do DNA e da dinâmica do ciclo celular*

Após a inativação da tripsina, as células foram centrifugadas a 175 g por três minutos e então ressuspensas em 200 µL de uma solução tamponada de lise (0,1% citrato de sódio, 0,1% Triton X-100, 20 µg/mL) iodeto de propídio, 50 µg/mL RNase A, pH 7,4), a 37 °C e em ambiente ausente de luminosidade. Uma vez expostas ao tampão de lise, as células têm as suas membranas rompidas e o núcleo exposto, o que facilita a ligação do iodeto de propídeo ao DNA e conseqüentemente a detecção e a quantificação desta estrutura em

cada célula, pois as moléculas de DNA íntegras emitem maior fluorescência do que as moléculas de DNA fragmentado.

Depois de trinta minutos, as células foram então levadas ao citômetro de fluxo FACSVerse BD (Bioscience) para a leitura no comprimento de onda de 560 a 580nm (canal FL-2) de modo a quantificar a taxa de fragmentação do DNA e avaliar a dinâmica do ciclo celular. Este ensaio foi realizado em três experimentos independentes, cada um deles em triplicata.

## **4.2. Ensaio *in vivo***

### **4.2.1. Modelo Animal**

Os animais utilizados neste estudo foram camundongos fêmeas da linhagem BALB/c, com idade entre 12 e 14 semanas (animais jovens) ou entre 48 e 52 semanas (animais idosos) constituído de 60animais no total; adquiridos do biotério da Universidade de Católica Brasília – UCB.

Todos os animais foram mantidos no alojamento de animais do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília – UnB. A acomodação deles ocorreu em fotoperíodo de igual duração do dia e da noite, com temperatura controlada, 23 °C, filtragem de ar nas caixas e livre acesso à água e à ração, conforme guia de cuidados e utilização de animais de laboratório. Os experimentos realizados neste estudo foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, UnB Doc nº UnBDoC nº 671/2017.

#### **4.2.2. Delineamento experimental e grupos experimentais**

Após climatização os animais de cada grupo etário foram separados em seis grupos, cada um deles com cinco animais (n=5). Assim os grupos foram constituídos como descrito na Tabela I.

Grupo G1 - animais idosos sem tumor; grupo o G2 - animais idosos com tumor sem tratamento; grupo G3 - animais idosos com tumor tratado com Selol; grupo G4 - animais idosos com tumor tratado com Selol e NE-AICIFt; grupo G5 - animais idosos com tumor submetido à TFD (NE-AICIFt e irradiação); grupo G6 - animais idosos com tumor tratado com Selol e depois submetido à TFD (NE-AICIFt e irradiação); G7 - animais jovens sem tumor; G8 - animais jovens com tumor sem tratamento; G9 - animais jovens com tumor tratado com Selol; G10 - animais jovens com tumor tratado com Selol e NE-AICIFt; G11 - animais jovens com tumor submetido à TFD (NE-AICIFt e irradiação); G12 - animais jovens com tumor tratado com Selol e depois submetido à TFD (NE-AICIFt e irradiação).

Os tumores foram transplantados com células da linhagem 4T1 na quinta mama dos camundongos, conforme protocolo do grupo, pois conforme tese do Dr. César Romero, tumores transplantados para quinta mama apresentam menor incidência de metástases. Para tal, esses animais receberam injeção intraperitoneal de 120 µL de uma solução de ketamina (15mg/Kg) e xilasina (5mg/Kg). Uma vez anestesiados, eles receberam injeção intramamária de 50 µL de meio de cultura, sem suplementação, contendo  $10^5$  células da linhagem 4T1.

Após dez dias, animais dos grupos G3, G4, G6, G9, G10, e G12 receberam, via intratumoral, 20 µL da solução de Selol na concentração de 12 mg/mL (ver Tabela I) e depois de 24 horas os animais dos G4, G5, G6, G10,

G11 e G12 receberam, via intratumoral 20 µL de NE-AICIFt na concentração de 40 µM. Logo após a administração da NE-AICIFt os animais dos grupos G5, G6, G11 e G12 tiveram os tumores irradiados com luz LED na fluência de 75 J/cm<sup>2</sup> durante sete minutos. Após dois minutos de intervalo, a irradiação foi repetida por mais oito minutos. Essas sessões de TFD foram realizadas mais seis vezes com intervalo de 24h entre cada uma delas. Em cada sessão, o tempo de irradiação foi fracionado com intervalo de dois minutos a fim de melhorar a oxigenação do tecido.

**Tabela I.** Grupos experimentais utilizados para avaliar a eficácia da Terapia Fotodinâmica na erradicação de tumores em camundongos Balb/C previamente sensibilizados com Selol.

Grupo Experimental (n=5)	Tumor	Tratamento		
		NcSe*	NE-AICIFt**	LED***
Animais idosos				
G1	-	-	-	-
G2	+	-	-	-
G3	+	+	-	-
G4	+	+	+	-
G5	+		+	+
G6	+	+	+	+
Animais jovens				
G7	-	-	-	-
G8	+	-	-	-
G9	+	+	-	-
G10	+	+	+	-
G11	+	-	+	+
G12	+	+	+	+

\*NcSe: nanocápsulas de Selol; \*\*NE-AIFtCl: nanoemulsão de Alumínio-Cloro-Ftalocianina;\*\*\*LED, irradiação com luz LED em comprimento de onda igual a 660nm e energia total aproximadamente de 75 J/cm<sup>2</sup>, irradiação fracionada em 2x.

A cada sessão de tratamento, os animais eram pesados, e tinham os tumores mensurados. Além disso, a cada semana mensurava-se a enzima Mieloperoxidase.

#### **4.2.3. Quantificação da enzima Mieloperoxidase**

A enzima Mieloperoxidase foi quantificada por meio de luminescência. Este ensaio foi realizado para avaliar se os diferentes tratamentos induziriam inflamação nos animais. O nível de inflamação de cada animal foi mensurado por meio da reação de luminescência do reagente Luminol com a enzima Mieloperoxidase produzida por neutrófilos. Assim, foi injetado no peritônio dos animais o Luminol a 30 mg/mL na dose de 300 mg/Kg e os mesmos foram depois levados ao aparelho IVIS® LUMINA XR Series III para quantificação da Mieloperoxidase. O tempo de imageamento dos animais foi de 16 minutos, pois a cinética desse reagente segundo Alshetaiwi HS e colaboradores, 2013 , varia entre 5-15 minutos. Durante o imageamento, os animais estavam anestesiados por Isoflurano (1,5–2 %). Dessa forma, após ocorrer a reação de luminescência, a região de interesse (ROI) foi delineada nas imagens e quantificada pela radiância média [p/s/cm<sup>2</sup>/sr]. A quantificação dessa enzima foi realizada semanalmente, sendo a primeira dosagem realizada sete dias após a inoculação das células tumorais, ou seja, antes dos tratamentos.

#### **4.2.4. Coleta de sangue, dos tumores e de órgãos dos animais dos diferentes grupos experimentais.**

Sete dias após a última sessão de TFD, os animais foram anestesiados conforme descrito no subitem 4.2.1.2. Depois disso, tiveram o sangue coletado,

por punção cardíaca e seguiu-se a preparação para ensaios bioquímicos e hematológicos. O fígado, os rins, o baço, os pulmões e tumores e os linfonodos também foram coletados e preparados para a análise histopatológica. Estes ensaios foram realizados para avaliar a eficácia do tratamento como também determinar se eles induzem toxicidade sistêmica nos animais.

#### *4.2.4.1 Ensaio Bioquímico*

Este ensaio permitiu medir os títulos séricos das enzimas Fosfatase alcalina (FAL), a Alanina aminotransferase (ALT) e a Aspartato aminotransferase (AST), além dos níveis de Creatinina e Ureia. Para tanto, do sangue coletado de cada animal foi separado o plasma, por centrifugação a 5.000 rpm por cinco minutos. As análises foram executadas no analisador químico automatizado ADVIA 2400 (Siemens), utilizando-se os reagentes químicos adequados Advia e os protocolos estipulados pelo fabricante. As dosagens de FA, ALT e AST foram realizadas por métodos cinéticos otimizados e as de Creatinina e Ureia por métodos colorimétricos.

#### *4.2.4.2 Ensaio Hematológico*

Para o ensaio hematológico, uma alíquota do sangue coletado foi colocada em tubos com anticoagulante. As análises foram executadas no hematómetro (LabTest, Brasil), Nesse equipamento, mensurou-se: o número total de glóbulos brancos (WBC); a contagem diferencial de leucócitos; o número de glóbulos vermelhos (RBC); a quantidade de hemoglobina (HGB); a distribuição da largura das células vermelhas (RDWC) e o número de plaquetas.

#### *4.2.4.3 Avaliação histopatológica*

A análise histopatológica foi realizada em diversos órgãos dos animais de modo a determinar se os tratamentos foram tóxicos. Já a análise dos tumores permitiu determinar a eficácia da TFD na remoção das células tumorais sensibilizadas com Selol. Para tal os órgãos e os tumores foram fixados com paraformaldeído 4% tamponado, durante quatro horas, à temperatura ambiente, para serem submetidos à técnica de rotina para inclusão em histosec®. Esses fragmentos foram desidratados por meio de imersão sequencial em soluções alcoólicas, com percentual crescente de álcool, ou seja, 70%, 80%, 99,8%. Em seguida os fragmentos dos órgãos foram imersos em uma solução de álcool e xilol (1:1) durante 45 minutos, depois submetidos a três banhos de uma hora de xilol 100% e então embebidos em parafina.

Uma vez embebidos em parafina, os fragmentos dos órgãos foram seccionados em cortes histológicos semi-seriados de três µm de espessura, utilizando-se um micrótomo Leica RM2145. Os cortes foram então montados em lâminas de microscopia e mantidos em estufa a 37 °C durante um período de 12 horas para melhor aderência dos cortes. Em seguida, os cortes foram hidratados à temperatura ambiente trocando-se a resina paraplástica por xileno, e depois o xileno por concentrações decrescentes de álcool (99,8%, 80%, 70%). Uma vez hidratadas, as secções histológicas foram coradas com hematoxilina e eosina (H&E).

O padrão histológico dos tecidos foi analisado em microscópio de luz Zeiss Axioskop (100x, 200x e 400x). Micrografias ilustrativas foram obtidas pela

captura das imagens utilizando o programa AxioVison40v 4.6.1.0 Copyring© 2002-2004.

### **4.3. Análise estatística**

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e nos casos em que foram detectadas diferenças entre os grupos experimentais foi aplicado o pós-teste de Tukey ou Bonferroni ao nível de significância  $p < 0,05$ , utilizando-se o software GraphPadPrism® 5.

## **5. RESULTADOS**

No presente estudo, a fim de avaliar se a sensibilização com Selol potencializava os efeitos da Terapia Fotodinâmica na erradicação de tumores de mama, foram realizados diferentes ensaios cujos resultados estão descritos a seguir.

## 5.1. Estudo *in vitro*

### 5.1.1 Características coloidais e morfológicas das nanocápsulas de Selol e da nanoemulsão de Alumínio Cloro Ftalocianina

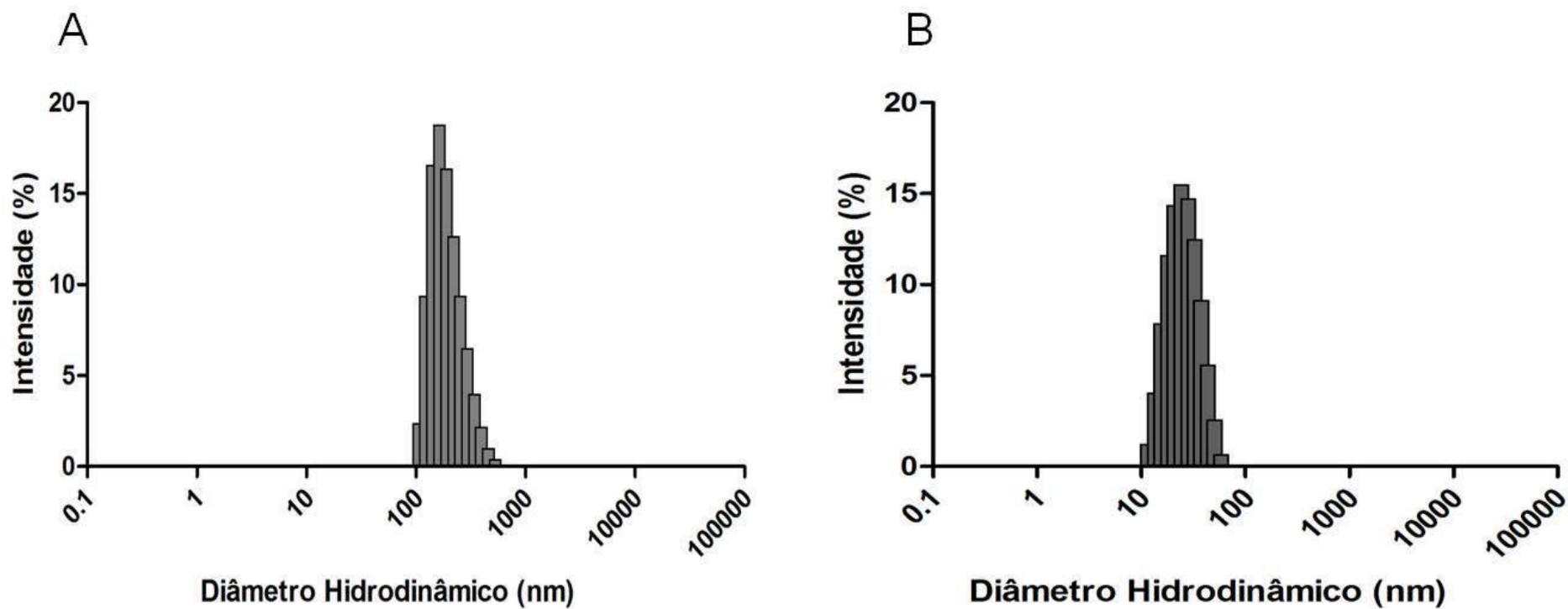
Uma abordagem inicialmente planejada consistiu em caracterizar propriedades coloidais, ou seja, determinar o diâmetro hidrodinâmico (DH), o índice de polidispersão (IPD) e o potencial zeta (PZ) das NcSe e da NE-AIFtCl. Os resultados estão expressos na Tabela II e na Figura 5.

Nessa tabela observa-se que a NcSe apresentou  $DH = 257 \pm 1$  nm,  $IPD = 0,1$  e  $PZ = -60$  mV, enquanto que a NE-AICIFt mostrou  $DH = 23,5 \pm 1$  nm,  $IPD = 0,04$  e  $PZ = -30$  mV.

**Tabela II.** Caracterização coloidal das nanocápsulas com Selol e da nanoemulsão com Alumínio-Cloro-Ftalocianina

	Diâmetro Hidrodinâmico (nm)	Índice de Polidispersidade	Potencial Zeta (mV)
NcSe	$257 \pm 1,0$	0,1	-60
NE-AICIFt	$23.50 \pm 1,0$	0.04	-30

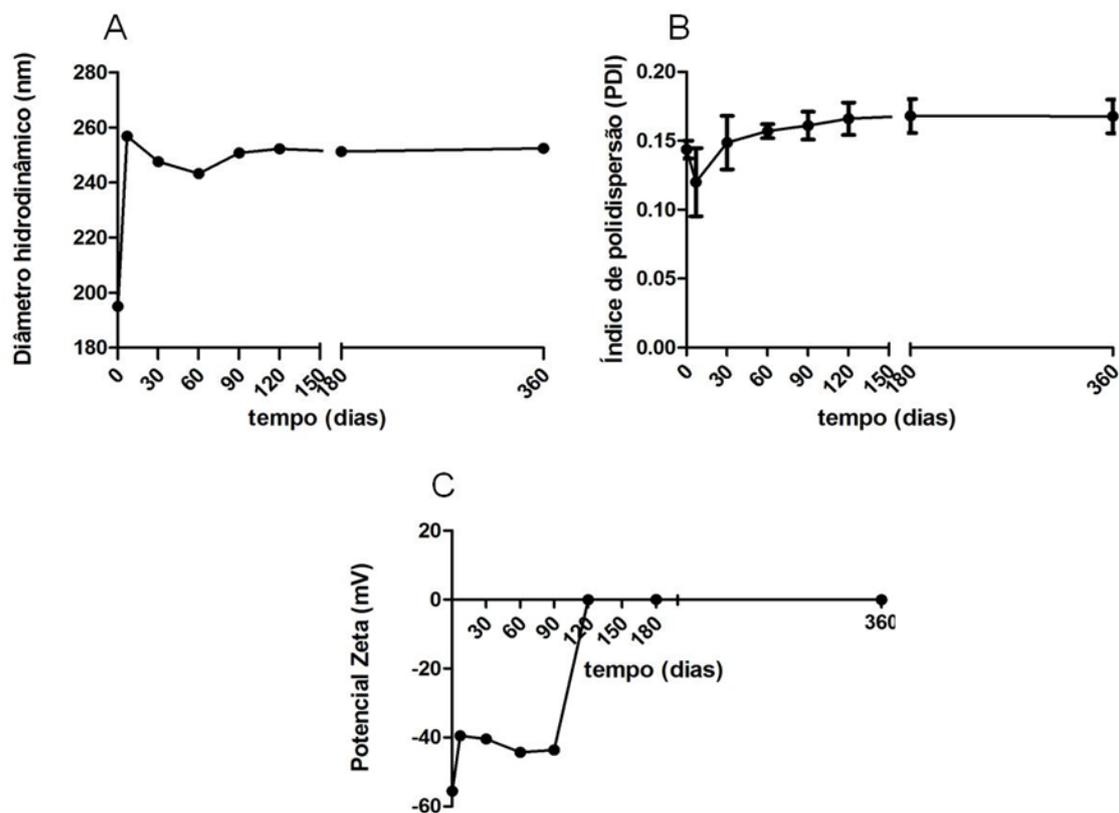
NcSe: nanocápsulas de Selol; NE-AICIFt: nanoemulsão de Alumínio-Cloro Ftalocianina.  $D_H \pm DP$



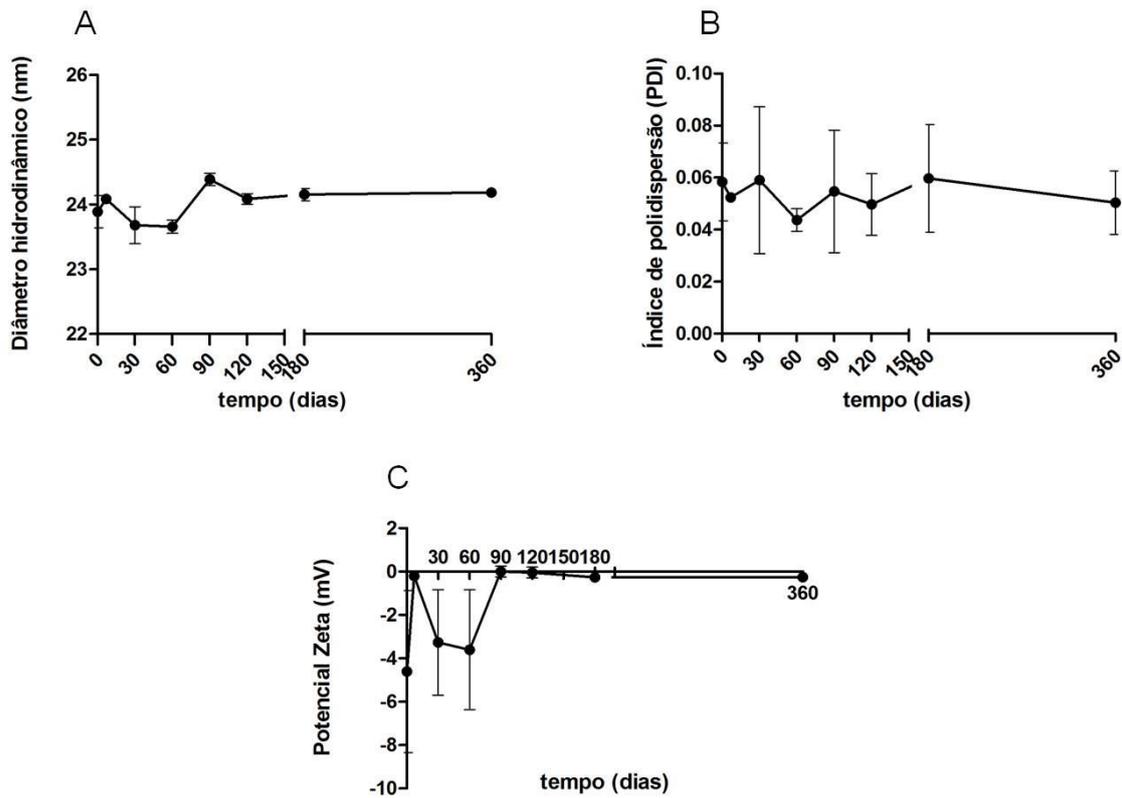
**Figura 5.** Distribuição do diâmetro hidrodinâmico das nanocápsulas de Selol (NcSe) e da nanoemulsão de Alumínio-Cloro- Ftalocianina (NE-AICIFt). A: NcSe; B: NE-AICIFt. Colunas representam a média  $\pm$  desvio padrão de três medidas de cada amostra.

As propriedades coloidais foram avaliadas por um período de 360 dias, de modo a determinar a estabilidade das NcSe e da NE-AICIFt, os resultados estão descritos a seguir e expressos nas figuras 6 e 7.

Tanto a NcSe (Figura 6) quanto a NE-AICIFt (Figura 7) não mostraram alterações significativas no diâmetro hidrodinâmico e no índice de polidispersão, mas o potencial zeta, tanto das NcSe quanto da NE-AICIFt sofreu alteração após alguns dias após a síntese.



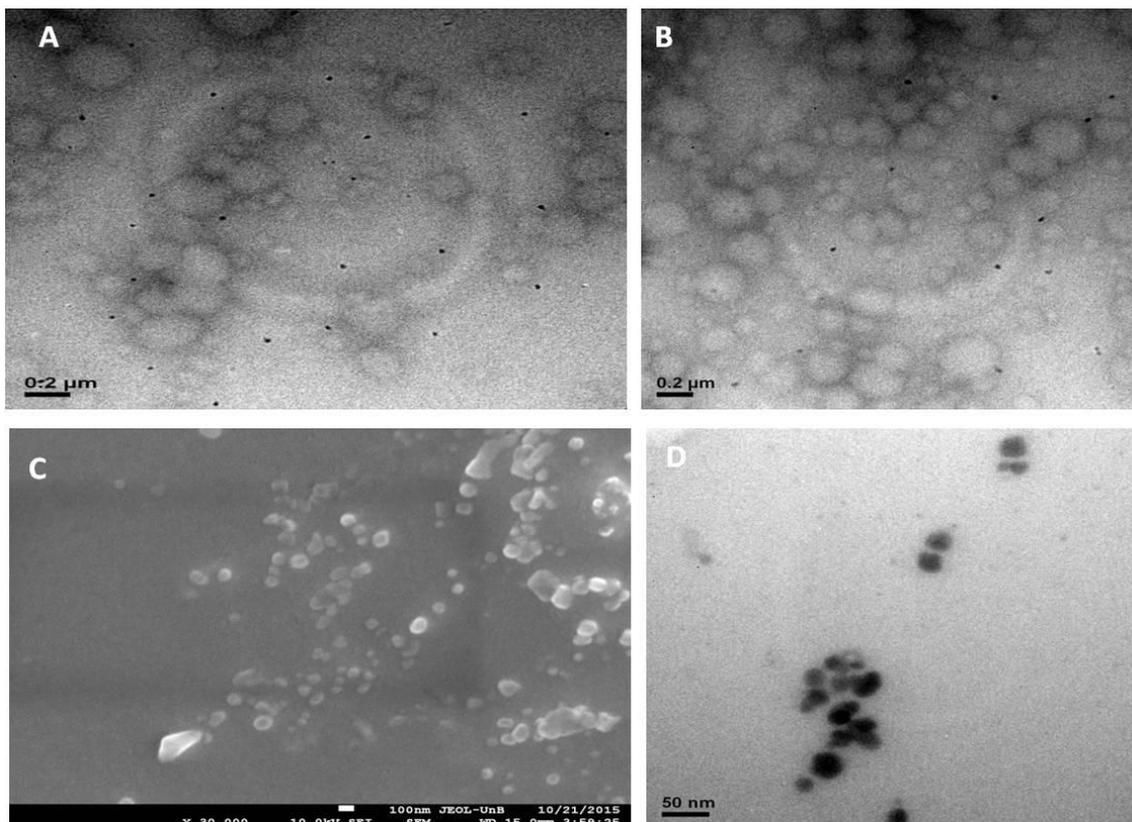
**Figura 6.** Características coloidais das nanocápsulas com Selol (NcSe) ao longo de 360 dias. A: diâmetro hidrodinâmico (DH); B: índice de polidispersão (IPD); C: potencial zeta (PZ). Alíquotas armazenadas a 7 °C. Média  $\pm$  DP



**Figura 7.** Características coloidais da nanoemulsão de Alumínio Cloro Ftalocianina (NE-AICIFt) ao longo de 360 dias. A: diâmetro hidrodinâmico (DH); B: índice de polidispersão (IPD); C: potencial zeta (PZ). Alíquotas armazenadas a 7 °C. Média  $\pm$  DP.

Além das características coloidais determinou-se também a morfologia da NcSe e da NE-AICIFt. Para caracterizar morfologicamente a NcSe utilizou-se a microscopia eletrônica de transmissão e a de varredura, mas para caracterizar a NE-AICIFt utilizou-se somente a microscopia eletrônica de transmissão.

Conforme pode ser observado na Figura 8, as duas formulações apresentaram monodispersividade e morfologia esférica.



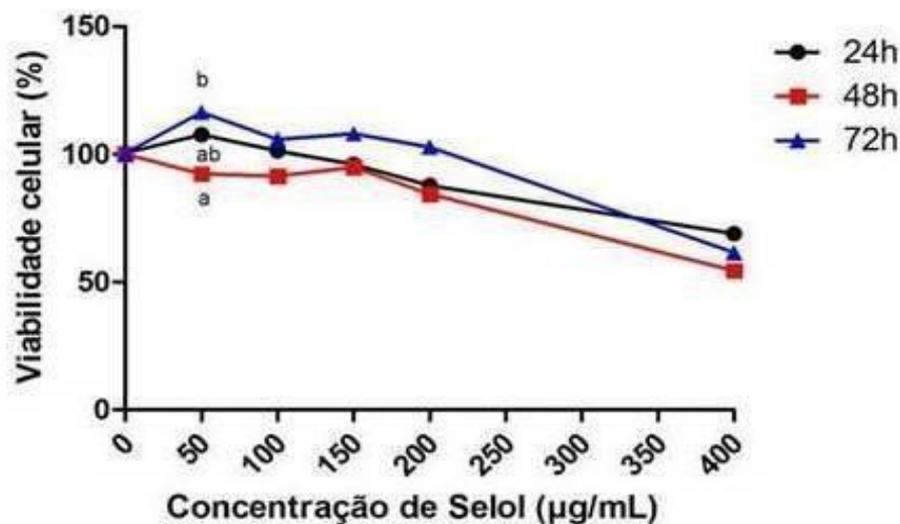
**Figura 8.** Morfologia das nanocápsulas com Selol (NcSe) e da nanoemulsão com Alumínio-Cloro-Ftalocianina (NE-AICIFt). A e B: Análise da morfologia das NcSe por meio de microscopia de transmissão; C: Análise da morfologia das NcSe por meio de microscopia eletrônica de varredura; D: Análise da morfologia da NE-AICIFt por meio de microscopia de transmissão. Aumento de 50 k da NcSe e de 250 k da NE-AICIFt.

### 5.1.2. Citotoxicidade das nanocápsulas de Selol e da nanoemulsão de Alumínio Cloro Ftalocianina em linhagens celulares

Uma vez determinadas as características coloidais e morfológicas das NcSe e da NE-AIFtCl realizaram-se estudos *in vitro* para avaliar a eficácia da Terapia Fotodinâmica mediada pela NE-AIFtCl em células sensibilizadas pelo Selol. Porém, foi necessário determinar antes as concentrações de Selol e de AICIFt a serem utilizadas. Para tal, células das linhagens 4T1 e NIH/3T3 foram expostas a NcSe e a NE-AIFtCl em diferentes concentrações de Selol e de AICIFt por 24 h, 48 h e 72 h, e depois submetidas ao ensaio de metabolização de brometo de 3 (4,5 dimetiltiazol-2il)-2,5-difenil-tetrazólio), MTT. Os resultados estão expressos nas Figuras 9, 10, 11 e 12.

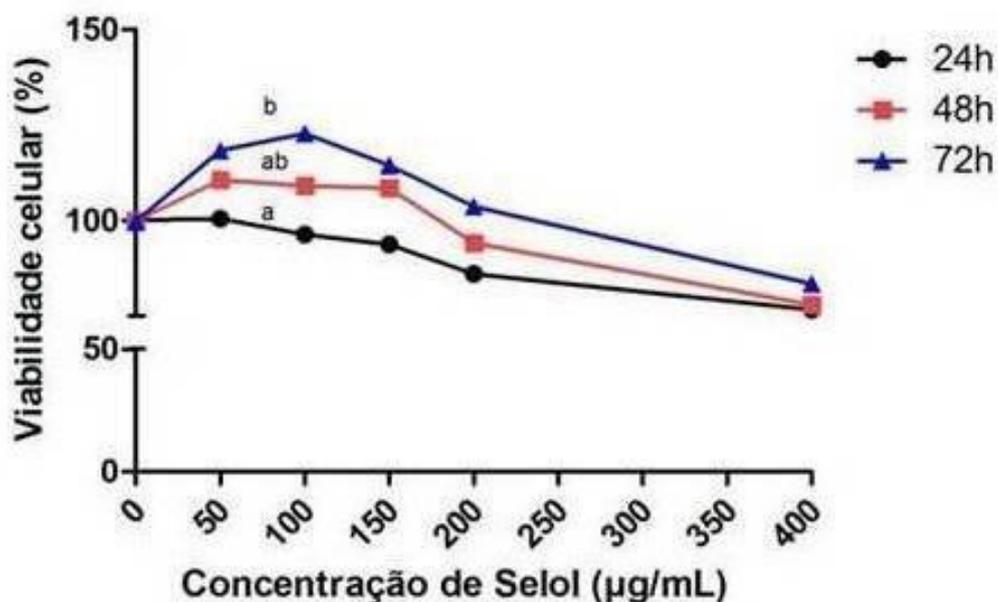
## 5.1.2.1 Citotoxicidade das nanocápsulas de Selol

Na Figura 9, observa-se que o Selol afetou as células da linhagem 4T1. Nessa população, depois de 48 h a porcentagem de células tratadas com Selol na concentração de 50  $\mu\text{g/mL}$  reduziu ligeiramente, mas depois (72 h) a população celular aumentou significativamente. Em concentrações acima de 200  $\mu\text{g/mL}$ , independentemente do tempo, a população celular reduz. Sendo que na concentração de 400  $\mu\text{g/mL}$  a redução foi em torno de 30%.



**Figura 9.** Viabilidade da linhagem 4T1 determinada por meio do ensaio de MTT, após tratamento com nanocápsulas com Selol, por 24, 48 e 72h. Os dados representam as médias obtidas de três experimentos diferentes, cada um deles realizado em triplicata. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) com pós-teste de Bonferroni,  $p < 0,05$ . Letras diferentes indicam diferença significativa entre os tempos analisados em cada concentração analisada.

Nas células da linhagem NIH/3T3 (Figura 10), após 72 horas o Selol na concentração de 100  $\mu\text{g/mL}$  aumentou a viabilidade celular em comparação as primeiras 24 horas. Em concentrações acima de 200  $\mu\text{g/mL}$  a população celular começou a reduzir, sendo que na concentração de 400  $\mu\text{g/mL}$ , independentemente do tempo, a redução foi em torno de 20%.

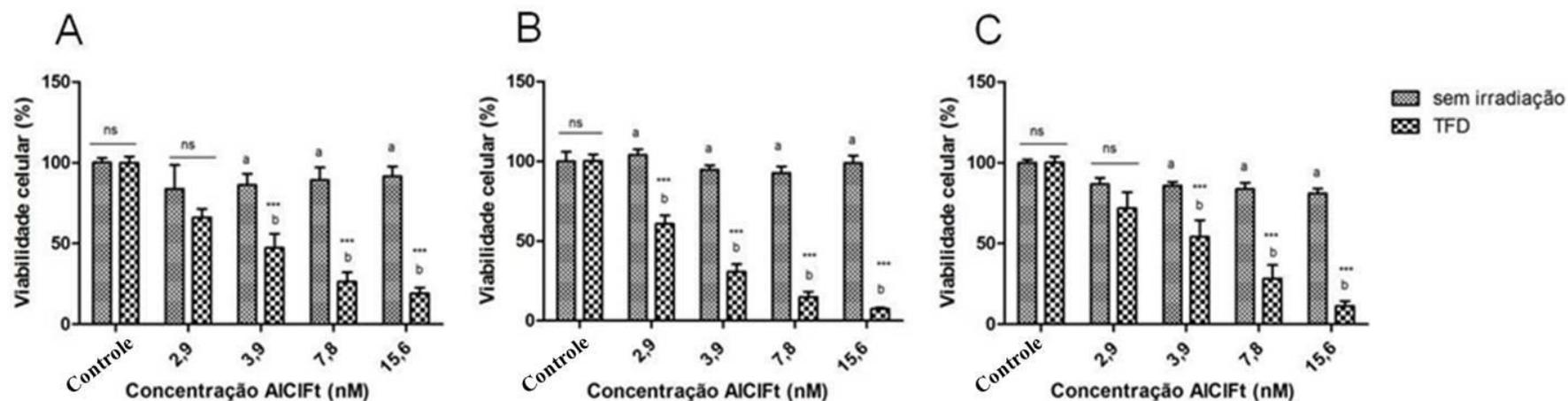


**Figura 10.** Viabilidade da linhagem NIH/3T3 determinada por meio do ensaio de MTT após tratamento com Selol por 24, 48 e 72h. Os dados representam as médias obtidas de três experimentos diferentes, cada um deles realizado em triplicata. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) com pós-teste de Bonferroni,  $p < 0,05$ . Letras diferentes indicam diferença significativa entre os tempos analisados em cada concentração estudada.

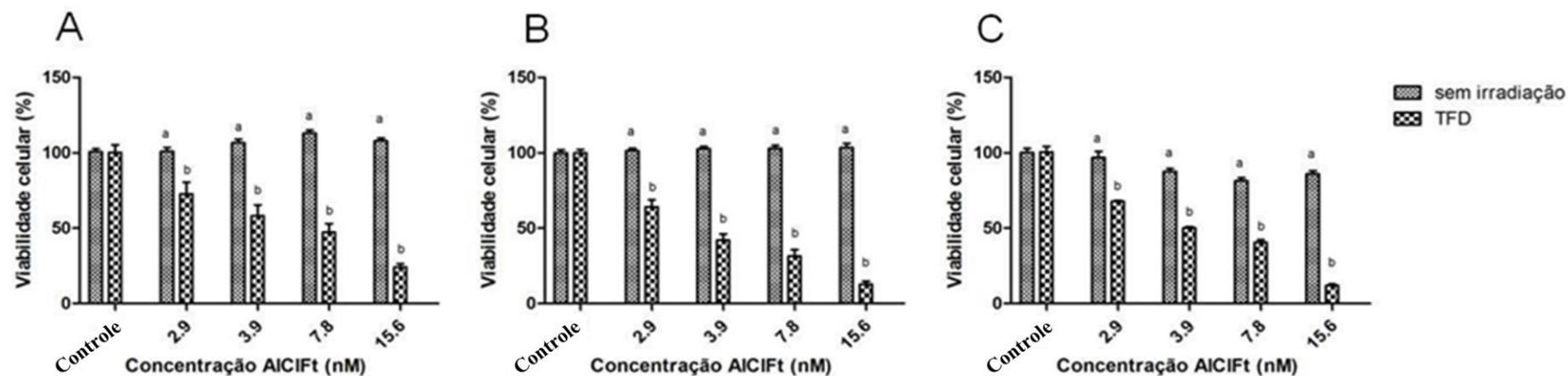
#### 5.1.1.3. Citotoxicidade da nanoemulsão de Alumínio-Cloro-

##### *Ftalocianina*

Diferentemente do Selol, a NE-AICIFt (figuras 11 e 12) mostrou-se inócua para as duas linhagens quando não irradiada, em qualquer uma das concentrações utilizadas. Mas, quando irradiada, a NE-AICIFt reduziu a viabilidade das duas linhagens nas concentrações de 3,9; 7,8 e 15,6 nM, independentemente do tempo, sendo mais efetiva nas células tumorais.



**Figura 11.** Viabilidade da linhagem 4T1 determinada por meio do ensaio de MTT após incubação com NE-AICIFt, por 15 minutos, na ausência de irradiação ou após irradiação com luz LED na fluência de  $25,2 \text{ J/cm}^2$  por oito minutos. Células avaliadas 24 h (A), 48 h (B) e 72 h (C) após irradiação. Os dados representam as médias de três experimentos independentes, cada um deles realizado em triplicata. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) com pós-teste de Bonferroni,  $p < 0,05$ . Letras diferentes indicam diferença significativa entre os tempos analisados em cada concentração estudada. Média  $\pm$  DP.



**Figura 12.** Viabilidade da linhagem NIH/3T3 determinada por meio do ensaio de MTT após incubação com NE-AICIFt, por 15 minutos, na ausência de irradiação ou após irradiação com luz LED na fluência de  $25,2\text{J}/\text{cm}^2$  por oito minutos. Células avaliadas 24 h (A), 48 h (B) e 72 h (C) após irradiação. Os dados representam as médias de três experimentos independentes, cada um deles realizado em triplicata. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e ao pós-teste de Bonferroni,  $p < 0,05$ . Letras diferentes indicam diferença significativa entre os tempos analisados em cada concentração estudada. Média  $\pm$  DP.

### **5.1.3. Eficácia da Terapia Fotodinâmica mediada por nanoemulsão de Alumínio-Cloro-Ftalocianina em células sensibilizadas com Selol**

Com base nos resultados obtidos na etapa anterior, decidiu-se sensibilizar células das duas linhagens com Selol nas concentrações de 200 µg/mL e 400 µg/mL e depois de 24 horas submetê-las à TFD utilizando a nanoemulsão contendo diferentes concentrações de AICIFt. Os resultados estão expressos nas figuras 13 e 14.

Nessas figuras observa-se que nas duas linhagens a sensibilização previa das células com Selol (200 µg/mL e 400 µg/mL) potencializou a TFD somente quando a AICIFt foi utilizada nas menores concentrações (2,9 nM e 3.9 nM). Quando se utilizou a AICIFt nas maiores concentrações (7,8 nM e 15.6 nM) a porcentagem de células vivas no grupo submetido à TFD foi similar a do grupo sensibilizado com Selol e depois submetidas à TFD.

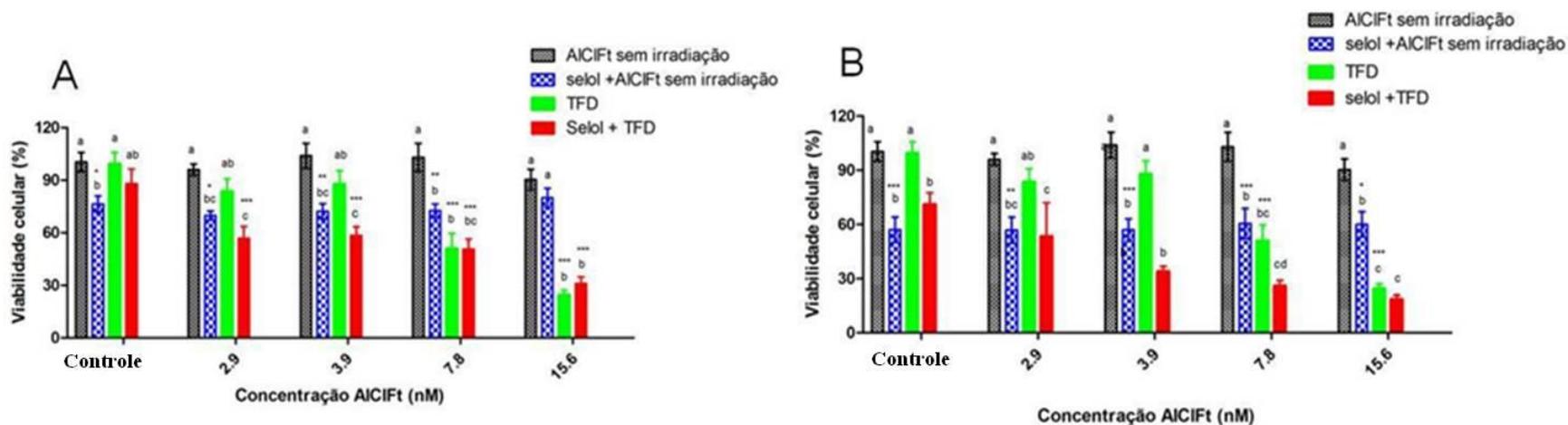
Na linhagem celular 4T1 (Figura 13A) em células sensibilizadas com Selol 200 µg/mL a TFD reduziu a viabilidade celular em 43,2% (2,9 nM) e em 41,51% (3.9 nM). Já em células não sensibilizadas a redução foi de somente 16, 44% e 12,22% quando a concentração de AICIFt foi igual a 2,9 nM e 3,9 nM, respectivamente. Em células sensibilizadas com Selol 200 µg/mL a TFD reduziu a viabilidade celular em 49,45% (7,8 nM) e em 69,04% (15.6 nM) nas células não sensibilizadas a redução foi similar.

Em células da linhagem celular 4T1 que foram sensibilizadas com Selol 400 µg/mL, a TFD com a AICIFt na concentração de 2,9 nM reduziu a viabilidade em 43,4%, enquanto que em células não sensibilizadas a redução foi somente de 17,2% (Figura 13B). Quando a TFD foi aplicada utilizando-se a AICIFt na concentração de 3,9 nM, a redução foi de 66,01% em células

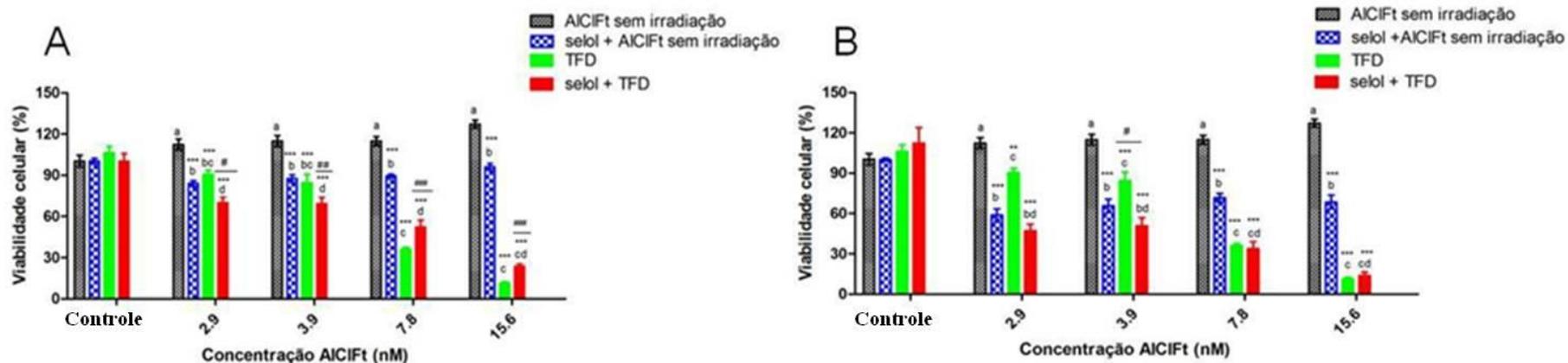
sensibilizadas e 12,21% em células não sensibilizadas (Figura 13B). Ainda na Figura 13B, observa-se que as células sensibilizadas com Selol 400 µg/mL e depois tratadas com AICIFt nas concentrações de 7,8 nM ou 15,6 nM irradiada (grupo Selol + TFD) ou não (grupo Selol + AICIFt sem irradiação) mostraram redução similar da viabilidade celular (50,9 e 25,9% e 24,4 e 18,4 % , mas significativamente diferente da apresentada pelo grupo controle (AICIFt sem irradiação) (100 e 90,3% valores).

Na Figura 14 observa-se que nas células da linhagem NIH3T3 sensibilizadas com Selol 200 µg/mL, quando se efetuou a TFD utilizando a AICIFt na concentração de 2,9 nM, a redução da taxa de viabilidade celular foi de 30,0% e nas não sensibilizadas foi de 10,0% (Figura 14A). Quando na TFD foi utilizada a AICIFt na concentração de 3,9 nM a redução foi de 31,00% nas células sensibilizadas e de 15,44% nas células não sensibilizadas (Figura 14A).

Na Figura 14B observa-se em células sensibilizadas com Selol 400 µg/mL a TFD aplicada com a AICIFt na concentração de 2,9 nM reduziu a viabilidade em 53,00%, enquanto que em células não sensibilizadas a redução foi somente de 7,60%. Já com AICIFt na concentração de 3,9 nM, a TFD reduziu 49,24% da viabilidade nas células sensibilizadas e 15,40% nas não sensibilizadas. Ainda na Figura 14B observa-se que células sensibilizadas ou não com Selol 400 µg/mL e depois submetidas à TFD mostraram redução similar da viabilidade celular, mas significativamente diferente da apresentada pelo grupo controle (AICIFt sem irradiação).



**Figura 13.** Citotoxicidade induzida pela Terapia Fotodinâmica em células da linhagem 4T1 sensibilizadas com Selol e avaliada por meio do ensaio de MTT. Células sensibilizadas com selol na concentração de (A) 200 µg/mL e (B) 400 µg/mL e depois submetidas à NE-AICIFt na concentração de 3,9 nM e então irradiadas com luz LED na fluência de 25,2J/cm<sup>2</sup>. Os dados representam as médias de três experimentos independentes, cada um deles realizado em triplicata. As médias foram submetidas à análise de variância (ANOVA) e ao pós-teste de Bonferroni,  $p < 0,05$ . Letras diferentes indicam diferença significativa entre cada concentração estudada. \*\*\* indica  $p < 0,001$ . Média  $\pm$  DP.



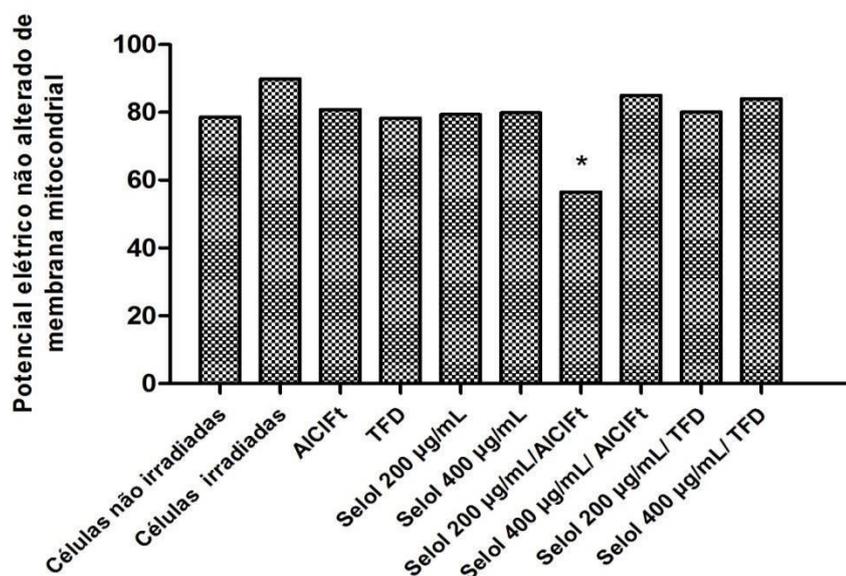
**Figura 14.** Citotoxicidade induzida pela Terapia Fotodinâmica em células da linhagem NIH/3T3 sensibilizadas com Selol e avaliada por meio do ensaio de MTT. Células sensibilizadas com Selol na concentração de (A) 200 µg/mL e (B) 400 µg/mL e depois submetidas à NE-AICIFt na concentração de 3,9 nM e irradiadas com luz LED na fluência de 25,2J/cm<sup>2</sup>. Os dados representam as médias de três experimentos independentes, cada um deles realizado em triplicata. As médias foram submetidas à análise de variância (ANOVA) e ao pós-teste de Bonferroni, p<0,05. Letras diferentes indicam diferença significativa entre cada concentração estudada. \*\*\* indica p<0,001. Média ± DP.

#### 5.1.4. Alterações celulares induzidas pela Terapia Fotodinâmica em células previamente sensibilizadas com Selol.

Este ensaio permitiu determinar o potencial de membranas mitocondriais, a taxa de fragmentação do DNA, a dinâmica do ciclo celular e a morfologia das células da linhagem 4T1 sensibilizadas com Selol e submetidas à TFD mediada pela NE-AICIFt na concentração de 3,9 nM.

##### 5.1.4.1. Análise da alteração do potencial elétrico de membranas mitocondriais

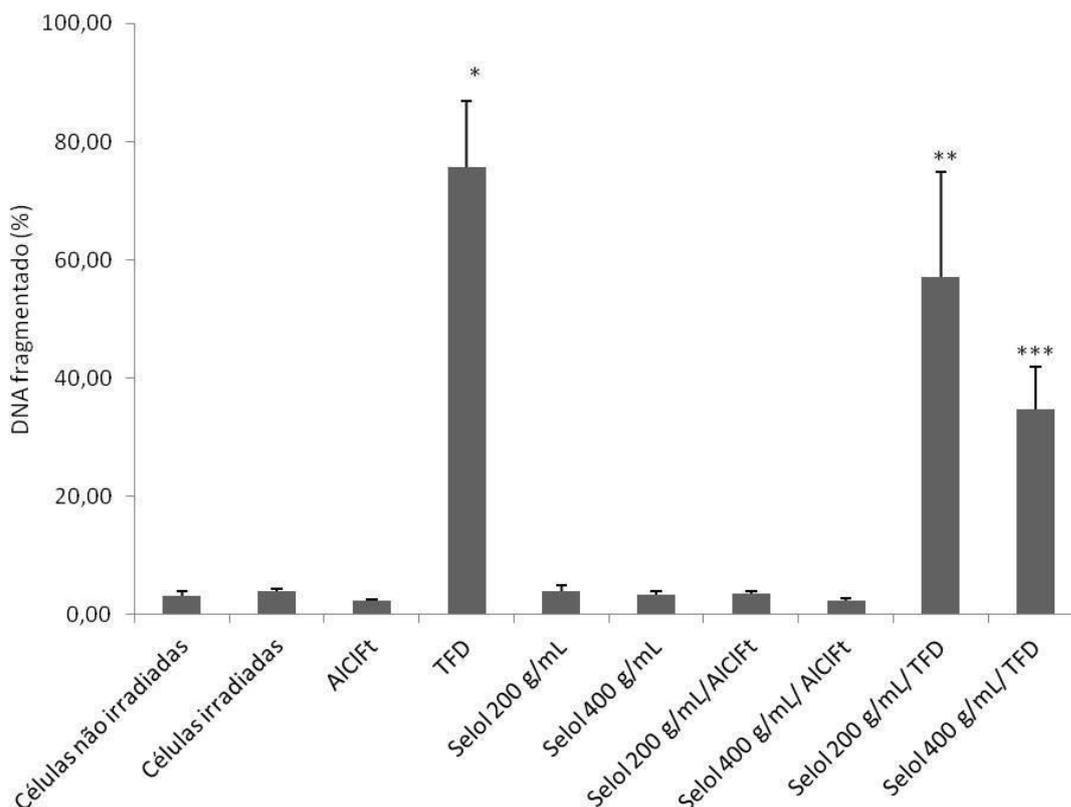
Somente as células 4T1 sensibilizadas com Selol na concentração de 200 µg/mL e depois expostas à AICIFt (Selol 200 µg/mL+ AICIFt) apresentaram alteração no potencial das membranas mitocondriais, Figura 15. Dessas, 40% apresentaram despolarização das membranas mitocondriais.



**Figura 15.** Análise por citometria de fluxo do potencial de membrana mitocondrial em células 4T1 sensibilizadas com Selol na concentração de 200 e 400 µg/mL e depois submetidas à NE-AICIFt na concentração de 3,9 nM e irradiadas ou não com luz LED na fluência de 25,2J/cm<sup>2</sup>. Os dados representam as médias de três experimentos independentes, cada um deles realizado em triplicata. As médias foram submetidas à análise de variância ANOVA com pós-teste de Bonferroni, p<0,05. (\*) indica diferença estatística em relação a todos os grupos.

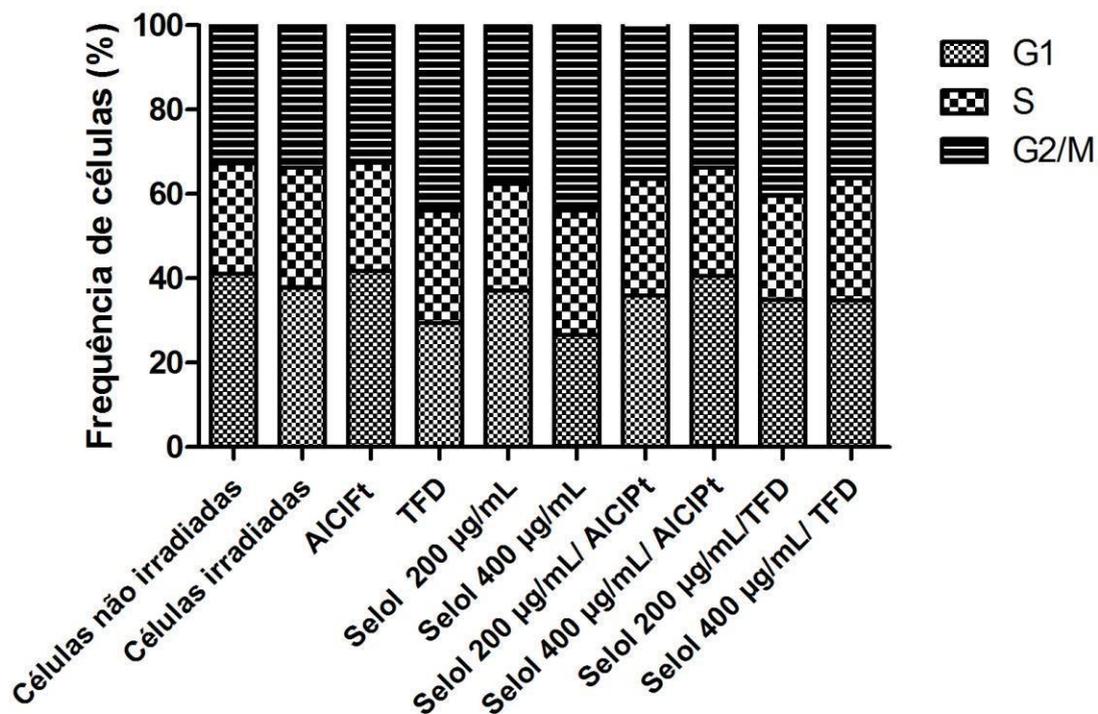
#### 5.1.4.2. Análise da fragmentação do DNA e da dinâmica da proliferação celular

Como ilustrado na Figura 16, somente a TFD induziu fragmentação no DNA quando foi aplicada em células 4T1 sensibilizadas ou não. Em células não sensibilizadas, a taxa de fragmentação no DNA induzida pela TFD foi de  $76,60\% \pm 11,21$ . Nas células sensibilizadas com o Selol na concentração de 200  $\mu\text{g/mL}$  (Selol 200  $\mu\text{g/mL}$  + TFD) e 400  $\mu\text{g/mL}$  (Selol 400  $\mu\text{g/mL}$  + TFD) a taxa de fragmentação induzida pela TFD foi, respectivamente, igual a  $57,13\% \pm 17,66$  e  $34,73\% \pm 7,23$ . Nos outros grupos a fragmentação do DNA foi inferior a 5,0%.



**Figura 16.** Taxa de fragmentação de DNA determinada por citometria de fluxo em células 4T1 sensibilizadas com Selol na concentração de 200 e 400  $\mu\text{g/mL}$  e depois submetidas à NE-AICIFt na concentração de 3,9 nM e irradiadas com luz LED na fluência de  $25,2\text{J/cm}^2$ . Os dados representam as médias de três experimentos independentes, cada um deles realizado em triplicata. As médias foram submetidas à análise de variância (ANOVA) e ao pós-teste de Bonferroni,  $p < 0,05$ . (\*; \*\* e \*\*\*) indicam diferença significativa entre os tratamentos e o grupo controle. Média  $\pm$  DP.

Com relação à dinâmica do ciclo celular, as células 4T1 na maioria dos grupos se encontravam na fase G1 do ciclo, exceto as submetidas à TFD e ao Selol 400  $\mu\text{g/mL}$ ; nesses dois últimos grupos as células se encontravam majoritariamente em G2/M, Figura 17 e Tabela III.



**Figura 17.** Dinâmica do ciclo celular determinada por meio de citometria de fluxo em células 4T1 sensibilizadas com Selol na concentração de 200 e 400  $\mu\text{g/mL}$  e depois submetidas à NE-AICIFt na concentração de 3,9 nM e irradiadas com luz LED na fluência de 25,2J/cm<sup>2</sup>. Os dados representam as médias de um experimento realizado em triplicata. As médias foram submetidas à análise de variância (ANOVA) e ao pós-teste de Bonferroni,  $p < 0,05$ . Média  $\pm$  DP.

**Tabela III.** Dinâmica do ciclo celular induzida pela Terapia Fotodinâmica em células 4T1 sensibilizadas com Selol

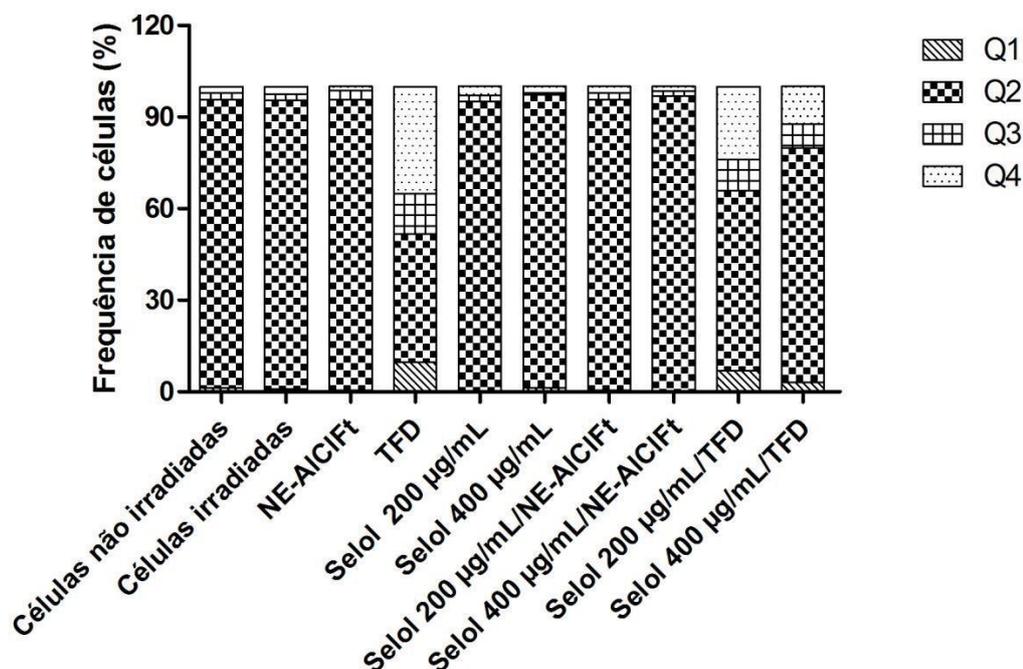
Grupo experimental	Fases do ciclo Celular		
	G1	S	G2/M)
Células não irradiadas	41,10±4,44 <sup>a</sup>	26,07±3,72 <sup>a</sup>	32,83±4,41 <sup>a</sup>
Células irradiadas	37,71±3,82 <sup>a</sup>	28,55±6,66 <sup>a</sup>	33,73±6,62 <sup>a</sup>
NE-AICIFt	41,82±3,97 <sup>a</sup>	25,60±1,87 <sup>a</sup>	32,60±2,14 <sup>a</sup>
TFD	29,34±5,0 <sup>b</sup>	26,80±4,83 <sup>a</sup>	43,88±2,44 <sup>b</sup>
Selol 200 µg/mL	37,04±2,30 <sup>a</sup>	25,35±2,12 <sup>a</sup>	37,60±4,23 <sup>a</sup>
Selol 400 µg/mL	26,60±2,7 <sup>b</sup>	29,50±2,41 <sup>a</sup>	43,92±1,10 <sup>b</sup>
Selol 200 µg/mL/NE-AICIFt	36,00±3,50 <sup>ab</sup>	27,71±2,38 <sup>a</sup>	36,37±5,34 <sup>ab</sup>
Selol 400 µg/mL/NE-AICIFt	41,00±5,30 <sup>a</sup>	25,64±1,30 <sup>a</sup>	33,71±4,03 <sup>a</sup>
Selol 200 µg/mL/TFD	35,00±3,70 <sup>ab</sup>	24,57±3,30 <sup>a</sup>	40,48±2,40 <sup>ab</sup>
Selol 400 µg/mL/TFD	35,700±1,62 <sup>ab</sup>	29,03±0,98 <sup>a</sup>	36,20±1,74 <sup>ab</sup>

NE-AIFtCl: nanoemulsão de Alumínio-Cloro Ftalocianina; TFD: Terapia Fotodinâmica. Os dados representam as médias de um experimento realizado em triplicata. As médias foram submetidas à análise de variância (ANOVA) e ao pós-teste de Bonferroni,  $p < 0,05$ . Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos. Média ±DP.

#### 5.1.4.3. Análise da morfologia celular

No citômetro de fluxo também se analisou a morfologia das células da linhagem 4T1 sensibilizadas com Selol e submetidas à TFD. Essa análise considera a homogeneidade da população no que diz respeito ao tamanho e à granulosidade das células do grupo controle.

Na Figura 18 observa-se que, com exceção das células do grupo submetido à TFD, nos diferentes tratamentos a maioria das células encontrava-se no mesmo quadrante em que se encontravam as células do grupo controle, no quadrante 2 (Q2), o que significa que elas apresentavam tamanho e granulosidade semelhantes ao grupo controle. No grupo submetido à TFD 42% das células se encontravam no Q2 e o restante distribuído nos demais quadrantes, mas principalmente no Q4 (35%). No grupo submetido ao Selol 200 µg/mL e a TFD a porcentagem de células que permaneceram em Q4 foi de 23% enquanto que o grupo submetido ao Selol 400 µg/mL e a TFD foi de 12%.



**Figura 18.** Morfologia celular analisada por citometria de fluxo. Células 4T1 sensibilizadas com Selol na concentração de 200 e 400 µg/mL e depois tratadas com NE-AICIFt na concentração de 3,9 nM e irradiadas com luz LED na fluência de 25,2J/cm<sup>2</sup>. Os dados representam as médias de um experimento realizado em triplicata. As médias foram submetidas à análise de variância (ANOVA) e ao pós-teste de Bonferroni,  $p < 0,05$ .

## 5.2. Estudo *in vivo*

Esta etapa do estudo foi realizada para determinar se a sensibilização com Selol otimiza a eficácia da Terapia Fotodinâmica na erradicação de tumor de mama em camundongas Balb-c jovens e idosas.

### 5.2.1. Quantificação da enzima Mieloperoxidase

A enzima Mieloperoxidase, considerada marcador de acúmulo e ativação de neutrófilos, foi quantificada semanalmente, sendo a primeira medida realizada sete dias após a inoculação das células tumorais 4T1, ou seja, antes dos tratamentos. Os resultados estão expressos nas figuras 19 (animais idosos) e 20 (animais jovens). Essas medidas se referem à quantidade de Mieloperoxidase na região dos tumores, pois ela não foi detectada em nenhuma outra região do corpo dos animais.

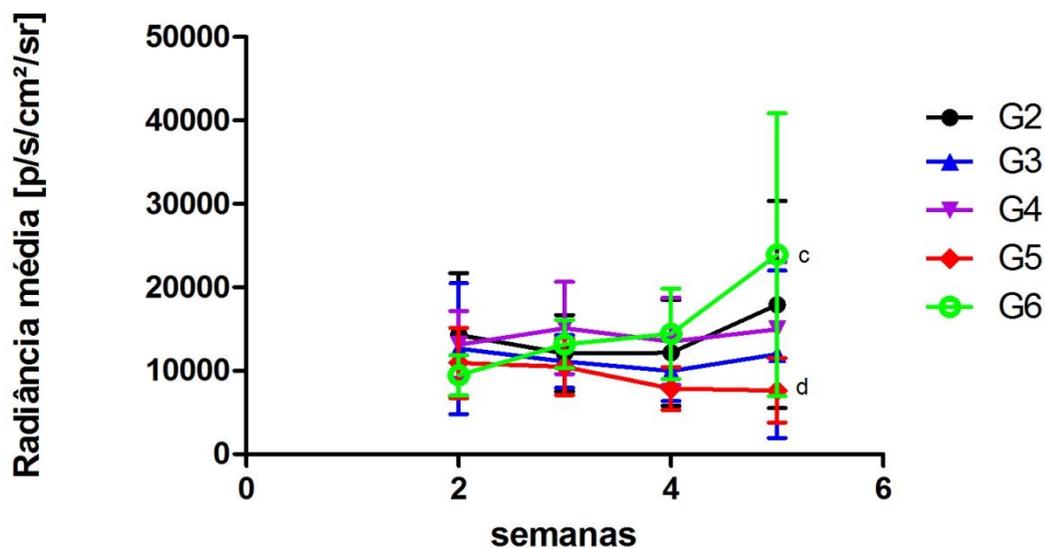
Na Tabela IV, pode-se observar que uma semana após o implante das células tumorais (antes do tratamento), os animais idosos mostraram na região tumoral níveis da enzima Mieloperoxidase significativamente maiores em comparação aos animais jovens.

Tabela IV. Níveis da enzima Mieloperoxidase em camundongos Balb/c

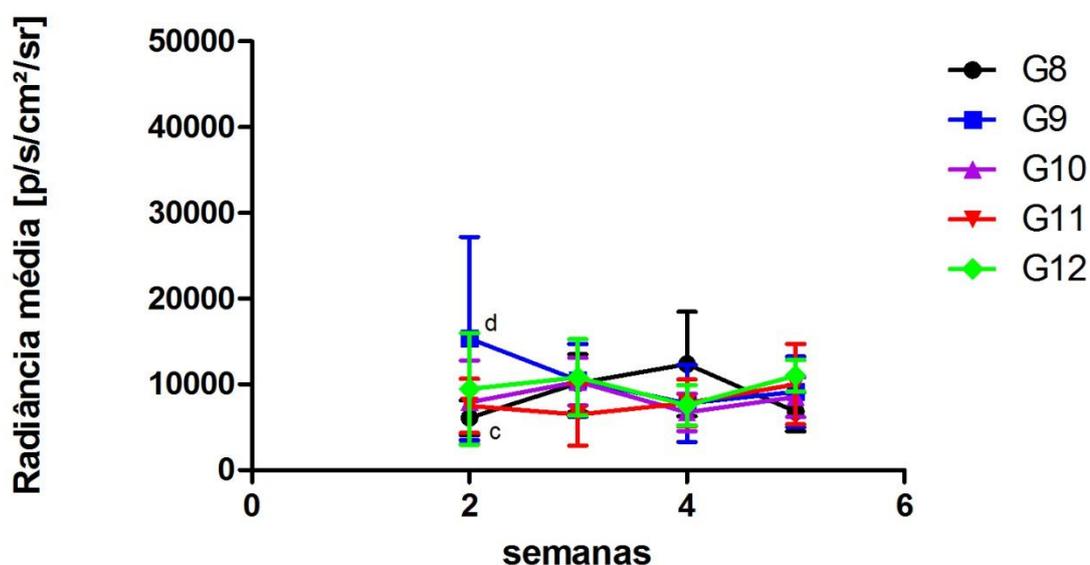
Grupos	Mieloperoxidase [p/s/cm <sup>2</sup> /sr]
Idosos	16.722,4
Jovens	7.794,4

Depois da primeira semana até a 4<sup>o</sup> semana todos os grupos apresentaram níveis da Mieloperoxidase similares. Entretanto, na 5<sup>o</sup> semana os animais com tumor e submetidos à TFD (G5) apresentaram níveis da enzima significativamente menores em comparação aos animais com tumor tratado com Selol e depois submetidos à TFD (G6).

Entre os animais jovens, a Figura 20 mostra que na segunda semana somente os animais com tumor e tratados com Selol (G9) mostraram níveis significativamente maiores do que os animais com tumor sem tratamento (G8). A partir da segunda semana todos os grupos apresentaram níveis de Mieloperoxidase similares.



**Figura 19:** Níveis da enzima Mieloperoxidase mensurados por meio de reação de luminescência do Luminol, medida por radiância média [p/s/cm<sup>2</sup>/sr] em camundongos Balb/c idosos sensibilizados com Selol na concentração de 12 mg/mL e submetidos à Terapia Fotodinâmica mediada pela NE-AICIFt na concentração de 40 µM. G2: animais com tumor sem tratamento, mas sem tratamento; G3: animais com tumor sensibilizado pelo Selol; G4: animais com tumor sensibilizado pelo Selol e tratado com NE-AICIFt; G5: animais com tumor submetido à TFD; G6: animais com tumor sensibilizado pelo Selol e submetidos à TFD. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) com pós-teste de Bonferroni, p < 0,05. Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos no mesmo tempo. Média ± DP.



**Figura 20:** Níveis da enzima Mieloperoxidase mensurados por meio de reação de luminescência do Luminol, medida por radiância média [p/s/cm<sup>2</sup>/sr] em camundongos Balb/c jovens sensibilizados com Selol na concentração de 12 mg/mL e submetidos à terapia fotodinâmica mediada pela NE-AICIFt na concentração de 40 µM. G8: animais com tumor sem tratamento, mas sem tratamento; G9: animais com tumor sensibilizado pelo Selol; G10: animais com tumor sensibilizado pelo Selol e tratado com NE-AICIFt; G11: animais com tumor submetido à TFD; G12: animais com tumor sensibilizado pelo Selol e submetidos à TFD. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) com pós-teste de Bonferroni,  $p < 0,05$ . Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos no mesmo tempo. Média  $\pm$  DP.

### 5.2.2. Toxicidade induzida pelos diferentes tratamentos

Os dados a seguir referem-se ao peso dos animais e de alguns de seus órgãos, análise bioquímica e aos parâmetros hematológicos, além da análise histopatológica de órgãos tais quais: fígados, rins, baços e pulmões. Estes ensaios foram realizados para determinar se os diferentes tratamentos seriam tóxicos para os animais.

#### 5.2.2.1. Peso corporal

Ao final do tratamento nenhum grupo mostrou alteração no peso corporal quando comparado ao grupo saudável (G1 e G9), Tabela V.

**Tabela V.** Variação do peso corporal de camundongos Balb/c sensibilizadas com Selol e submetidos à Terapia Fotodinâmica

Grupos experimentais	Peso inicial	Peso Final
Animais idosos		
G1	25,90±2,83	27,10±0,84
G2	26,02±1,22	25,66±1,77
G3	27,39±1,22	26,12±1,77
G4	25,49±2,23	24,58±1,68
G5	25,95±1,68	24,12±1,41
G6	25,63±1,52	25,20±1,96
Animais jovens		
G7	22,68±0,58	23,47±0,61
G8	22,96±1,38	21,77±1,46
G9	16,90±4,67	17,53±4,58
G10	21,90±5,18	23,37±4,87
G11	20,88±0,85	22,83±2,24
G12	22,15±1,66	23,49±2,31

G1 e G7: animais sem tumor; G2 e G8: animais com tumor, mas sem tratamento; G3 e G9: animais com tumor e tratados com Selol (12 mg/mL); G4 e G10: animais com tumor, tratados com Selol e NE-AIFtCl (40  $\mu$ M); G5 e G11: animais com tumor submetidos à TFD; G6 e G12: com animais com tumor, tratados com Selol e submetidos à TFD. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) com pós-teste de Bonferroni,  $p < 0,05$ . Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos no mesmo tempo. Média  $\pm$  DP.

#### 5.2.2.2. Peso de órgãos

Os dados referentes aos pesos médios dos baços, rins e fígados estão expressos na Tabela VI e na Figura 21.

Na Tabela VI e na Figura 21A (dados dos animais idosos) mostra que os animais idosos com tumor sem tratamento (G2), assim como os do grupo que teve o tumor sensibilizado com Selol e depois submetido à TFD (G6)

mostraram esplenomegalia; neles, os baços pesavam, respectivamente,  $0,98\pm 0,64$  g e  $0,69\pm 0,24$  g, enquanto que nos animais saudáveis o peso do baço era de  $0,12\pm 0,03$  g.

Ainda na Tabela VI e na Figura 21A observa-se que os animais idosos de todos os grupos, tratados ou não, apresentaram rins com peso similar.

Com relação ao peso dos fígados, os animais do grupo G2 (animais com tumor, mas sem tratamento) mostraram hepatomegalia; os fígados deles eram significativamente maiores ( $1,95\pm 1,04$  g) do que os do grupo saudável, G1 ( $1,08\pm 0,21$  g). Os animais dos grupos G3 ( $1,02\pm 0,47$  g), G4 ( $1,40\pm 0,11$  g), G5 ( $1,26\pm 0,01$  g) e G6 ( $1,42\pm 0,06$ g) apresentaram fígados com peso similar ao dos animais saudável (G1), Tabela V e Figura 21A.

Na Tabela VI e na Figura 21B (dados dos animais jovens) mostra que os animais jovens com tumor sem tratamento (G8) e os animais submetidos à TFD (G11) apresentaram também esplenomegalia; neles os baços pesavam, respectivamente,  $0,53\pm 0,20$  g e  $0,58\pm 0,30$  g, enquanto que nos animais saudáveis o peso do baço era de  $0,9\pm 0,005$  g. Os animais dos grupos G9, G10 e G12 apresentaram baços com peso similar ao do grupo saudável.

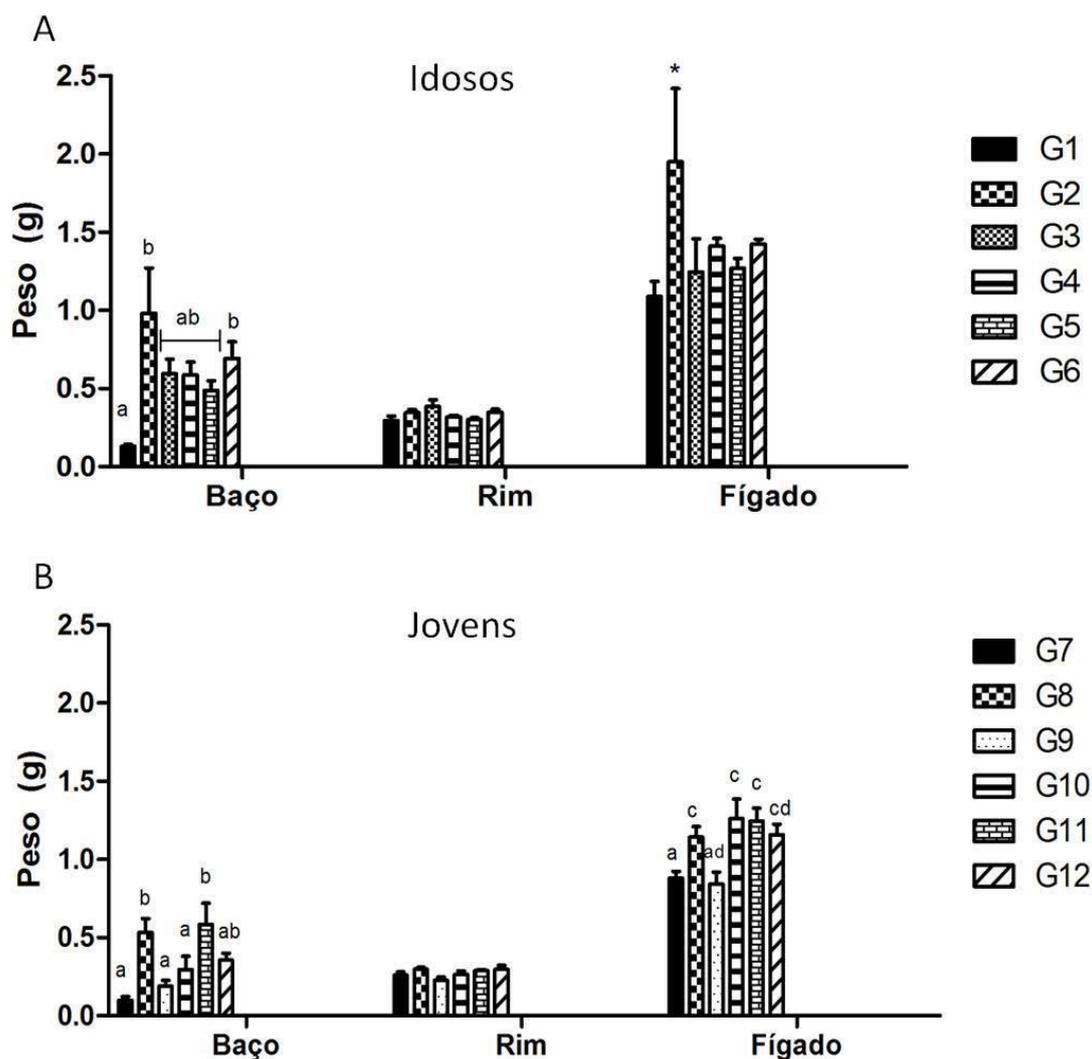
Assim como nos animais idosos, os animais jovens de qualquer grupo apresentaram rins com peso similar, Tabela V e Figura 21B.

Na Tabela VI e na Figura 21B observa-se também que somente os animais com tumor e tratados com Selol (G9) mostraram fígados com peso similar ao do grupo saudável (G7); todos os outros grupos mostraram aumento significativo no peso desse órgão em comparação ao grupo saudável (G1).

**Tabela VI.** Peso de órgãos de camundongos Balb/c sensibilizados com Selol e submetidos à Terapia Fotodinâmica.

Grupo Experimental	Peso		
	Baço	Rins	Fígado
<b>Animais idosos</b>			
G1	0,12±0,03 <sup>a</sup>	0,29±0,06	1,08±0,21 <sup>a</sup>
G2	0,98±0,64 <sup>b</sup>	0,35±0,04	1,95±1,04 <sup>b</sup>
G3	0,60±0,21 <sup>ab</sup>	0,39±0,09	1,02±0,47 <sup>a</sup>
G4	0,59±0,18 <sup>ab</sup>	0,32±0,02	1,40±0,11 <sup>a</sup>
G5	0,49±0,14 <sup>ab</sup>	0,30±0,02	1,26±0,01 <sup>a</sup>
G6	0,69±0,24 <sup>b</sup>	0,35±0,04	1,42±0,06 <sup>a</sup>
<b>Animais jovens</b>			
G7	0,10±0,05 <sup>a</sup>	0,26±0,05	0,88±0,09 <sup>a</sup>
G8	0,53±0,20 <sup>b</sup>	0,30±0,03	1,14±0,15 <sup>b</sup>
G9	0,19±0,08 <sup>a</sup>	0,27±0,05	0,84±0,17 <sup>ac</sup>
G10	0,29±0,19 <sup>a</sup>	0,26±0,05	1,26±0,28 <sup>b</sup>
G11	0,58±0,30 <sup>b</sup>	0,29±0,01	1,24±0,19 <sup>b</sup>
G12	0,36±0,10 <sup>ab</sup>	0,30±0,05	1,16±0,15 <sup>bc</sup>

G1 e G7: animais sem tumor; G2 e G8: animais com tumor, mas sem tratamento; G3 e G9: animais com tumor e tratados com Selol (12 mg/mL); G4 e G10: animais com tumor, tratados com Selol e NE-AIFtCl (40 µM); G5 e G11: animais com tumor submetidos à TFD; G6 e G12: com animais com tumor, tratados com Selol e submetidos à TFD. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) com pós-teste de Bonferroni,  $p < 0,05$ . Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos no mesmo tempo. Média ± DP.



**Figura 21:** Peso de órgãos de camundongos Balb/c sensibilizados com Selol (12 mg/mL) e submetidos à Terapia Fotodinâmica mediada pela NE-AICIFt (40  $\mu$ M). G1 e G7: animais sem tumor; G2 e G8: animais com tumor, mas sem tratamento; G3 e G9: animais com tumor sensibilizado pelo Selol; G4 e G10 animais com tumor sensibilizado pelo Selol e tratado com NE-AICIFt; G5 e G11: animais com tumor submetido à TFD; G6 e G12: animais com tumor sensibilizado pelo Selol e submetidos à TFD. Análise estatística por ANOVA com pós-teste de Bonferroni.  $P < 0,05$ . Diferentes letras indicam diferença estatística cada grupo estudado. Média  $\pm$  DP.

### 5.2.2.3. Análise Bioquímica e de parâmetros Hematológicos

#### 5.2.2.3.1. Análise Bioquímica

Os dados deste ensaio estão expressos na Tabela VII (página 67).

Conforme ilustrado na tabela VII os animais idosos dos diferentes grupos

mostraram níveis séricos de Ureia, Creatinina, Fosfatase Alcalina (FA) e Alanina aminotransferase (ALT) similares. Já com relação à Aspartato aminotransferase, os animais dos grupos G3, G4 e G6 mostraram níveis dessa enzima aumentados quando comparados ao grupo saudável (G1).

Na Tabela VII também estão expressos os dados referentes aos animais jovens. Nela observa-se que, assim como os animais idosos, os animais jovens dos diferentes grupos mostraram níveis séricos de Ureia, Creatinina, Fosfatase Alcalina (FA) e Alanina aminotransferase (ALT) similares. Nessa mesma tabela observa-se que os animais do grupo G11 mostraram aumento e os do grupo G12 diminuição dos níveis de AST em comparação com o grupo saudável (G7).

**Tabela VII.** Dosagens bioquímicas de camundongos Balb/c sensibilizadas com Selol e submetidos à Terapia Fotodinâmica

Grupo Experimental	Ureia	Creatinina	FA (U/L)	ALT (UI/L)	AST (UI/L)
Animais idosos					
G1	53,00±2,74	1,30±1,14	15,00±2,92	40,40±16,95	133,00±86,69 <sup>a</sup>
G2	35,60±2,70	0,45±0,04	8,40±1,67	31,40±7,96	156,20±77,61 <sup>a</sup>
G3	46,60±6,31	0,55±0,03	5,00±4,00	123,00±13212	344,60±175,87 <sup>b</sup>
G4	38,00±6,78	0,75±0,34	6,75± 3,20	33,50±22,78	338,50±142,61 <sup>b</sup>
G5	49,00±3,56	0,53±0,03	3,50±1,00	28,75±5,32	235,75±39,25 <sup>ab</sup>
G6	48,4± 4,67	0,51±0,04	3,20±0,84	31,20±8,41	322,8±123,87 <sup>b</sup>
Animais jovens					
G7	45,75±10,18	0,50±0,02	1,00± 1,15	74,00±58,32	292,75±197,24 <sup>bc</sup>
G8	39,00±3,08	0,50±0,04	4,60± 3,65	34,20±7,69	409,00±207,51 <sup>ab</sup>
G9	62,75±10,56	0,50±0,14	9,00±2,94	78,50±16,78	293,25±102,31 <sup>abc</sup>
G10	48,80±4,09	0,74±0,15	62,2± 8,53	51,60±6,95	221,00±78,87 <sup>ab</sup>
G11	78,60±69,17	0,86±0,81	9,00± 7,78	79,00±14,61	356,4±200,89 <sup>a</sup>
G12	52,40±5,27	0,47±0,03	3,80± 2,59	39,80±16,18	237,40±90,54 <sup>c</sup>

G1 e G7: animais sem tumor; G2 e G8: animais com tumor, mas sem tratamento; G3 e G9: animais com tumor tratado com Selol; G4 e G10 animais com tumor tratado com Selol e NE-AICIFt; G5 e G11: animais com tumor submetido à TFD; G6 e G12: animais com tumor tratado com Selol e submetido à TFD. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e ao pós-teste de Bonferroni,  $p < 0,05$ . Diferentes letras indicam diferença significativa entre os grupos. FA: Fosfatase alcalina; ALT: Alanina aminotransferase; AST: Aspartato aminotransferase. Média ±DP.

5.2.2.3.2. *Análise Hematológica*

Os resultados da análise hematológica estão expressos nas tabelas VIII (eritrograma e contagem total de plaquetas) e IX (leucograma).

O eritrograma foi analisado pelos seguintes parâmetros: contagem total de eritrócitos (RBC), concentração de hemoglobina (HGB), hematócrito (HCT), volume corpuscular das hemácias (MCV), hemoglobina corpuscular média (MCH), concentração hemoglobínica corpuscular média (MCHC), variação dos volumes dos eritrócitos (RDW-SD) e a distribuição em valores percentuais desses tamanhos dos eritrócitos (RDW-CV). Conforme mostra a Tabela VIII não houve alteração significativa na contagem de qualquer um dos parâmetros analisados.

Além do eritrograma realizou-se a contagem de plaquetas. A análise dos dados mostra alterações nos valores das plaquetas de alguns grupos em comparação com o grupo saudável; o grupo G2 (animais idosos com tumor, mas sem tratamento) mostrou diminuição nos valores de plaquetas (Tabela VIII), já os jovens do grupo G12 (animais com tumor tratados com Selol e submetidos à TFD) mostraram aumento (Tabela VIII).

O leucograma foi analisado considerando-se os parâmetros: contagem total de leucócitos (WBC); contagem de linfócitos (W-SCC); contagem de monócitos (W-MCC); contagem de neutrófilos (W-LCC); percentual de células brancas pequenas (W-SCR); percentual de células brancas médias (W-MCR); percentual de células brancas grandes (W-LCR), conforme mostrado na Tabela VIII.

A análise dessa tabela mostra que os animais idosos com tumor, tratados ou não (G2, G3, G4, G5 e G6), mostraram aumento significativo na contagem

total de leucócitos (WBC) em comparação aos animais idosos saudáveis (G1). Já entre os animais jovens, somente os tratados com Selol (G9) apresentaram aumento na contagem total de leucócitos.

Considerando a contagem diferencial de leucócitos, os animais idosos com tumor, tratados ou não, apresentaram diminuição no percentual de linfócitos (W-SCR) e aumento no percentual de células brancas médias (W-MCR) e na contagem de monócitos (W-MCC), em comparação aos animais saudáveis, Tabela IX.

Com relação aos animais jovens, na contagem diferencial de leucócitos, com exceção dos animais tratados com Selol e submetidos à TFD (G12), todos os outros mostraram diminuição do percentual de células brancas pequenas (W-SCR) e aumento do percentual de células brancas médias (W-MCR). Já com relação à contagem de monócitos (W-MCC), somente os animais do grupo G9 apresentaram aumento no número dessas células em comparação aos animais saudáveis.

**Tabela VIII.** Eritrograma e contagem de plaquetas em camundongos Balb/c com tumor sensibilizado com Selol e submetido à Terapia Fotodinâmica

Grupos	Parâmetros								
	RBC ( $\times 10^6/\mu\text{L}$ )	HGB (g/dL)	HCT (%)	MCV (fL)	MCH (pg)	MCHC (g/dL)	RDWC (%)	RDWSD (fL)	PLT ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )
Animais idosos									
G1	8,93 $\pm$ 0,45	13,00 $\pm$ 0,56	33,08 $\pm$ 1,51	37,04 $\pm$ 1,06	14,56 $\pm$ 0,39	39,3 $\pm$ 0,21	15,02 $\pm$ 0,80	27,38 $\pm$ 0,98	858,00 $\pm$ 297,48 <sup>a</sup>
G2	7,13 $\pm$ 1,11	10,20 $\pm$ 1,72	26,34 $\pm$ 5,63	36,74 $\pm$ 2,28	14,28 $\pm$ 0,35	39,0 $\pm$ 1,87	17,60 $\pm$ 1,29	31,3 $\pm$ 3,59	544,80 $\pm$ 556,40 <sup>b</sup>
G3	8,52 $\pm$ 0,49	11,74 $\pm$ 0,73	30,56 $\pm$ 1,84	35,62 $\pm$ 1,40	3,7 $\pm$ 0,73	38,42 $\pm$ 0,53	17,56 $\pm$ 0,80	29,72 $\pm$ 1,29	1055,80 $\pm$ 323,55 <sup>a</sup>
G4	7,83 $\pm$ 0,42	10,83 $\pm$ 0,69	27,87 $\pm$ 1,78	35,62 $\pm$ 1,56	13,82 $\pm$ 0,45	38,8 $\pm$ 0,86	19,55 $\pm$ 1,16	32,32 $\pm$ 3,20	1062,00 $\pm$ 119,96 <sup>a</sup>
G5	7,5 $\pm$ 0,46	10,98 $\pm$ 0,60	27,92 $\pm$ 1,90	37,22 $\pm$ 0,34	14,62 $\pm$ 0,17	39,3 $\pm$ 0,18	17,68 $\pm$ 0,84	31,25 $\pm$ 0,52	768,75 $\pm$ 257,43 <sup>a</sup>
G6	8,60 $\pm$ 1,40	11,52 $\pm$ 1,84	29,68 $\pm$ 4,63	34,56 $\pm$ 0,82	13,42 $\pm$ 0,55	38,8 $\pm$ 0,86	20,52 $\pm$ 1,56	31,68 $\pm$ 2,60	1289,20 $\pm$ 246,68 <sup>a</sup>
Animais jovens									
G7	8,92 $\pm$ 1,32	12,78 $\pm$ 1,68	31,72 $\pm$ 5,41	35,55 $\pm$ 0,26	14,37 $\pm$ 0,27	40,37 $\pm$ 0,85	15,15 $\pm$ 0,52	26,65 $\pm$ 0,42	846,50 $\pm$ 339,93 <sup>a</sup>
G8	10,02 $\pm$ 1,84	14,58 $\pm$ 2,62	36,00 $\pm$ 6,74	35,94 $\pm$ 0,26	14,56 $\pm$ 0,23	40,56 $\pm$ 0,45	16,20 $\pm$ 0,60	28,3 $\pm$ 1,31	656,60 $\pm$ 189,81 <sup>a</sup>
G9	9,07 $\pm$ 0,44	12,54 $\pm$ 0,59	36,82 $\pm$ 7,87	35,92 $\pm$ 1,00	14,08 $\pm$ 0,45	39,24 $\pm$ 0,27	16,30 $\pm$ 1,38	28,62 $\pm$ 1,82	1198,40 $\pm$ 32,79 <sup>a</sup>
G10	9,65 $\pm$ 0,99	13,68 $\pm$ 1,29	33,30 $\pm$ 4,00	35,00 $\pm$ 1,52	13,74 $\pm$ 0,82	39,22 $\pm$ 0,24	15,48 $\pm$ 1,33	30,06 $\pm$ 1,37	1106,60 $\pm$ 256,76 <sup>a</sup>
G11	10,31 $\pm$ 2,48	14,44 $\pm$ 3,05	31,82 $\pm$ 1,60	35,10 $\pm$ 0,81	13,84 $\pm$ 0,35	39,44 $\pm$ 0,21	17,12 $\pm$ 1,29	27,34 $\pm$ 1,58	857,40 $\pm$ 162,84 <sup>a</sup>
G12	9,52 $\pm$ 1,18	13,06 $\pm$ 1,50	34,66 $\pm$ 3,69	35,92 $\pm$ 0,77	14,20 $\pm$ 0,63	39,54 $\pm$ 1,30	18,52 $\pm$ 2,24	26,64 $\pm$ 1,84	1365,40 $\pm$ 317,8 <sup>b</sup>

G1 e G7: animais sem tumor; G2 e G8: animais com tumor, mas sem tratamento; G3 e G9: animais com tumor sensibilizado pelo Selol; G4 e G10: animais com tumor sensibilizado pelo Selol e tratado com NE-AICIFt; G5 e G11: animais com tumor submetido à TFD; G6 e G12: animais com tumor sensibilizado pelo Selol e submetido à TFD. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) com pós-teste de Bonferroni,  $p < 0,05$ . Diferentes letras indicam diferença significativa entre os grupos. RBC: contagem de eritrócitos; HGB: hemoglobina; RDWC: amplitude de distribuição dos eritrócitos; PLT: contagem total de plaquetas. Média  $\pm$ DP.

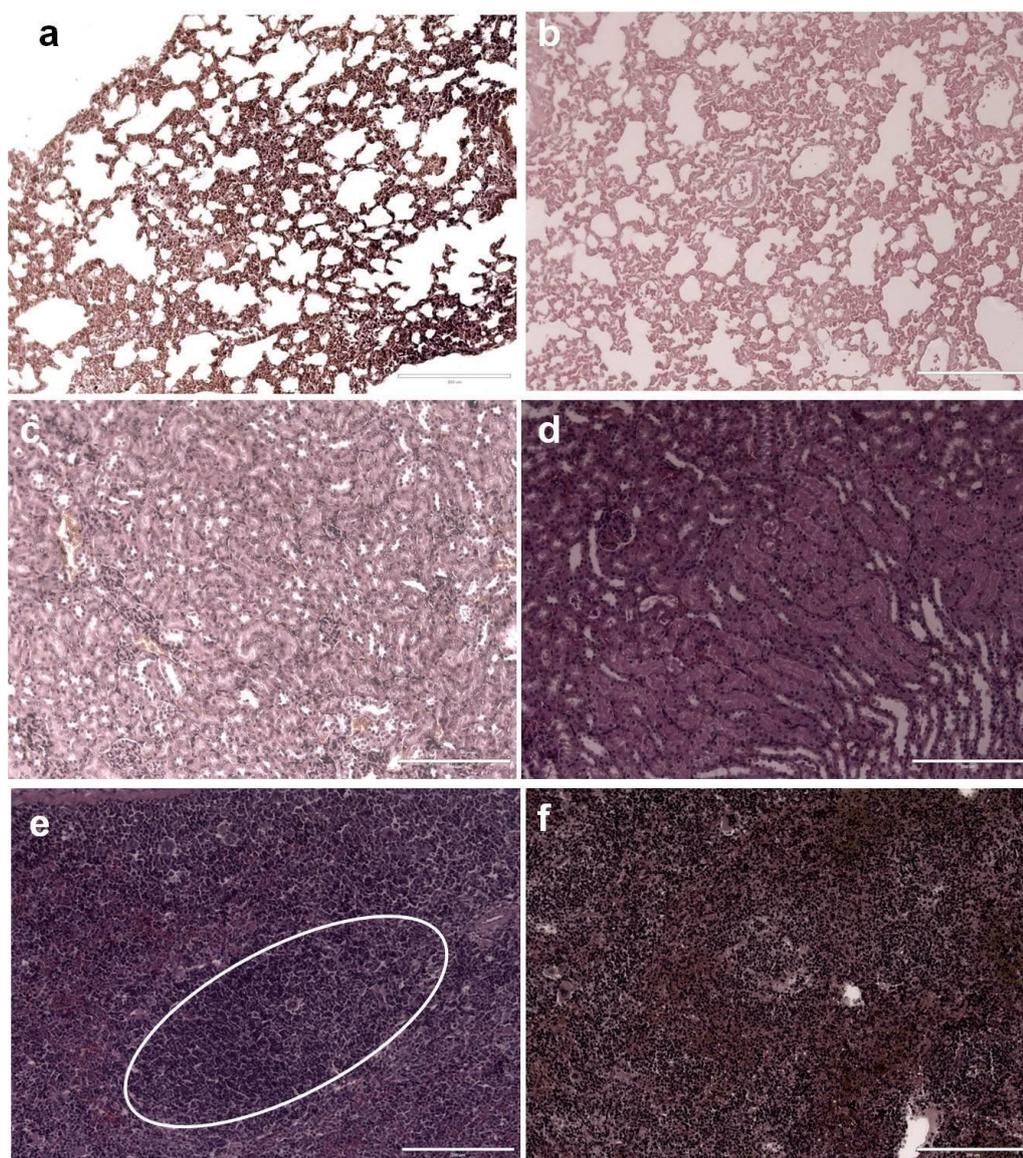
**Tabela IX.** Leucograma de camundongos Balb/c com tumor sensibilizado com Selol e submetido à Terapia Fotodinâmica

Grupos	Parâmetros						
	WBC ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	W-SCR (%)	W-MCR (%)	W-LCR (%)	W-SCC ( $10^3/\mu\text{L}$ )	W-MCC ( $10^3/\mu\text{L}$ )	W-LCC ( $10^3/\mu\text{L}$ )
Animais idosos							
G1	4,5 $\pm$ 1,46 <sup>1a</sup>	58,12 $\pm$ 8,72 <sup>a</sup>	38,12 $\pm$ 8,59 <sup>a</sup>	3,76 $\pm$ 3,14	2,7 $\pm$ 1,23	1,66 $\pm$ 0,33 <sup>a</sup>	0,14 $\pm$ 0,15
G2	53,80 $\pm$ 34,90 <sup>b</sup>	13,62 $\pm$ 4,19 <sup>b</sup>	78,82 $\pm$ 2,80 <sup>b</sup>	7,56 $\pm$ 1,75	6,24 $\pm$ 2,41	43 $\pm$ 28,73 <sup>b</sup>	4,56 $\pm$ 3,81
G3	48,96 $\pm$ 26,04 <sup>b</sup>	15,68 $\pm$ 11,87 <sup>b</sup>	72,58 $\pm$ 7,18 <sup>b</sup>	11,74 $\pm$ 8,69	5,66 $\pm$ 2,48	36,64 $\pm$ 20,38 <sup>b</sup>	6,66 $\pm$ 5,29
G4	41,65 $\pm$ 24,13 <sup>b</sup>	13,02 $\pm$ 4,09 <sup>b</sup>	76,7 $\pm$ 3,26 <sup>b</sup>	10,27 $\pm$ 4,20	4,80 $\pm$ 2,37	31,8 $\pm$ 20,51 <sup>b</sup>	5,05 $\pm$ 5,34
G5	55,90 $\pm$ 36,21 <sup>b</sup>	15,72 $\pm$ 4,89 <sup>b</sup>	76,07 $\pm$ 1,97 <sup>b</sup>	8,2 $\pm$ 3,47	7,40 $\pm$ 3,05	42,85 $\pm$ 32,47 <sup>b</sup>	5,65 $\pm$ 6,35
G6	65,12 $\pm$ 55,31 <sup>b</sup>	13,86 $\pm$ 7,83 <sup>b</sup>	71,66 $\pm$ 5,83 <sup>b</sup>	14,48 $\pm$ 7,90	6,26 $\pm$ 3,08	46,9 $\pm$ 39,86 <sup>b</sup>	11,96 $\pm$ 12
Animais jovens							
G7	5,73 $\pm$ 1,19 <sup>a</sup>	73 $\pm$ 4,38 <sup>a</sup>	24,47 $\pm$ 1,80 <sup>a</sup>	2,52 $\pm$ 3,63	4,15 $\pm$ 0,91	1,4 $\pm$ 0,35 <sup>a</sup>	0,17 $\pm$ 0,28
G8	27,52 $\pm$ 18,32 <sup>abc</sup>	25,04 $\pm$ 22,31 <sup>b</sup>	62,76 $\pm$ 19,53 <sup>b</sup>	12,2 $\pm$ 6,41	4,88 $\pm$ 2,47	18,46 $\pm$ 13,06 <sup>ab</sup>	4,18 $\pm$ 4,5
G9	52,68 $\pm$ 43,52 <sup>c</sup>	24,42 $\pm$ 13,49 <sup>b</sup>	64,72 $\pm$ 8,40 <sup>b</sup>	10,86 $\pm$ 8,31	9,8 $\pm$ 7,66	36,68 $\pm$ 32,23 <sup>b</sup>	6,2 $\pm$ 5,36
G10	18,38 $\pm$ 12,60 <sup>ac</sup>	27,7 $\pm$ 6,25 <sup>bc</sup>	66,8 $\pm$ 4,68 <sup>b</sup>	5,5 $\pm$ 4,67	4,74 $\pm$ 2,33	12,26 $\pm$ 8,33 <sup>ab</sup>	1,38 $\pm$ 2,04
G11	6,00 $\pm$ 5,37 <sup>a</sup>	37,24 $\pm$ 17,48 <sup>bc</sup>	59,76 $\pm$ 16,62 <sup>b</sup>	3 $\pm$ 1,88	1,82 $\pm$ 1,38	4 $\pm$ 4,7 <sup>a</sup>	0,18 $\pm$ 0,17
G12	27,50 $\pm$ 25,15 <sup>ac</sup>	52,78 $\pm$ 20,86 <sup>ac</sup>	44,9 $\pm$ 19,02 <sup>ab</sup>	2,32 $\pm$ 2,34	12,24 $\pm$ 11,14	14,18 $\pm$ 14,49 <sup>ab</sup>	1,08 $\pm$ 1,37

G1 e G7: animais sem tumor; G2 e G8: animais com tumor, mas sem tratamento; G3 e G9: animais com tumor tratado com Selol; G4 e G10 animais com tumor tratado com Selol e NE-AICIFt; G5 e G11: animais com tumor submetido à TFD; G6 e G12: animais com tumor tratado com Selol e submetido à TFD. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e ao pós-teste de Bonferroni,  $p < 0,05$ . Diferentes letras indicam diferença significativa entre os grupos. WBC: contagem total de leucócitos; W-SCR: percentual de células brancas pequenas; W-MCR: percentual de células brancas médias; WLCR: percentual de células brancas grandes; W-SCC: contagem de linfócitos; W-MCC: contagem de monócitos, eosinófilos e basófilos; W-LCC contagem de neutrófilos. Média  $\pm$  DP.

5.2.2.3.4. *Análise histopatológica do baço, rins, fígado e pulmão de animais com tumor sensibilizados pelo Selol e submetidos à terapia fotodinâmica.*

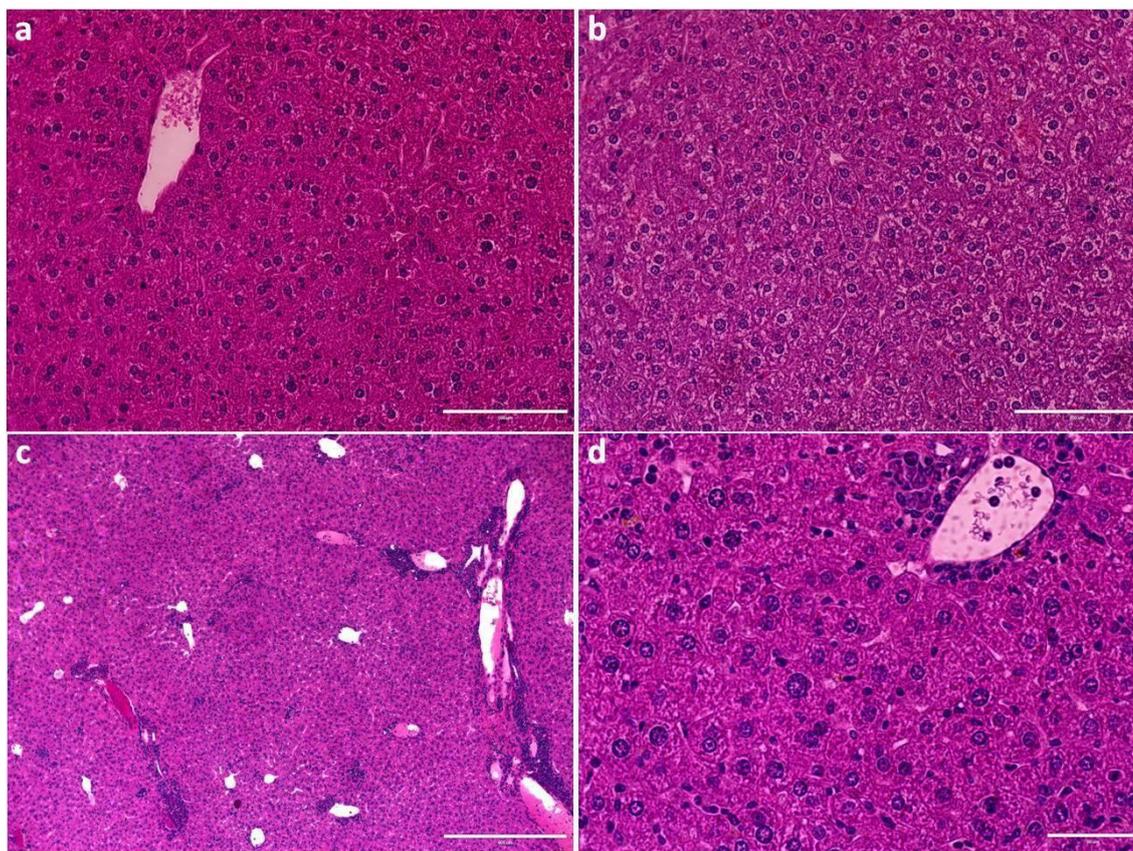
A análise histológica com coloração de H&E dos pulmões, rins, e baços dos animais, tanto idosos quanto jovens, submetidos aos diferentes tratamentos não mostrou, ao microscópio de luz, alteração morfológica nesses órgãos (Figura 22), barra de escala igual a 200 nm.



**Figura 22.** Fotomicrografia de cortes histológicos de pulmão, rim e baço corados com H&E de camundongos BALB/c com tumores sensibilizados com Selol e submetidos à TFD. A: pulmão de animal idoso saudável. B: pulmão de animal jovem saudável. C: rim de animal idoso. D: rim de animal jovem. E: baço de animal idoso e F: Baço de animal jovem. Circulo envolvendo polpa branca no baço.

Apesar de não apresentarem alterações na estrutura do tecido hepático, todos os animais idosos, com tumor ou não, apresentaram esteatose hepática, Figura 23b, enquanto que entre os animais jovens, somente dois com tumor sem tratamento e um tratado com Selol e submetido à TFD apresentaram esteatose hepática.

Nos animais idosos e nos jovens com tumor, tratados ou não, foram visualizados infiltrados inflamatórios nesse órgão, principalmente, em torno de vasos sanguíneos, em maior ou menor grau. Os animais tratados com Selol foram os que apresentaram focos inflamatórios de menor grau, barra de escala igual a 200  $\mu\text{m}$ .



**Figura 23.** Fotomicrografias de cortes histológicos de fígados, corados com H&E de camundongos BALB/c com tumores sensibilizados com Selol e submetidos à TFD. A: fígado normal de animal jovem; B: fígado de animal normal idoso com esteatose; C: infiltrados inflamatórios em torno de vasos sanguíneos; D: infiltrados inflamatórios em torno de uma vênula. Barra de escala igual a 200  $\mu\text{m}$ .

### 5.2.3. Avaliação da eficácia da Terapia Fotodinâmica na erradicação de tumores sensibilizados pelo Selol.

Para determinar a eficácia da terapia fotodinâmica na erradicação de tumores sensibilizados pelo Selol utilizaram-se dois parâmetros: (1) determinação do volume tumoral e (2) análise histopatológica dos tumores e dos linfonodos sentinelas. Os resultados estão descritos a seguir.

#### 5.2.3.1. Volume tumoral

Os dados referentes ao volume dos tumores estão expressos na Tabela X e na Figura 24.

Na Tabela X e na Figura 24A (animais idosos), observa-se que ao fim do tratamento os tumores dos animais do grupo G6 (animais cujo tumor foi sensibilizado com Selol e depois submetido à TFD) apresentaram volume igual a  $270,10 \pm 130,10 \text{ mm}^3$ ; neles a taxa de redução foi de 47,65%, quando comparado ao grupo G2 (animais com tumor sem tratamento) cujos tumores tinham volume igual a  $515,96 \pm 157,46 \text{ mm}^3$ , Tabela X. Os tumores dos animais do grupo G4 (animais tratados somente com Selol) mostraram maior taxa de redução (67,35%) e os do grupo G5 (animais submetidos à TFD) apresentaram menor taxa de redução (28,11%).

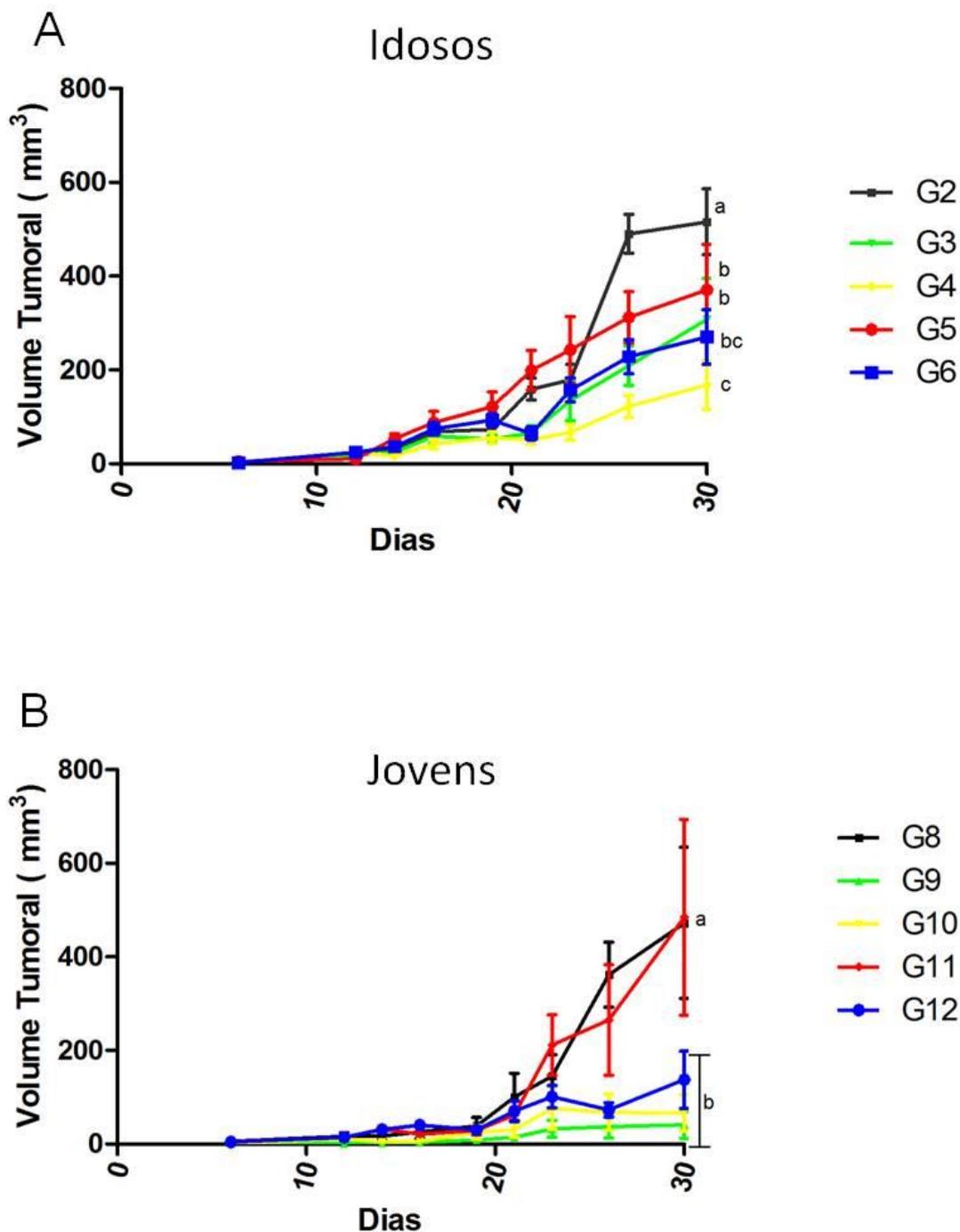
Também na Tabela X, mas com relação aos animais jovens (Figura 24B), observa-se que ao fim do tratamento os tumores dos animais do grupo G9, G10 e G12 apresentaram as maiores taxas de redução tumoral, neles a redução foi respectivamente, 91,36 %, 86,00% e 70,92 %, quando comparado ao grupo G8 (animais com tumor sem tratamento) que apresentaram tumores com volume igual a  $472,58 \pm 361,18$ . No grupo G12 apesar da redução do volume tumoral ter sido de 70,92 %, ela não foi significativa quando comparada a do grupo G8;

nesse grupo um dos animais não apresentou redução tumoral. Já os animais submetidos somente à TFD não tiveram os tumores reduzidos pelo contrário, eles mostraram um discreto aumento (2,58%).

**Tabela X.** Volume dos tumores de camundongos Balb/c sensibilizados com Selol e submetidos à Terapia Fotodinâmica

Grupo Experimental	Volume tumoral (mm <sup>3</sup> )		
	Inicial	Final	Taxa de redução (%)
Animais idosos			
G1	-	-	-
G2	3,67±2,16	515,96±157,45 <sup>a</sup>	-
G3	3,73±2,24	307,55±194,83 <sup>b</sup>	40,39
G4	3,77±1,26	168,45±116,05 <sup>c</sup>	67,35
G5	5,30±2,13	370,93±216,37 <sup>b</sup>	28,11
G6	2,13±1,26	270,10±130,10 <sup>bc</sup>	47,65
Animais jovens			
G7	-	-	-
G8	5,55±5,13	472,58±361,18 <sup>a</sup>	-
G9	0,77±0,83	40,85±63,68 <sup>b</sup>	91,36
G10	1,36±1,31	66,40±88,36 <sup>b</sup>	86,00
G11	4,67±3,52	484,75±468,82 <sup>a</sup>	2,58*
G12	4,99±2,41	137,43±136,72 <sup>b</sup>	70,92

G1 e G7: animais sem tumor; G2 e G8: animais com tumor sem tratamento; G3 e G9: animais com tumor sensibilizado com Selol; G4 e G10: animais com tumor sensibilizado com Selol e tratado com NE-AIFtCl; G5 e G11: animais com tumor submetido à terapia fotodinâmica; G6 e G12: animais com tumor sensibilizado com Selol e depois submetido à TFD. A concentração do Selol foi igual a 12 mg/mL e a da NE-AIFtCl 40 µM. (\*) representa aumento do volume tumoral. Média ± DP.

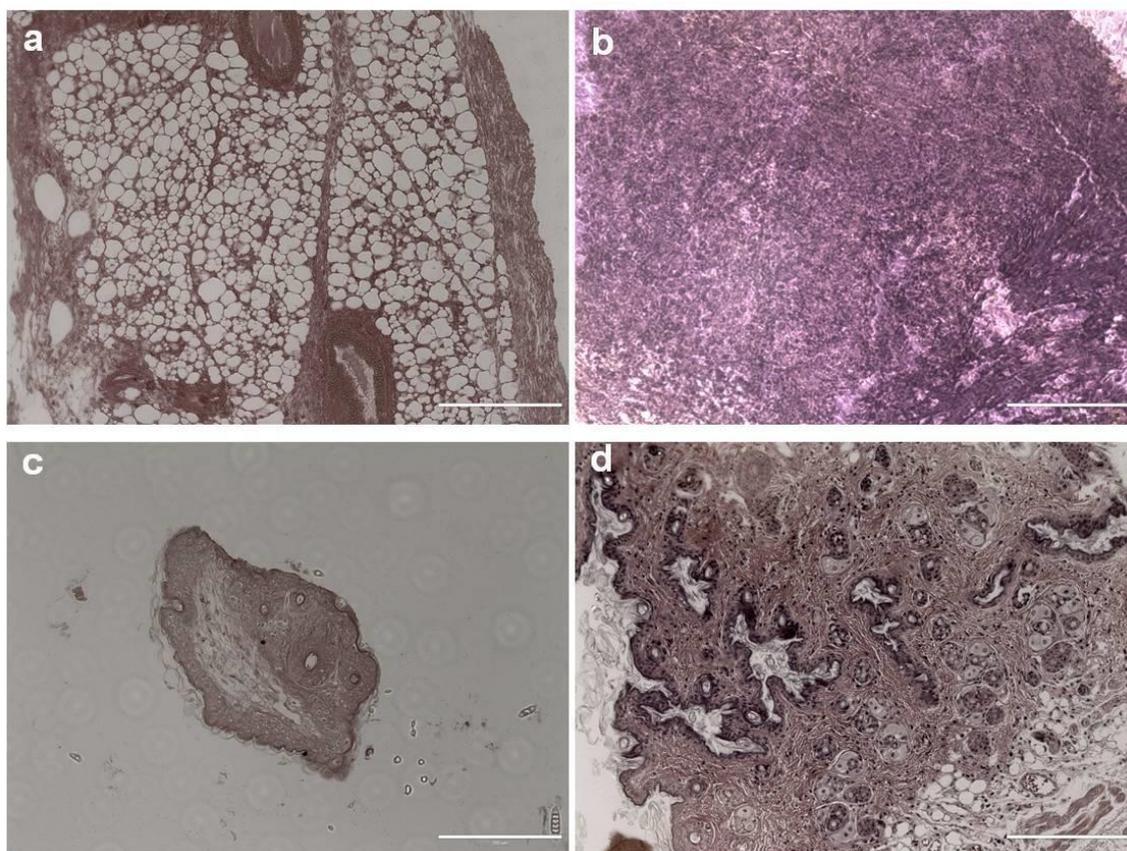


**Figura 24.** Volume dos tumores de camundongos Balb/c ao longo do tratamento. A: animais idosos e B: animais jovens. G1 e G7: animais sem tumor; G2 e G8: animais com tumor sem tratamento; G3 e G9: animais com tumor sensibilizado com Selol; G4 e G10: animais com tumor sensibilizado com Selol e tratado com NE-AIFtCl; G5 e G11: animais com tumor submetido à terapia fotodinâmica; G6 e G12: animais com tumor sensibilizado com Selol e depois submetido à TFD. A concentração do Selol foi igual a 12 mg/mL e a da NE-AIFtCl 40  $\mu$ M. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e ao pós-teste de Bonferroni,  $p < 0,05$ . Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos no mesmo tempo. Média  $\pm$  DP.

### 5.2.3.2 Análise histopatológica dos tumores e dos linfonodos sentinelas

#### 5.2.3.2.1. Análise histopatológica dos tumores

A análise histopatológica mostrou que alguns animais jovens tratados com Selol mostraram remissão total tumor, Figura 25c e 25d. Dos quinze animais que receberam Selol três apresentaram remissão total do tumor. A Figura 25a e 25b mostram respectivamente, uma mama saudável e uma com tumor.



**Figura 25.** Fotomicrografias de cortes histológicos corados com H&E de tecido mamário de camundongos Balb/c. A: mama saudável; B: mama com tumor sem tratamento; C, D: tumor tratado com Selol. . Barra de escala igual a 200  $\mu$ m.

### 5.2.3.2.2. Análise histopatológica de linfonodos sentinelas

Com relação aos linfonodos sentinelas, conforme ilustrado na Tabela XI, todos os animais idosos ou jovens sem tratamento apresentaram metástases nos linfonodos sentinelas.

Ainda na Tabela X, observa-se que entre os animais idosos, três dos tratados com Selol; quatro dos tratados Selol e AICIFt e dois dos tratados com Selol e depois submetidos a TFD apresentaram metástases nesses órgão.

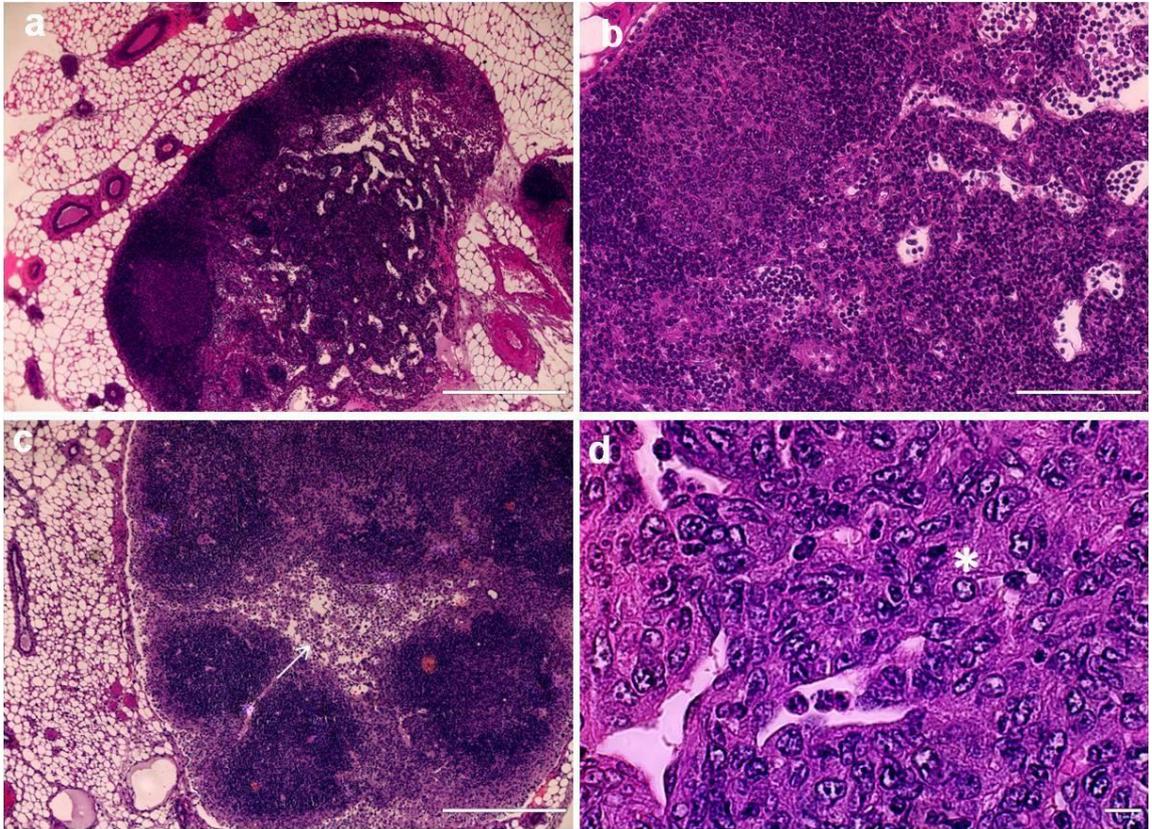
Entre os animais jovens, apenas os tratados com Selol sozinho (G9) não apresentaram metástase. No grupo tratado com Selol e AICIFt (G10) apenas um animal apresentou metástase. Entre os submetidos à TFD e os tratados com Selol e depois submetidos à TFD três e dois apresentaram metástase, respectivamente.

**Tabela XI.** Incidência de metástase em linfonodos sentinelas de camundongos Balb/c cujos tumores foram sensibilizados com Selol e submetidos à Terapia Fotodinâmica

Grupos	Animais idosos	Grupos	Animais jovens
G2	5/5	G8	5/5
G3	3/5	G9	-
G4	4/5	G10	1/5
G5	0/3	G11	3/5
G6	2/5	G12	2/5

G1 e G7: animais sem tumor; G2 e G8: animais com tumor sem tratamento; G3 e G9: animais com tumor sensibilizado com Selol; G4 e G10: animais com tumor sensibilizado com Selol e tratado com NE-AIFtCl; G5 e G11: animais com tumor submetido à terapia fotodinâmica; G6 e G12: animais com tumor sensibilizado com Selol e depois submetido à TFD. A concentração do Selol foi igual a 12 mg/mL e a da NE-AIFtCl 40 µM.

A maioria das células neoplásicas foi visualizada dentro dos seios subcapsulares e medulares, Figura 26.



**Figura 26.** Fotomicrografias de cortes histológicos corados com H&E de linfonodos sentinelas de camundongos Balb/c com tumor e sem tumor. A: Linfonodo sentinela de animal saudável em aumento de 10x. B: Linfonodo sentinela de animal saudável em aumento de 40x. C: Linfonodo sentinela de animal com tumor sem tratamento em aumento de 40x; D: Linfonodo sentinela de animal com tumor sem tratamento em aumento de 100x. Seta indica seio medular com células metastáticas, \* indica células metastáticas. Em a, b e c barra de escala igual a 400  $\mu$ m. Em d, escala igual a 10  $\mu$ m.

## **6. DISCUSSÃO**

O câncer de mama, mesmo com os avanços na detecção precoce, ainda é uma das principais causas de mortalidade em mulheres em todo o mundo. Assim, considerando não somente as estatísticas nada promissoras, mas também o fato de que a efetividade das terapias utilizadas contra o câncer de mama é limitada (Saeg *et alli*, 2018). Realizou-se este estudo de modo a analisar uma via que potencializasse a eficácia da Terapia Fotodinâmica na erradicação de tumores de mama. Para tal, células tumorais murinas, 4T1, foram transplantadas para a 5ª mama de camundongos Balb-c idosas e jovens. Após a formação da massa tumoral essas células foram expostas ao Selol, uma mistura de selenotriacilglicerídeo que contém Selênio em estado de oxidação +4 e que de acordo com Fernandes e colaboradores, 2015 (Staron *et alli*, 2010; Flis, 2015) aumenta a sensibilidade das células tumorais à radiação.

Assim, após serem sensibilizados pelo Selol, os tumores foram submetidos à Terapia Fotodinâmica. Essa modalidade terapêutica não induz mielossupressão, um dos piores efeitos da quimioterapia, pois é alvo-específica devido à delimitação precisa do local de irradiação além de ativar o sistema imunitário (Rezende *et alli*, 2005; Marrache *et alli*, 2013)

Fora a sensibilização prévia dos tumores, para potencializar a TFD utilizou-se também nanossistemas que possibilitam a administração de dosagens menores do fármaco, por liberarem o fármaco de forma controlada e sustentada, além de melhorar a hidrofobicidade de muitos fármacos (Singh *et alli*, 2009). Assim, neste estudo, tanto o Selol quanto o fotossensibilizante, Alumínio-Cloro-Ftalocianina (AICIFt), foram utilizados na forma de nanossistemas desenvolvidos no Laboratório de Nanobiotecnologia desta universidade.

A AICIFt foi utilizada em forma de nanoemulsão, o que lhe proporciona maior estabilidade, aumento da área interfacial, rápida absorção pelos enterócitos, em caso de administração oral, além de aumentar a solubilidade e a biodisponibilidade do fármaco (Rai *et alli*, 2018). Para preparação da nanoemulsão foi utilizado o método de emulsificação espontânea, um método simples, livre de solventes, de baixo custo e que pode ser produzido em larga escala e que utiliza a energia armazenada no próprio sistema (Goto *et alli*, 2017; Rai *et alli*, 2018).

Esse sistema de nanoemulsão mostrou ter diâmetro hidrodinâmico (DH) de 23,5 nm, o que está de acordo com Doost e colaboradores, 2018, que define nanoemulsão como um sistema coloidal com nanogotas de diâmetro inferior a 100 nm (Doost, 2018). A nanoemulsão mostrou também índice de polidispersão igual a 0,04, o que denota uma população de nanogotículas monodispersa, ou seja, uma estreita distribuição de tamanho na população, importante para evitar o efeito chamado “maturação de Ostwald”, que ocorre devido à mudança no raio de curvatura das gotículas, resultando na coalescência com partículas maiores e conseqüentemente em aumento do DH no decorrer do tempo (Rai, 2018; Doost, 2018; Karthik, 2018). Além disso, a nanoemulsão apresentou potencial zeta (PZ) igual a -30 mV, o que favorece a sua estabilidade devido à força de repulsão entre as cargas de superfície juntamente com a energia cinética conferida pelo movimento Browniano.

Estas características coloidais mostram que a nanoemulsão utilizada neste estudo pode permanecer cineticamente estável ao longo do tempo (Rai, 2018; Doost, 2018). O fato de a AICIFt estar dispersa na nanoemulsão a torna mais propícia a ser utilizada *in vivo*, pois em meios fisiológicos, a ftalocianina,

devido à sua natureza hidrofóbica, tende a agregar-se, se autoextinguindo (self-quenching) e, perdendo assim a atividade fotodinâmica (Asem, 2016). Ressalta-se que a AICIFt dispersa na nanoemulsão mantém o perfil espectral de absorvância e de emissão de fluorescência além da capacidade de induzir produção de radicais de livres (dados do grupo).

Já o Selol utilizado em nanocápsulas, apresenta algumas vantagens, tais como: alto teor de substâncias lipofílicas devido ao núcleo oleoso, o que confere proteção a fármacos instáveis, além de alta capacidade de carregá-los, liberação modificada, proteção maior contra a fotodegradação e, principalmente, maior interação com células e tecidos alvo (Ferreira, 2018).

As nanocápsulas com o Selol (NcSe) apresentaram DH de 257 nm, o que segundo Ferreira e colaboradores, 2018 (Ferreira, 2018) é compatível com o DH de nanoestruturas que contêm compostos com selênio orgânico. O IPD que considera o tamanho das nanopartículas, o índice de refração do solvente, o ângulo de medição e a variância da distribuição do tamanho das nanopartículas mostrou-se igual a 0,1, o que mostra que a população de nanocápsulas é monodispersa com distribuição unimodal (Ferreira, 2018).

Essa estreita distribuição de tamanho e baixo PDI, auxilia na prevenção do efeito chamado “maturação de Ostwald”, já citado anteriormente. O potencial zeta mostrou ser igual a -60 mV, provavelmente, devido aos grupos carboxilas do polímero PVM/MA (Guhagarkar, 2011), sendo que valores acima de 30 mV em módulo favorecem a estabilidade das partículas (Kumar, 2018). Este parâmetro refere-se ao potencial eletrocinético de sistemas coloidais, ou seja, é um valor associado à magnitude da carga de superfície das nanopartículas e o líquido dispersante (Honary, 2013). Esta carga superficial é

responsável pela estabilidade das nanocápsulas ao longo do período analisado, pelos mesmos motivos supracitados, movimento browniano e força de repulsão. O potencial zeta negativo favorece a endocitose pelas células devido à interação eletrostática entre a carga negativa e os sítios positivos existentes na membrana celular (Honary, 2013). Também é possível que ocorra interação dos grupamentos carboxilas das nanocápsulas com moléculas polares da superfície celular através de ligações por ponte de hidrogênio (Krassimira, 2005).

Tanto a NE-AICIFt como a NcSe apresentaram morfologia esférica e monodispersividade. Essa uniformidade é importante pois assim, não haverá gotículas de tamanhos muito distantes da média, não havendo tendência a coalescência e conseqüente obstrução do fluxo sanguíneo, caso seja escolhida administração endovenosa (Gutiérrez *et alli*, 2008; Rossetti *et alli*, 2011). Uma vez determinadas as características coloidais e morfológicas das NcSe e da NE-AIFtCI realizaram-se estudos *in vitro* para avaliar a eficácia da TFD mediada pela NE-AIFtCI na redução da viabilidade de células sensibilizadas pelo Selol. Para tal, considerou-se o fato de que o câncer é uma doença de tecidos complexos, denominados de tumores, no qual células neoplásicas estão em constante comunicação com células não neoplásicas, muitas delas inclusive auxiliando na proliferação de células neoplásicas e na sobrevivência da massa tumoral (Elenbaas & Weinberg, 2001).

Além disso, considerou-se o fato de que um fármaco ideal não deve ser tóxico e/ou genotóxico sobre as células dos tecidos não tumorais do organismo. Por isso, neste estudo escolheu-se como modelo uma linhagem não tumoral, NIH-3T3 e uma linhagem tumoral, células 4T1.

A escolha da linhagem celular NIH-3T3 deve-se ao fato de essa linhagem ser constituída de fibroblastos não tumorais. Já a escolha da linhagem celular 4T1 deve-se, principalmente ao fato de as células dessa linhagem terem sido isoladas de um tumor de mama murino equivalentes a tumor humano em estágio IV, triplo negativo (expressão negativa dos receptores de estrogênio, de progesterona e do receptor do fator de crescimento epidermal humano-2 (HER2)). Esse tipo de câncer de mama está associado a um mau prognóstico e a opções limitadas de tratamento (Heimes, 2018), apresentando maior propensão a recorrências e à alta taxa de mortalidade (Burnett, 2017; Zhang, 2018). Na perspectiva dos ensaios *in vivo* essas células seriam ideais para a indução dos tumores de mama, mesmo que as células que formam linhagens de células cancerosas se desenvolvam sem interações heterotípicas e desviem do comportamento de células de tumores humanos (Weimberg p.585). Definidas as linhagens celulares procederam-se ensaios para verificar se as NcSe e a NE-AIFtCl seriam citotóxicas e em que concentração elas poderiam ser utilizadas na TFD.

As NcSe reduziram somente a viabilidade das células tumorais e mesmo assim, somente quando a concentração do Selol era igual a 400 µg/mL. Essa sensibilidade maior das células tumorais ao Selol deve ocorrer, provavelmente, por elas apresentarem sistemas de reparo do DNA deficientes e conseqüentemente maior instabilidade genômica, o que as torna mais suscetíveis ao estresse oxidativo induzido pelo Selol produzido quando em altas doses (Fernandes, 2005; Suchocki, 2010; Gandin, 2018).

Vale ressaltar que após 72 horas, nas menores concentrações, o Selol induziu proliferação das células das duas linhagens. Provavelmente, a

quantidade de ERO induzida pelo Selol não foi suficiente para provocar morte celular, mas suficiente para atuar como segundo mensageiro em vias de sinalização celular que inibem a apoptose e induzem a proliferação celular. Isso acontece, porque as ERO ativam proteínas cinases que fosforilam as proteínas JNK e p38 (Kim, 2008). A proteína JNK fosforilada ativa as moléculas FOS e JUN, possibilitando que elas dimerizem formando o fator de transcrição AP-1, que por sua vez ativa a transcrição de genes indutores da proliferação celular. Já a proteína p38 fosforilada pode ativar a molécula NF- $\kappa$ B, um fator de transcrição que induz a expressão da proteína Bcl-2 e de proteínas inibidoras de caspases, inibindo assim, a apoptose (Kim, 2008). Além disso, a molécula NF- $\kappa$ B, também induz a expressão de ciclina D e da proteína Myc, proteínas envolvidas na progressão do ciclo celular (Weimberg R, 2ªed.).

Com relação à AICIFt os resultados também se mostram interessantes, pois quando não irradiada ela mostrou-se inócua, mas quando irradiada, nas mesmas concentrações, foi capaz de induzir redução da viabilidade celular nas duas linhagens, redução essa que se mostrou proporcional ao aumento da concentração de AICIFt. Esses dados mostram que a AICIFt tem os requisitos de um fotossensibilizante ideal, uma vez que apresenta citotoxicidade apenas na presença de luz (Bechet *et alli*, 2008).

Com base nos resultados obtidos na etapa anterior, decidiu-se sensibilizar células das duas linhagens com Selol nas concentrações de 200  $\mu$ g/mL e 400  $\mu$ g/mL e depois de 24 horas submeter-lhes a TFD utilizando a nanoemulsão em diferentes concentrações de AICIFt. Os resultados mostram que nas duas linhagens celulares, a sensibilização previa das células com Selol (200  $\mu$ g/mL ou 400  $\mu$ g/mL) potencializou o efeito da TFD somente quando a

AICIFt foi utilizada nas menores concentrações (2,9 nM e 3.9 nM); quando se utilizou a AICIFt nas maiores concentrações (7,8 nM e 15.6 nM) esse efeito não ocorreu. Segundo Sochacka e colaboradores em 2014 (Sochacka *et alli*,2014), a associação de Selênio, fármacos e radiação aumenta a efetividade do tratamento antineoplásico. Esses autores postulam que nesse caso, o selênio liberado pelo Selol agiria como pró-oxidante e não como antioxidante (Liu, 2011), o que potencializa o efeito dos fármacos.

Em 2007, Suchocki e colaboradores (Suchocki *et alli*, 2007) mostraram que o Selol torna as células leucêmicas mais sensíveis a citotoxicidade induzida pela Vincristina e Doxorrubicina, sugerindo que o Selol poderia ser usado em combinação com outras drogas quimioterápicas. Considerando os dados deste estudo é plausível acreditar que a sensibilização com o Selol permite ainda que sejam utilizadas menores concentrações do fármaco.

Outro dado interessante deste ensaio foi que o Selol tornou as células tumorais mais sensíveis à radiação emitida pelo LED do que as células não tumorais. Convém lembrar que, para satisfazer as suas demandas energéticas, as células neoplásicas, ao contrário das células normais, oxidam a glicose utilizando a glicólise em vez da fosforilação oxidativa mitocondrial, produzindo ATP em velocidade 100 vezes mais rápida do que a fosforilação oxidativa (Fernandes, 2015).

A etapa seguinte deste estudo consistiu em avaliar quais alterações a TFD promoveu nas células sensibilizadas com Selol que as levariam à morte. Para tal, realizaram-se ensaios que permitiram quantificar as alterações do potencial de membranas mitocondriais, a taxa de fragmentação do DNA e a dinâmica do ciclo celular. Nesta etapa utilizou-se como modelo experimental

somente a linhagem celular 4T1, pois como mencionado anteriormente foram as células dessa linhagem que se mostraram mais sensíveis ao tratamento e não as células não neoplásicas.

O ensaio para verificação do potencial de membrana mitocondrial mostrou que somente as mitocôndrias das células sensibilizadas com Selol 200 µg/mL e tratadas com AICIFt sem irradiação apresentaram alteração no potencial elétrico, mais especificamente despolarização. Segundo Fernandes e colaboradores, em 2015, o tratamento com Selenito promove alteração do potencial de membrana mitocondrial em diferentes linhagens neoplásicas (Fernandes, 2015). O fato de que somente as células sensibilizadas com Selol 200 µg/mL e tratadas com AICIFt sem irradiação tenham mostrado despolarização das membranas mitocondriais, sugere que o mecanismo de morte induzido pela TFD com NE-AICIFt em células da linhagem 4T1 sensibilizadas ou não com Selol não tenha ocorrido por apoptose e, portanto, outras organelas e não as mitocôndrias possam estar envolvidas no processo de morte celular. Isso não é surpreendente, pois uma das principais características das células neoplásicas é a capacidade de evadir da apoptose intrínseca, aquela disparada pela proteína p53, só assim elas sobrevivem e formam tumores. Com base nisso pode-se inferir que a redução na população de células 4T1 observada neste estudo possa ter ocorrido, entre outros, devido à intensa fragmentação inespecífica do DNA.

Assim, determinou-se também a taxa de fragmentação induzida pelos tratamentos. Os resultados mostram que o Selol não induziu fragmentação no DNA e que a TFD sozinha induziu fragmentação em 75,6% do DNA, mas quando ela foi aplicada em células sensibilizadas com Selol 200 µg/mL ou Selol

400 µg/mL essa fragmentação foi somente de 57,1 e 34,7% respectivamente. A intensa fragmentação no DNA induzida pela TFD pode ser consequência da oxidação dessa molécula devido a grande quantidade de radicais de oxigênio presentes na célula em decorrência das reações induzidas pela fotossensibilização da AICIFt e pelos aductos de DNA resultantes da ligação AICIFt-DNA. De acordo com Jayme e colaboradores, 2018, a AICIFt pode interagir com o DNA, uma vez que complexos metálicos pequenos ligam-se ao DNA por meio de interações de Van der Waals e empilhamento  $\pi$  ou ligações de hidrogênio (Jayme, 2018). Considerando que o Selênio apesar de poder funcionar como uma molécula pró-oxidante (Sochacka, 2014), também pode funcionar como um antioxidante, fornecendo proteção contra danos celulares induzidos por espécies reativas de oxigênio (Xiao, 2018), acredita-se que, neste ensaio, o Selol de alguma forma ou dificultou a interação AICIFt-DNA ou tenha ajudado no sequestro de ERO, mas não o suficiente para inibir a fragmentação do DNA.

A intensa fragmentação do DNA induzida pela TFD afetou a dinâmica do ciclo celular, enquanto que as células da maioria dos grupos estavam na fase G1 do ciclo, as células submetidas somente à TFD estavam na fase G2/M. Já está bem estabelecido que danos no DNA promovidos pela radiação bloqueiam o ciclo celular na fase G2/M. (Gogineni, 2011).

As células tratadas com o Selol na concentração de 400 µg/mL, embora não tenham apresentado fragmentação no DNA, estavam também majoritariamente em G2/M. Vários autores já demonstraram que em células neoplásicas o Selol induz parada do ciclo celular na fase de G2/M (Miranda, 2014). Nesse caso, o Selol provavelmente deve induzir danos em moléculas

que não sejam o DNA, tais como proteínas e lipídios. Essa hipótese pode ser reforçada pelo fato de que quando a TFD foi aplicada em células previamente sensibilizadas com o Selol na concentração de 400 µg/mL, as células não ficaram presas em G2/M, mas sim na fase G1, mesmo apresentando taxa de fragmentação do DNA elevada.

No citômetro de fluxo fez-se a análise morfológica das células após os diferentes tratamentos. Essa análise mostrou que, com exceção das células do grupo submetido somente à TFD, nos outros grupos a maioria das células apresentou tamanho e granulosidade semelhantes ao grupo controle. A TFD sozinha induziu redução do tamanho e da granulosidade em 55% das células. Essas alterações sugerem que as células estão em processo de degeneração, muito provavelmente decorrente do estresse oxidativo promovido pela TFD. Esse estresse oxidativo por sua vez, danificou 80% do DNA, o que bloqueou a progressão do ciclo celular na fase G2/M, levando as células à morte.

Considerando que os ensaios de MTT mostraram que nas duas linhagens celulares, a sensibilização previa das células com Selol (200 µg/mL ou 400 µg/mL) potencializou o efeito da TFD somente quando a AIFtCl foi utilizada nas menores concentrações (2,9 nM e 3,9 nM), decidiu-se realizar os ensaios *in vivo* para avaliar se a sensibilização prévia dos tumores potencializaria a eficácia da TFD na erradicação de tumores de mama.

Apesar de uma linhagem celular tumoral ao se propagar extensivamente em um organismo gerar pequenas semelhanças histológicas com os tumores tipicamente encontrados na clínica oncológica, o implante xenográfico de células tumorais humanas em camundongos tem se mostrado um modelo útil para obterem-se informações sobre o processo de tumorigênese. Assim, neste

estudo, utilizou-se a linhagem celular 4T1 como modelo tumoral, pois as células dessa linhagem como citado anteriormente, foram isoladas de um tumor murino de mama equivalente a tumor humano em estágio 4, triplo negativo; um tipo de câncer de mama associado a pior prognóstico e com propensão a recorrências. As massas tumorais foram induzidas em animais idosos e jovens, de modo a averiguar se a idade interferiria nas respostas aos tratamentos. Vale ressaltar que o câncer, por ser uma doença complexa e se desenvolver em múltiplas etapas, podendo levar décadas para se estabelecer, mais comum em pessoas com idade adulta acima dos 55 anos. A primeira aplicação clínica de TFD no câncer de mama foi para tratamento de metástases cutâneas na parede torácica, aplicada em 37 pacientes com carcinoma mamário com recorrência à parede torácica (Banerjee *et alli*, 2017).

Considerando que a inflamação crônica tem papel na patogênese de carcinomas humanos e que os neutrófilos são mediadores críticos da progressão tumoral, neste estudo, a cada semana, durante cinco semanas, mediu-se a enzima Mieloperoxidase, um marcador de acúmulo e ativação de neutrófilos que ocorre no início de um processo inflamatório, pois os neutrófilos são os primeiros leucócitos recrutados quando ocorre alguma injúria tecidual (Tseng, 2012; Guo *et alli*, 2017). Para esse ensaio, utilizou-se uma sonda bioluminescente, o Luminol, um método sensível de imageamento (Liu, 2011), não invasivo (Tseng, 2012). A primeira dosagem foi realizada sete dias após a inoculação das células tumorais, ou seja, antes dos tratamentos e, a enzima foi detectada somente nos tumores.

Na primeira semana os animais idosos mostraram níveis de enzima Mieloperoxidase maiores do que os jovens, como eles ainda não tinham

recebido tratamento algum, infere-se que o nível aumentado dessa enzima nos idosos esteja ligado ao processo de envelhecimento. Em 2008, Salminen e colaboradores relatam que com o advento da idade, a resposta imune adaptativa declina, enquanto que a resposta imune inata induz um perfil pró-inflamatório. Esse quadro de resposta imune associado à idade é conhecido como “*inflamm-aging*” (Salminen, 2008) e, nesse contexto, Lin e colaboradores, 2017, relataram genes relacionados à inflamação estão superexpressos com a idade (Lin, 2017).

Nos animais idosos os tratamentos não interferiram nos níveis de Mieloperoxidase. Já entre os animais jovens, o Selol induziu inicialmente aumento dos níveis da enzima, mas a partir da segunda semana, os níveis normalizaram. O aumento de Mieloperoxidase induzido pelo Selol parece ter sido inibido pela TFD, pois os animais tratados com Selol e depois submetidos à TFD não apresentaram alterações no nível dessa enzima. Como citado anteriormente, o aumento da enzima Mieloperoxidase no tumor é um indicativo da presença de neutrófilos naquele ambiente. Essa enzima e as outras enzimas liberadas pelos neutrófilos podem lesionar as células adjacentes (Cascao *et alli*, 2010), pois elevam os níveis de espécies reativas de oxigênio, ERO, no local, principalmente o oxigênio singlete ( $^1O_2$ ), o que é interessante, pois pode potencializar o efeito da TFD. Entretanto, há que se considerar que a inflamação é uma fator de promoção tumoral, pois além do aumento da Mieloperoxidase e de ERO, os neutrófilos também liberam a citocina TNF- $\alpha$  (Guo, 2017). O TNF- $\alpha$  atua de maneira parácrina nas células que apresentam receptores para ele. Quando isso acontece, ocorre ativação da cinase IKK que por sua vez, fosforila I $\kappa$ B (o inibidor de NF- $\kappa$ B), marcando-o para a destruição.

Desse modo, o NF- $\kappa$ B é liberado e migra do citoplasma para o núcleo, onde induz a transcrição de genes antiapoptóticos e genes indutores da proliferação celular. Assim sendo, a inflamação é um fator de promoção tumoral por meio da ativação da via NF- $\kappa$ B.

De modo a determinar se os diferentes tratamentos seriam tóxicos para os animais, foram realizadas medições do peso corporal e de órgãos como fígado, baço e rim, além de análise histopatológica desses órgãos e dos pulmões. Como parâmetros de hepatotoxicidade e de nefrotoxicidade também foram realizados exames hematológicos. Os resultados mostram que antes dos tratamentos, os animais idosos e os jovens apresentaram peso corporal similar, que não foi afetado pela presença dos tumores e nem pelos tratamentos. Outros trabalhos do grupo já tinham mostrado que tanto a TFD quanto o Selol não afetam o peso do animal (Souza, 2014). Com relação ao peso dos órgãos, a presença do tumor, tanto nos idosos quanto nos jovens, induziu a hepatoesplenomegalia. A literatura mostra que o modelo tumoral 4T1 induz a hematopoese no fígado e no baço (Tao, 2008; Jackson, 2017; Ravindranathan, 2018), o que pode explicar a hepatoesplenomegalia observada nos animais com tumor neste estudo.

Interessantemente, o tratamento com Selol quando aplicado sozinho promoveu a regressão do tamanho desses órgãos, tanto nos animais idosos quanto nos jovens. Entretanto, quando o Selol foi associado à TFD promoveu nos animais idosos somente regressão do fígado e nos jovens somente a regressão do baço. Essa regressão do tamanho do fígado e do baço induzida pelo Selol pode ser devido à regressão dos tumores, o que será discutido mais adiante.

Como indicador de hepatotoxicidade foram também dosados os níveis séricos das enzimas Fosfatase alcalina (FAL), a Alanina aminotransferase (ALT) e a Aspartato aminotransferase (AST) e como indicador de nefrotoxicidade dosou-se o nível de Creatinina e Ureia. O tumor induziu aumento somente da enzima Aspartato aminotransferase (AST) apenas nos animais jovens; já nos idosos quem aumentou a AST foi o tratamento com o Selol. Neles o Selol associado à TFD baixou os níveis dessa enzima. Esse aumento nos níveis da AST dos animais jovens induzido pelo Selol poderia ser um indicativo de lesão hepática, mas a relação ALT/AST nos diferentes grupos foi sempre menor que 1, e, somente é indicativo de lesão hepática quando essa relação for maior que 1 (Zamin, 2002; Hyder, 2013) Os resultados mostraram também que tanto o tumor quanto os tratamentos não induziram nefrotoxicidade.

Com relação aos exames hematológicos, nos animais idosos o tumor induziu redução dos níveis de plaquetas, mas os tratamentos os normalizaram. A diminuição de plaquetas nos animais idosos com tumor pode estar relacionada à esplenomegalia observada neles, pois em um baço aumentado pode ocorrer eliminação de plaquetas ainda saudáveis, enquanto que em um baço normal ocorre a eliminação somente de plaquetas envelhecidas. Em 1971, Harker mostra que em um baço aumentado, a retenção de plaquetas é muito maior do que em um baço normal, diminuindo o número de plaquetas circulantes (Harker, 1971). Ressalta-se que neste estudo, os animais jovens com tumor (G8) também apresentaram esplenomegalia, mas não aumento de plaquetas circulantes.

Os animais idosos com tumor, tratado ou não, também mostraram aumento na contagem total de leucócitos circulantes, mas precisamente aumento de células mielóides (W-MCR e W-MCC), mas diminuição de linfócitos. O aumento de células mielóides e a diminuição de linfócitos circulantes podem estar relacionados à hematopoese em regiões extramedular (Tao, 2008; Gabrilovich, 2017; Kiss, 2018). Embora após o nascimento, a medula óssea seja a única responsável pela produção de células hematopoiéticas, em casos de câncer pode ocorrer expansão de tecido hematopoiético para regiões extramedulares, como baço e fígado, o que pode levar a aumento desses órgãos (Delsol *et alli* 1979; Conor O'keane *et alli*, 1989; Tao *et alli*, 2008).

Como discutido anteriormente neste estudo os animais idosos apresentaram hepatoesplenomegalia, alteração que pode estar relacionada à hematopoese. Ressalta-se que a hematopoese extramedular gera uma população heterogênea de células mielóides imaturas (Ravindranathan, 2018). Em condições fisiológicas normais, essas células mielóides imaturas, em resposta a moléculas de sinalização, diferenciam-se em macrófagos, células dendríticas, eosinófilos, neutrófilos e basófilos. Porém em casos de câncer, elas não se diferenciam, pelo contrário, proliferam, sofrendo expansão clonal (Gabrilovich, 2017), o que pode levar a aumento do fígado e do baço, órgãos onde elas se acumulam. As células mielóides imaturas geradas em regiões extramedulares tem ação imunossupressora sobre a atividade de linfócitos T CD8+ e células matadoras naturais, células NK, induzem a diferenciação de linfócitos TCD4<sup>+</sup> naives em linfócitos T reguladores, o que pode estar associado á diminuição de linfócitos observada nesses animais. As células

mielóides imaturas também interferem na diferenciação de macrófagos, induzem a diferenciação de monócitos em macrófagos M2 e não M1, Lembrando que macrófagos M1, devido a sua grande atividade citotóxica, agem preponderantemente contra agentes patogênicos intracelulares e células cancerígenas, enquanto que os macrófagos M2, por promover a remoção de resíduos, têm papel importante no estabelecimento da inflamação e, conseqüentemente, na promoção do crescimento de tumores e o desenvolvimento de metástases. Assim, as células mielóides imaturas tem papel proeminente no desenvolvimento do câncer e na angiogênese tumoral (Gabrilovich, 2017).

Entre os animais jovens somente os animais do grupo G12 (tratados com Selol e submetidos à TFD) não mostraram aumento de células mielóides (W-MCR e W-MCC) nem diminuição de linfócitos circulantes, apesar de terem apresentado hepatomegalia. Assim, o aumento de células mielóides e a diminuição de linfócitos circulantes observados nos outros grupos estejam mais relacionados à esplenomegalia do que à hepatomegalia.

A possível toxicidade dos tratamentos também foi avaliada por meio da análise histopatológica dos baços, rins, pulmões e fígados. Esse tipo de análise não mostrou alteração na estrutura dos pulmões, dos rins, nem dos baços dos animais tanto idosos quanto jovens, submetidos aos diferentes tratamentos.

Já nos fígados, apesar de não apresentarem alterações estruturais, os trinta animais idosos (100%), com tumor ou não, apresentaram esteatose hepática, enquanto que somente três dos animais jovens (30%) apresentaram esse distúrbio. A esteatose hepática caracteriza-se pelo acúmulo de lipídios no fígado. É considerada reversível embora seja um fator de risco para o

aparecimento de outras patologias hepáticas. Com o envelhecimento, a esteatose hepática pode desenvolver-se devido a alterações fisiológicas nos mecanismos de degradação lipídica. Segundo Ogradnik, 2017, a incidência de esteatose hepática aumenta com a idade, devido, principalmente, ao aumento de células senescentes com dificuldade de metabolizar lipídeos, o que provoca acúmulo de gordura no fígado. Esses autores mostraram correlação entre o acúmulo de gordura e a idade. De modo a determinar se a sensibilização com Selol potencializaria os efeitos da Terapia Fotodinâmica na erradicação de câncer de mama, os tumores foram mensurados e realizou-se a análise histopatológica dos mesmos bem como dos linfonodos sentinelas.

A determinação do volume tumoral foi um dos parâmetros utilizados para determinar se o Selol potencializaria o efeito da Terapia Fotodinâmica. Os resultados mostraram que o volume dos tumores não foi afetado pela idade, uma vez que os animais idosos e jovens sem tratamento apresentaram tumores com volume médio aproximadamente em torno de 500 mm<sup>3</sup>.

Tanto nos animais idosos quanto nos jovens, os tratamentos mais efetivos foram os que utilizaram o Selol, sendo que nos animais jovens tratados somente com o Selol a redução foi em torno de 90%.

O tratamento que envolveu somente a TFD foi o que se mostrou menos efetivo, sendo que nos animais jovens não ocorreu redução dos tumores, ao contrário, houve aumento e nos idosos a redução foi de 28%. Um fator que pode ter sido determinante na baixa efetividade da TFD foi o intervalo de tempo entre as sessões, pois um dos efeitos da TFD aos tecidos tumorais é a hipóxia. Como a TFD utiliza um fotossensibilizante, a luz e o oxigênio, provavelmente 24 horas não foi tempo suficiente para que ocorresse reoxigenação do tecido.

Em 2013, Bicalho e colaboradores mostraram remissão total de tumores de língua somente quando a TFD foi aplicada em intervalos de 72 h.

Mesmo com intervalos pequenos entre as sessões, quando a TFD foi aplicada em tumores sensibilizados com Selol, a redução tumoral foi mais expressiva, sendo em torno de 50% nos idosos e de 70% nos jovens. Neste caso, apesar de a sessão anterior de TFD ter consumido muito oxigênio, o Selol administrado a cada nova sessão deve ter funcionado como fonte adicional de ERO. Segundo Sochacka *et alli* 2014, Selênio no estado de oxidação +4, presente no Selol, é uma molécula pró-oxidante que induz estresse oxidativo que levam as células à morte. Em estudo *in vivo* realizado com câncer de próstata, Flis *et alli*, 2015 mostrou que o Selol diminuiu em 2x a concentração de glutathiona reduzida intracelular e aumentou em 6x a concentração de glutathiona oxidada nos tumores, aumentando na célula o estado redox em 48 mV. Sabe-se que o ambiente intracelular ao atingir o estado redox de 170 mV, direciona o metabolismo da célula para a apoptose. Nesse estudo, os autores mostram que o Selol reduziu a massa dos tumores em aproximadamente 17% (Flis, 2015).

A manifestação mais perigosa do processo de câncer são as células neoplásicas migratórias, quando elas têm sucesso em fundar colônias em locais distantes causam grandes destruições. Por exemplo, apesar de os carcinomas mamários primários não comprometerem a sobrevivência do paciente, pois mesmo após a mastectomia as funções fisiológicas vitais são mantidas. Entretanto, as células metastáticas de câncer de mama quando colonizam ossos podem causar erosão no tecido, resultando em colapso do

esqueleto (Weimberg, 2<sup>a</sup> Ed.). Por tudo isso, neste estudo também se analisou os linfonodos sentinelas.

Todos os animais idosos ou jovens com tumores sem tratamento apresentaram metástases nos linfonodos sentinelas. Mas entre os grupos tratados, 36% dos animais idosos e 24% dos jovens apresentaram metástase no linfonodo sentinela. Ressalta-se que nenhum dos animais jovens tratados com Selol apresentou metástase. A redução da taxa de metástase induzida pelo Selol pode ser devido a maior efetividade do sistema imunitário. Segundo Fernandes et alli, o Selol mostrou aumento da atividade das células NK e dos linfócitos T (Fernandes *et alli*, 2015). Considerando que a metástase é responsável por cerca de 90% da mortalidade por câncer de mama, e que o tumor de mama humano triplo negativo apresenta propensão a recorrências, a inibição/redução na taxa de metástase induzida pelo Selol é um dado interessante.

Em alguns animais o Selol não só reduziu a massa tumoral, como induziu remissão dos tumores em três animais; um desses animais foi tratado somente com Selol e dois foram tratados com Selol e AICIFt.

Diante do exposto acima, é plausível acreditar que se o intervalo entre as sessões fosse maior, 72 horas, por exemplo, a TFD aplicada em tumores sensibilizados com Selol seria mais eficaz na remissão dos tumores. Talvez, mais sessões, com intervalos maiores entre elas, poderiam ter apresentado resultados terapêuticos mais eficazes, considerando todas as propriedades biológicas antineoplásicas favoráveis do Selol e da Terapia Fotodinâmica.

Novos ensaios devem ser realizados de modo a investigar os resultados terapêuticos dessa nanoformulações quando administradas por via

endovenosa. Além da sua biodisponibilidade e a interação com o sistema fagocitário para que se possa considerar a translação para a clínica médica.

## **7. CONCLUSÕES**

O conjunto dos resultados obtidos neste estudo sugere que:

1. As formulações NcSe e NE-AICIFt apresentaram características coloidais favoráveis à aplicação biológica e mostraram-se estáveis ao longo de 360 dias.
2. O Selol potencializou o efeito da Terapia Fotodinâmica, pois induziu diminuição da concentração mínima necessária do fotossensibilizante AICIFt para reduzir a viabilidade das células das linhagens 4T1 e NIH/3T3.
3. O Selol não induziu fragmentação do DNA e reduziu a fragmentação promovida pela Terapia Fotodinâmica nas células 4T1.
4. O Selol na concentração de 400 µg/mL e a Terapia Fotodinâmica induziram a parada do ciclo celular na fase G2/M em células 4T1 e em NIH/3T3.
5. O processo inflamatório nos tumores foi maior nos animais idosos do que nos animais jovens, sendo que nos animais idosos o Selol induziu aumento do estado inflamatório no início do tratamento.
6. O modelo tumoral 4T1 induziu hepatoesplenomegalia e aumento de células da linhagem mielóide nos animais idosos e jovens.
7. Nos animais jovens o Selol reduziu a esplenomegalia induzida pelo modelo tumoral 4T1.
8. O Selol e a Terapia Fotodinâmica não induziram toxicidade sistêmica.
9. O Selol, dependente da concentração, não só reduziu a massa tumoral e/ou retardou a velocidade de crescimento dos tumores, como também erradicou tumores em 20% dos animais jovens.

## **8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- AMERICAN CANCER SOCIETY. Breast Câncer Facts & Figures 2015-2016. Atlanta: American Cancer Society, Inc.2015.
- AMERICAN CANCER SOCIETY. Breast Cancer Facts & Figures. 2017-2018. Atlanta: American Cancer Society, Inc. 2017.
- ARSENYAN, P.et al. Selenium analogues of raloxifene as promising antiproliferative agents in treatment of breast cancer. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 87, 471- 483, 2014.
- ASEM, H..et al. Development and biodistribution of a theranostic aluminum of phthalocyanine nanophotosensitizer. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*.13, 48–57, 2016
- AZMAN, S. GLOBOCAN 2018: Carga Global do Câncer. Disponível em:<<https://www.onconews.com.br/site/noticias/noticias/ultimas/3620-globocan-2018-carga-global-do-c%C3%A2ncer.html>> acesso em: 11 de dezembro de 2018.
- BANERJEE, S .M. et al. Photodynamic therapy: Inception to application in breast cancer. *The Breast* 31 (2017) 105-113.
- BARROS, A.C.S.D.; BARBOSA, E.M., GEBRIM, L.H.; et al. Diagnóstico e Tratamento do Câncer de Mama. Projeto Diretrizes, Associação Médica Brasileira e Conselho Federal de Medicina. 2001.
- BATISTON A.P., SANTIAGO, S.M. *Fisioterapia e Pesquisa* 12 (3) 30-5, 2005.
- BECHET D. et al. Nanoparticles as vehicles for delivery of photodynamic therapy agents.*Cell Press. Trends in Biotechnology* Vol.26 No.11 2008.
- BICALHO L.S. et al. Photodynamic therapy leads to complete remission of tongue tumors and inhibits metastases to regional lymph nodes. *J Biomed Nanotechnol*. 9(5):811-8, 2013.
- BUITRAGO F. et al. Prognostic factors in breast cancer. *Com. Ciências Saúde* - 22 Sup 1:S69-S82, 2011.

- BURNETT, J. et al. Sulforaphane enhances the anticancer activity of taxanes against triple negative breast cancer by killing cancer stem cells. *Cancer Letters*. 394, 52-64, (2017).
- CASCAO, R. et al. Neutrophils in rheumatoid arthritis: More than simple final effectors. *Autoimmun Rev*. 9(8):531-5, 2010.
- CELLI, J. P. et al. Imaging and photodynamic therapy: mechanisms, monitoring and optimization. *Chemical Reviews*. v. 110, 2795 -2838, 2010.
- CONOR O'KEANE, J. et al. The pathogenesis of splenic extramedullary hematopoiesis in metastatic carcinoma. *Cancer*. Volume63, Issue8 15 April 1989 Pages 1539-1543.
- CHAN, H. J.; PETROSSIAN, K; CHEN, S. Structural and Functional Characterization of Aromatase, Estrogen Receptor, and Their Genes in Endocrine-Responsive and – Resistant Breast Cancer Cells. *Journal Steroid Biochem Mol Biol*. 161:73-83, 2016.
- CHEN, Q. et al. Protein modified upconversion nanoparticles for imaging-guided combined photothermal and photodynamic therapy. *Biomaterials*. 35, 2915 – 2923, 2014
- CONDEL, D. M. et al. Qualidade de vida de mulheres com câncer de mama. *Rev Bras Ginecol Obstet.*, 28(3): 195-204, 2006.
- CRUZ, E.H.G. et al. Synthesis and antitumor activity of selenium-containing quinone-based triazoles possessing two redox centres, and their mechanistic insights. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 122, 1-16, 2016.
- DELSOL, G. et al. Leukoerythroblastosis and cancer frequency, prognosis, and physiopathologic significance. *Cancer* Volume44, Issue3 September 1979 Pages 1009-1013.

- DIVSALAR, A. et al. Characterization and side effect analysis of a newly designed nanoemulsion targeting human serum albumin for drug delivery. *Colloids and Surfaces B:Biointerfaces*. 98, 80–84, 2012.
- DOOST, A.S.et al. Influence of non-ionic emulsifier type on the stability of cinnamaldehyde nanoemulsions: A comparison of polysorbate 80 and hydrophobically modified inulin. *Food Chemistry*. 258, 237–244, 2018.
- ELENBAAS B, Weinberg RA. Heterotypic Signaling between Epithelial Tumor Cells and Fibroblasts in Carcinoma Formation. *Experimental Cell Research* .Volume 264, Issue 1, 10 March 2001, Pages 169-184
- ESTIMATIVA 2016. Incidência do câncer no Brasil. Ministério da Saúde Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva.
- ESTIMATIVA 2018. Incidência do câncer no Brasil. Ministério da Saúde Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Estimativa câncer INCA 2018-2019.
- EQUIPE ONCOGUIA. Tipos de Câncer de Mama. Disponível em: <<http://www.oncoguia.org.br/conteudo/tipos-de-cancer-de-mama/1382/34/>> acesso em: 11 de dezembro de 2018.
- FAN, Z. et al. Theranostic nanomedicine for cancer detection and treatment. *Journal of Food and Drug Analysis*. 22, 3-17, 2014.
- FERNANDES,A.P.; GANDIM,V. Selenium compounds as therapeutic agents in cancer. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1850, 1642– 1660, 2015.
- FERREIRA, L.M et al. Diphenyl diselenide loaded poly ( $\epsilon$ -caprolactone) nanocapsules with selective antimelanoma activity: Development and cytotoxic evaluation. *Materials Science & Engineering C*. 91, 1–9, 2018.
- FLIS, A. et al. Selenitetriglycerides-Redox active agents. *Pharmacological Reports*. 67, 1–8, 2015.

- GABRILOVICH DI et al. Myeloid-derived suppressor cells. *Cancer Immunol Res.* 2017; 5(1): 3–8.
- GANDIN,V. et al. Organic selenium compounds as potential chemotherapeutic agents for improved cancer treatment. *Free Radical Biology and Medicine.* 127, 80–97, 2018.
- GAO, Y. et al. Nanotechnology-based intelligent drug design for cancer metastasis treatment. *Biotechnology Advances* 32, 761–777, 2014
- GOGINENI VR et al. Chk-2mediated G2/M Dell cycle arrest maintains radiation resistance in Malignant meningioma cell. *Cancer Letters Volume* 313, Issue 1, 2011, Pages 64-75
- GOTO, P.L. et al. Application of aluminum chloride phthalocyanine-loaded solid lipid nanoparticles for photodynamic inactivation of melanoma cells. *International Journal of Pharmaceutics.* 518, 228 – 241, 2017.
- GUHAGARKAR, S. A. et al. Evaluation of pullulan-functionalized doxorubicin nanoparticles for asialoglycoprotein receptor-mediated uptake in Hep G2 cell line. *Cancer Nanotechnology.* 2(1-6), 49–55, 2011.
- GUO, J. et al. A myeloperoxidase responsive and biodegradable luminescent material for real-time imaging of inflammatory diseases. *Materials Today.* v.20, 9, 2017.
- GUTIÉRREZ, J.M. et al. Nano-emulsions: New applications and optimization of their preparation. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, v. 13, p. 245 – 251, 2008
- HAMAD S. Troyer Luminol-based bioluminescence imaging of mouse mammary tumors. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology.* 127, 223–228, 2013.
- HANAHAN, D.; Weinberg, R.A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*, V 144, Issue 5, P 646-674, 2011.

- HARKER, L.A. et al. The role of the spleen in thrombokinetics. translational research. The journal of laboratory and clinical medicine. v. 77, 2, 247–253, 1971.
- HEIMES AS, SCHMIDT M. Atezolizumab for the treatment of triple-negative breast cancer. Expert Opin Investig Drugs. 26, 2018. doi: 10.1080/13543784.2019.1552255.
- HONARY, S & ZAHIR, F. Effect of Zeta Potential on the Properties of Nano - Drug Delivery Systems - A Review (Part 2). Tropical Journal of Pharmaceutic al Research. 12(2), 265 – 273, 2013.
- HUANG, Y.et al. Selective cellular uptake and induction of apoptosis of cancer-targeted selenium nanoparticles. Biomaterials. 34, 7106 – 7116, 2013.
- HU,Y. et al. Synergistic Integration of Layer-by-Layer Assembly of Photosensitizer and Gold Nanorings for Enhanced Photodynamic Therapy in the Near Infrared. ACS Nano. 30, n 20, 2015.
- HYDER MA. Comparative Levels of ALT, AST, ALP and GGT in Liver associated Diseases. European Journal of Experimental Biology, 2013, 3(2):280-284;
- JACKSON W et al. Role of Megakaryocytes in Breast Cancer Metastasis to Bone. Cancer Res. 77(8):1942-1954, 2017.
- JAYME, C.C. et al. Evaluation of aluminum phthalocyanine chloride and DNA interactions for the design of an advanced drug delivery system in photodynamic therapy. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy 201, 242–248, 2018.
- KARTHIK, P. et al. Droplet coalescence as a potential marker for physicochemical fate of nanoemulsions during in-vitro small intestine digestion. Colloids and Surfaces A. 553, 278–287, 2018.

- KIM, H. et al. Id-1 regulates Bcl-2 and Bax expression through p53 and NF- $\kappa$ B in MCF-7 breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat.* v. 112, 2, 287–296, 2008.
- KISS M. Myeloid cell heterogeneity in cancer: not a single cell alike. *Cellular Immunology* 330 (2018) 188–201
- KRASSIMIRA, Y. et al. Pegylated nanoparticles based on poly(methyl vinyl ether-co-maleic anhydride):preparation and evaluation of their bioadhesive properties. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 24, 2005, 411-419.
- KUMAR, N.; Mandal A. Thermodynamic and physicochemical properties evaluation for formation and characterization of oil-in-water nanoemulsion. *Journal of Molecular Liquids* 266 (2018) 147 –159
- LI.Q. et al. The effects of Ce6-mediated sono-photodynamic therapy on cell migration, apoptosis and autophagy in mouse mammary 4T1 cell line. *Ultrasonics*. 54, 981–989, 2014.
- LI, Y. et al. A new bioerodible system for sustained local drug delivery based on hydrolytically activated in situ macromolecular association. *International Journal of Pharmaceutics* 383, 45–52, 2010.
- LIM, C.K. et al. Nanophotosensitizers toward advanced photodynamic therapy of Cancer. *Cancer Letters*. 334, 176–187, 2013.
- LIN H. et al. Transcriptome-wide association study of inflammatory biologic age. *Aging*. 9 (11): 2288-2301, 2017.
- LIU,W.F. et al. Real-time in vivo detection of biomaterial induced reactive oxygen species. *Biomaterials*. 32, 1796-1801, 2011.
- LUO, H. et al. Selenium nanoparticles inhibit the growth of HeLa and MDA-MB-231 cells through induction of S phase arrest. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 94, 304 – 308, 2012.

- MACHADO, S.M.; SAWADA, N.O. Avaliação da qualidade de vida de pacientes oncológicos em tratamento quimioterápico adjuvante. *Texto contexto Enferm*, 17 (4): 750-7, 2008.
- MARKMAN, J.L. et al. Nanomedicine therapeutic approaches to overcome cancer drug resistance. *Advanced Drug Delivery Reviews* 65, 1866 – 1879, 2013.
- MARRACHE S et al. Immune stimulating photoactive hybrid nanoparticles for metastatic breast cancer. *Integr. B iol.*, 2013, 5, 215—223
- MASTER, A. et al. Photodynamic nanomedicine in the treatment of solid tumors: Perspectives and challenges. *Journal of Controlled Release*. 168, 88– 102, 2013
- MATSUZAKI, W.S. et al. Use of the chemosensitivity test to choose appropriate adjuvant chemotherapy for advanced gastric cancer. *Rev. Col. Bras. Cir.* v. 33, n. 4, 2006.
- MIRANDA, J.X. et al. Effects of selenium compounds on proliferation and epigenetic marks of breast cancer cells. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*. 28, 486–491, 2014.
- MORA-HUERTAS, C.E. Polymer-based nanocapsules for drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*. 385, 113–142, 2010.
- MOSEROVA, I.; KRALOVA, J. Role of ER Stress Response in Photodynamic Therapy: ROS Generated in Different Subcellular Compartments Trigger Diverse Cell Death Pathways. *Plus One*. v. 7; n. 3, 2012.
- OGRODNIK, et al, Cellular senescence drives age-dependent hepatic steatosis. *Nature Communications*. v.8, 15691, 2017.
- PARVEEN, S. et al. Nanoparticles: a boon to drug delivery, therapeutics, diagnostics and imaging. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*. 8 147– 166, 2012

- PASZKO, E. et al. Nanodrug applications in photodynamic therapy. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. 8, 14 – 29, 2011.
- PAVON, L.F. Applications of nanobiotechnology in cancer. *Einstein*. (1): 74-77, 2007
- PLAETZER, K., et al. Photophysics and photochemistry of photodynamic therapy: fundamental aspects. *Journal of Lasers in Medical Sciences*, v.24, p. 259 – 268, 2009.
- PIECZYNSKA, J. The role of selenium in human conception and pregnancy. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*. 29, 31–38, 2015.
- RAI, V.K. et al. Nanoemulsion as pharmaceutical carrier for dermal and transdermal drug delivery: Formulation development, stability issues, basic considerations and applications. *Journal of Controlled Release*. 270, 203–225, 2018.
- RAJESH S, James W. Lillard Jr. Nanoparticle-based targeted drug delivery. *Experimental and Molecular Pathology* 86 (2009) 215 – 223
- RAVINDRANATHAN S. Tumor-derived granulocyte colony-stimulating factor diminishes efficacy of breast tumor cell vaccines. *Breast Cancer Res*. 20 (1):126, 2018.
- REZENDE MC et al. Post-chemotherapy rheumatism: an immunological tolerance dysfunction. *Rev. Bras. Reumatol*. vol.45 no.1 São Paulo Jan./Feb. 2005
- ROBERTSON, C.A. et al. Photodynamic therapy (PDT): A short review on cellular mechanisms and cancer research applications for PDT. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 96, 1–8, 2009.
- RODRIGUEZ, L. et al. Incorporation of PVMMA to PLGA MS enhances lectin grafting and theirin vitro activity in macrophages. *International Journal of Pharmaceutics*. 402, 165–174, 2010.

- ROSSETTI, F.C. et al, A delivery system to avoid self-aggregation and to improve in vitro and in vivo skin delivery of a phthalocyanine derivative used in the photodynamic therapy. *Journal of Controlled Release* 155 (2011) 400 –408.
- SAEG, F.; ANBALAGAN, M. Breast cancer stem cells and the challenges of eradication: a review of novel therapies. *Stem Cell Investig.*, 31; 5:39, 2018.
- SAHOO, S.K. Parveen S. Nanomedicine: clinical applications of polyethylene glycol conjugated proteins and drugs. *Clin Pharmacokinetics* 45:965-88, 2006.
- SALMINEN A et al. Activation of innate immunity system during aging: NF- $\kappa$ B signaling is the molecular culprit of inflamm-aging. *Ageing Research Reviews*. v. 7, 2, 83-105, 2008.
- SANTOS, P.P. et al. Biodegradable polymers as wall materials to the synthesis of bioactive compound nanocapsules. *Trends in Food Science & Technology* 53, 23-33, 2016.
- SCHAFFAZICK, S.R. et al. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. *Quím. Nova*. v 26, 2003.
- SHAPIRA, A. et al. Nanomedicine for targeted cancer therapy: Towards the overcoming of drug resistance. *Drug Resistance Updates* 14 150– 163, 2011.
- SHIBU, E.S.et al. Nanomaterials formulations for photothermal and photodynamic therapy of cancer. *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews*. 15, 53– 72, 2013.
- SOBIN, L.H; Wittekind CH. *TNM Classification of Malignant Tumours*, 6<sup>th</sup> edition.2014.International Union Cancer Control (UICC).

- SOUZA L R. et al PVM/MA-shelled selol nanocapsules promote cell cycle arrest in A549 lung adenocarcinoma cells. *Journal of Nanobiotechnology*2014**12**:32
- SOUZA,T.D. et al. Evaluation of photodynamic activity, photostability and *in vitro* drug release of zinc phthalocyanine-loaded nanocapsules. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 83, 88 –98, 2016.
- STARON, R.et al. Evaluation of mutagenic activity of the organo-selenium compound Selol by use of the Salmonella typhimurium mutagenicity assay. *Mutation Research*. 699, 44–46, 2010.
- SOCHACKA, M. et al. Effects of Selol 5% supplementation on the activity or concentration of antioxidants and malondialdehyde level in the blood of healthy mice. *Pharmacological Reports*. 66, 301–310, 2014.
- SUCHOCKI, P. et al. The activity of Selol in multidrug-resistant and sensitive human leukemia cells. *Oncol Rep*. 18 (4): 893-9, 2007.
- SUCHOCKI, P. et al; Selenitetriglycerides affect CYP1A1 and QR activity by involvement of reactive oxygen species and Nrf2 transcription factor. *Pharmacological Reports*. v. 62, 2, 352-361, 2010
- TAO, K. et al. Imagable. 4T1 model for the study of late stage breast cancer. *BMC Cancer*. 8 :228, 2008.
- TSENG,J.C. AND KUNG, A.L. In Vivo Imaging of Inflammatory Phagocytes. *Chemistry & Biology*.19, 1199–1209, 2012.
- XIAO Y.et al. Protective effects of selenium against zearalenone-induced apoptosis in chicken spleen lymphocyte via an endoplasmic reticulum stress signaling pathway. *Cell Stress Chaperones*. 2018.
- XU, X. et al. Cancer nanomedicine: from targeted delivery to combination therapy. *Trends in Molecular Medicine*. v. 21, n.4, 2015.

- WACHOWSKA, M. et al. 5-Aza-2-deoxycytidine potentiates antitumour immune response induced by photodynamic therapy. *European Journal of Cancer*. 50, 1370 – 1381, 2014.
- WANG, H. et alli. Comparison between sonodynamic and photodynamic effect on MDA-MB-231 cells. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 127, 182–191, 2013.
- WANG, P. et al. Anti-metastatic and pro-apoptotic effects elicited by combination photodynamic therapy with sonodynamic therapy on breast cancer both in vitro and in vivo. *Ultrasonics Sonochemistry*. 23, 116–127, 2015.
- WEIMBERG, R. *Biology of Cancer*, 2º Ed. cap 11 p.485.
- WEIMBERG R, relações heterotípicas, pagina 585
- WEIMBERG. *Biology of Câncer*. 2ª Ed. P. 642.
- YONCHEVA, K. et al. Pegylated nanoparticles based on poly(methyl vinyl ether-co-maleic anhydride): preparation and evaluation of their bioadhesive properties. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 24, 411–419, 2005.
- ZAMIN I. A importância do índice ast/alt no diagnóstico da esteatohepatite não-alcoólica. *Arq. Gastroenterol*. vol.39 no.1 São Paulo Jan./Mar. 2002.
- ZHANG, J. et al. Combined CB2 Receptor Agonist and Photodynamic therapy Synergistically Inhibit Tumor Growth in Triple Negative Breast Cancer. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. S1572-1000(18) 30157-1.