



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA
PÓS-GRADUAÇÃO EM NANOCIÊNCIA E NANOBIOTECNOLOGIA**

TESE DE DOUTORADO

**BIOCOMPATIBILIDADE DO ÁCIDO 5-AMINOLEVULÍNICO
NANOVEICULADO E SUA EFICÁCIA EM MEDIAR A TERAPIA
FOTODINÂMICA PARA TRATAMENTO DO CÂNCER DE MAMA**

LAISE RODRIGUES DE ANDRADE

**BRASÍLIA
2017**

LAISE RODRIGUES DE ANDRADE

**BIOCOMPATIBILIDADE DO ÁCIDO 5-AMINOLEVULÍNICO
NANOVEICULADO E SUA EFICÁCIA EM MEDIAR A TERAPIA
FOTODINÂMICA PARA TRATAMENTO DO CÂNCER DE MAMA**

Tese apresentada como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora em Nanociência e Nanobiotecnologia pelo Programa de Pós-Graduação em Nanociência e Nanobiotecnologia da Universidade de Brasília.

Orientadora: Profa. Dra. Zulmira Guerrero Marques Lacava

**BRASÍLIA
2017**

LAISE RODRIGUES DE ANDRADE

**BIOCOMPATIBILIDADE DO ÁCIDO 5-AMINOLEVULÍNICO
NANOVEICULADO E SUA EFICÁCIA EM MEDIAR A TERAPIA
FOTODINÂMICA PARA TRATAMENTO DO CÂNCER DE MAMA**

Tese apresentada como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora em Nanociência e Nanobiotecnologia pelo Programa de Pós-Graduação em Nanociência e Nanobiotecnologia da Universidade de Brasília.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Zulmira Guerrero Marques Lacava
(Presidente)

Profa. Dra. Graziella Anselmo Joanitti
(Membro titular)

Profa. Dra. Marília de Freitas Calmon
(Membro titular)

Profa. Dra. Rosângela Vieira de Andrade
(Membro titular)

Prof. Dr. Luis Alexandre Muehlmann
(Suplente)

AGRADECIMENTOS

A Deus por me guiar, iluminar sempre meu caminho e colocar nele pessoas muito especiais, responsáveis pelo meu crescimento pessoal e profissional.

À Profa. Dra. Zulmira Lacava, um exemplo de vida e profissionalismo. Obrigada pela oportunidade, confiança, carinho, pelos ensinamentos e atenção à execução deste trabalho.

Às professoras Dra. Graziella Joanitti, Dra. Rosângela Vieira, Dra. Marília Calmon e prof. Dr. Luis Muehlmann por aceitarem participar da banca examinadora, oferecendo suas valiosas sugestões e proporcionando discussões enriquecedoras ao meu aprendizado.

À equipe que, tão gentilmente, forneceu a amostra aqui avaliada: Prof. Dr. Antônio Cláudio Tedesco e Prof. Dr. Fernando Lucas Primo. Obrigada a vocês pela cooperação e prestatividade.

Ao Prof. Dr. Guilherme Gelfuso, Dr. João Paulo Longo, Dra. Jaqueline Rodrigues, Dr. Marcos Célio, Dr. Paulo Souza e Dra. Fabiane Hiratsuka pelas colaborações desenvolvidas.

Ao prof. Dr. Ricardo Bentes por me receber em seu laboratório, pelos ensinamentos, oportunidades e colaboração.

A todos os professores do programa de Nanociência e Nanobiotecnologia que contribuíram para a minha formação e aos colegas do curso pelas horas de estudo e momentos de descontração compartilhados.

A dona Zélia por todo esforço e dedicação em manter a ordem dos laboratórios e pela presteza em me auxiliar em todos os momentos em que a procurei.

Aos colegas Thaiene Avila e Breno Matos pela ajuda nos ensaios de permeação cutânea. Sem vocês essa etapa seria muito mais difícil!

Agradeço também aos companheiros de trabalho, Willie Oliveira, Gabriel Ribeiro e Danyelle Assis pela agradabilíssima convivência, colaboração nos experimentos e, principalmente, pela amizade. Vocês são demais!

Aos meus amigos Mateus Gianizeli, Ana Lygia Câmara, Raphael Bonadio e Henrique Loback por tornar esses anos de trabalho muito mais leves e divertidos. Obrigada pela companhia nos almoços, nas madrugadas no laboratório, pelas conversas de bar! Gosto muito de vocês, nanocoleguinhas!

Ao meu namorado, Guth Berger, que me acompanhou com muito carinho nesses anos, sempre me dando força e motivação. Você foi parte fundamental de cada etapa vivida nesse processo. Obrigada por ouvir meus desabafos, pela compreensão, paciência, pelas sugestões e por toda análise estatística do trabalho! Te amo!

A minha família, meus irmãos Vanessa e Elson Júnior pela parceria na vida, e em especial a minha mãe, Elenice, pelo incentivo, por compreender a nossa distância física e aos cuidados dedicados a mim, pelos quais eu devo minha eterna gratidão. Aqui as palavras faltam...

Ao meu pai Elson Carlos (*in memoriam*) pela proteção.

À Universidade de Brasília pelas oportunidades, recursos e infraestrutura.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo auxílio financeiro.

RESUMO

Ácido 5-aminolevulínico (ALA), pró-fármaco precursor do fotossensibilizante protoporfirina IX (PpIX), é um agente terapêutico fotodinâmico aprovado pelo FDA (*Food and Drug Administration*, USA). A natureza hidrofílica da molécula, no entanto, limita a sua aplicação a casos de lesões superficiais cutâneas que demandam menor capacidade de penetração de ALA pelas membranas celulares. Uma nova formulação de ALA, baseada em nanocápsulas de poli(ácido láctico-co-glicólico) (PLGA), foi projetada na tentativa de expandir a sua aplicação no campo da oncologia. Neste trabalho, avaliou-se os efeitos biológicos e eficácia do NanoALA em mediar a TFD em modelos experimentais, *in vitro* e *in vivo*, de carcinoma mamário murino, bem como a capacidade de permeação e retenção em membrana biológica natural. Para isso, os ensaios foram conduzidos em três etapas/capítulos: (i) ensaio de cinética de incorporação de pró-fármaco em células 4T1, avaliação dos mecanismos anti-tumorigênicos (perfil de morte, função mitocondrial, quantificação da produção de espécies reativas de oxigênio, fragmentação de DNA), testes de fotocitotoxicidade (análise morfológica e ensaio MTT), (ii) análise da produção de PpIX em tumor mamário murino, testes de toxicidade aguda, de biocompatibilidade e eficácia do tratamento por meio de análises clínicas, hematológicas, bioquímicas, genotóxicas e histopatológicas, (iii) padronização e validação de método analítico para quantificação de ALA, estudo de liberação *in vitro*, estudos de permeação e retenção em pele de porco. Tomados em conjunto, os resultados indicaram que a nanoformulação favoreceu uma maior captação de pró-fármaco pelas células tumorais em menor intervalo de tempo e mais seletivamente que o ALA livre. Em consequência, os efeitos fototóxicos desencadeados nas mitocôndrias das células tumorais foram mais acentuados e os efeitos adversos foram insignificantes. Foi observada uma redução significativa do crescimento do tumor primário, bem como atenuação do processo metastático, o que resultou em maior sobrevivência dos animais tratados. Além disso, as nanocápsulas de PLGA promoveram maior penetração de ALA para camadas mais profundas da pele. Dessa forma, a TFD mediada por NanoALA emerge como potencial estratégia de tratamento adjuvante/neoadjuvante para o câncer de mama e também como modalidade de tratamento principal para lesões de pele mais profundas, como metástases cutâneas de câncer de mama.

Palavras-chave: ácido 5-aminolevulínico, nanocápsulas, PLGA, câncer de mama, 4T1

ABSTRACT

5-Aminolevulinic acid (ALA), precursor of photosensitizer protoporphyrin IX (PpIX), is a photodynamic therapeutic agent approved by FDA (*Food and Drug Administration*, US). The hydrophilic nature of the molecule, however, limits its application to cases of superficial skin lesions that require a lower capacity for ALA penetration by cell membranes. A novel formulation of ALA, based on poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) nanocapsules, was designed in an attempt to expand its application in the oncology field. In this work, we evaluated the biological effects and efficacy of NanoALA in mediating PDT in experimental models, *in vitro* and *in vivo*, of murine mammary carcinoma, as well as the permeability and retention capacity in natural biological membrane. For this purpose, the assays were conducted in three steps/chapters: (i) prodrug incorporation kinetics assay in 4T1 cells, evaluation of anti-tumorigenic mechanisms (death profile, mitochondrial function, measurement of reactive oxygen species production, DNA fragmentation analysis), photocytotoxicity tests (morphological analysis and MTT assay), (ii) analysis of the PpIX production in murine mammary tumor, acute toxicity tests, biocompatibility and treatment efficacy tests using clinical, hematological, biochemical and genotoxic analyzes (iii) standardization and validation of analytical method for ALA quantification, *in vitro* release study, permeation and retention studies on pig skin. Taken together, the results indicated that nanoformulation favored increased uptake of prodrug by tumor cells in a shorter time and more selectively than free ALA. As consequence, the phototoxic effects triggered in the mitochondria of the tumor cells were more pronounced and the adverse effects were insignificant. A significant reduction of primary tumor growth as well as attenuation of the metastatic process was observed, which resulted in a longer survival of the treated animals. In addition, PLGA nanocapsules promoted greater penetration of ALA to deeper layers of the skin. Thus, NanoALA-mediated PDT emerges as a potential adjuvant/neoadjuvant treatment strategy for breast cancer and also as the primary treatment modality for deeper skin lesions, such as cutaneous metastases of breast cancer.

Keywords: 5-aminolevulinic acid, nanocapsules, PLGA, breast cancer, 4T1 cells

LISTA DE FIGURAS

REFERENCIAL TEÓRICO

Figura 1.	Mecanismos de ação da TFD nos tumores	25
Figura 2.	Ilustração esquemática da interação da via biossintética do heme com ALA exógeno para formação de PpIX	27
Figura 3.	Fórmula estrutural e espectro de absorção da protoporfirina IX	28
Figura 4	Fluxograma do desenho experimental	32

CAPÍTULO 1

Figura 1.	Formação do derivado fluorescente pela reação com acetilacetona e formaldeído	36
Figura 2.	Célula de difusão do tipo <i>Franz</i> modificada montada para o estudo de liberação	39
Figura 3.	Célula de difusão do tipo <i>Franz</i> modificada montada para o estudo de permeação e retenção cutânea	40
Figura 4.	Remoção da pele da orelha do porco	40
Figura 5.	Separação dos estratos da pele da orelha de porco	41
Figura 6.	Representação gráfica da curva analítica para a quantificação de ALA em PBS (pH 5)	44
Figura 7.	Representação gráfica da curva analítica para a quantificação de ALA em metanol + triton X-100 10%	44
Figura 8.	Perfil de liberação do ALA a partir da nanoemulsão polimérica e da solução aquosa (controle)	46
Figura 9.	Perfil de permeação do ALA em pele de porco a partir da nanoemulsão polimérica e da solução aquosa (controle)	49
Figura 10.	Quantidade de 5-ALA ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) recuperada do estrato córneo (EC) e dos folículos pilosos após 8 h de aplicação passiva de NanoALA e solução aquosa de ALA	50

CAPÍTULO 2

Figura 1.	Estabilidade fisicoquímica de formulações de Nano e NanoALA (não-carregada e carregada com ácido aminolevulínico, respectivamente) obtido a partir de análise de DLS até 90 dias após a síntese	62
------------------	---	----

Figura 2.	Mensuração da fluorescência da protoporfirina IX (PpIX) em células 4T1	63
Figura 3.	Efeito da terapia fotodinâmica mediada por NanoALA e ALA sobre a viabilidade das células 4T1 determinada por ensaio MTT (brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium)	65
Figura 4.	Efeito da terapia fotodinâmica (TFD) sobre a morfologia de células 4T1 incubadas por 1 hora com NanoALA ou ALA a 50 µg.mL ⁻¹ antes da irradiação	66
Figura 5.	Perfil de morte celular após tratamento com NanoALA ou ALA a 50 µg.mL ⁻¹ por 1 hora na ausência ou presença de irradiação	67
Figura 6.	Análise do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) por citometria de fluxo	68
Figura 7.	Detecção de espécies reativas de oxigênio (ROS) em células 4T1 por citometria de fluxo	69
Figura 8.	Análise da integridade de DNA após tratamentos com NanoALA ou ALA a 50 µg.mL ⁻¹ por 1 hora na presença de irradiação	69
CAPÍTULO 3		
Figura 1	Detalhes do delineamento experimental dos animais submetidos à terapia fotodinâmica (TFD)	85
Figura 2.	Mensuração <i>in vivo</i> da fluorescência da protoporfirina IX (PpIX) produzida intratumoralmente após injeção de 50 µL de NanoALA ou ALA	88
Figura 3.	Estudo de toxicidade aguda em animais portadores de tumor 24 horas após injeção intratumoral de 50 µL de NanoALA ou ALA	89
Figura 4.	Avaliação do tecido tumoral 24 horas após administração de NanoALA ou ALA	91
Figura 5.	Mensuração <i>ex vivo</i> da fluorescência da protoporfirina IX (PpIX) produzida intratumoralmente 1,5 horas após injeção de 50 µL de NanoALA ou ALA	93
Figura 6.	Biocompatibilidade da TFD mediada por NanoALA ou ALA	95
Figura 7.	Histopatologia do fígado, pulmão e linfonodos sentinela	99
Figura 8.	Avaliação do tecido tumoral 7 dias após a última sessão de tratamento ...	101
Figura 9.	Análise histopatológica do sítio tumoral primário	102

Figura 10.	Curva Kaplan-Meier de sobrevida de animais portadores de tumor tratados com TFD com tabela de números em risco	103
Figura 11.	Evolução clínica de animais portadores de tumores em resposta a TFD ...	104
Figura 12.	Análise em longo-termo da bioluminescência de células 4T1-luci no sítio tumoral primário e na região torácica dos grupos control tumor, ALA-TFD e NanoALA-TFD	105
Figura 13.	Dados resumidos (média \pm SEM) da intensidade de bioluminescência de células 4T1-luci (A) no sítio tumoral primário e (B) na região torácica dos grupos control tumor, ALA-TFD e NanoALA-TFD	106

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1.	Métodos avaliados para recuperação de ALA retido na pele	42
Tabela 2.	Precisão e exatidão do método HPLC para quantificação de ALA em PBS (pH 5)	45
Tabela 3.	Precisão e exatidão do método HPLC para quantificação de ALA em metanol + triton X-100 10% (1:1)	45
Tabela 4.	Fluxo de liberação ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$) de ALA	47
Tabela 5.	Recuperação do 5-ALA retido dos diferentes estratos da pele	48

CAPÍTULO 2

Tabela 1.	Análise do tamanho de partículas para formulações NanoALA a partir da técnica de espalhamento de luz dinâmico (DLS)	62
Tabela 2.	Eficácia da TFD mediada por ALA conjugada a nanopartículas avaliada por ensaio MTT de viabilidade celular: uma revisão	72

CAPÍTULO 3

Tabela 1.	Grupos experimentais da TFD	85
Tabela 2.	Análise bioquímica após biodistribuição <i>in vivo</i>	89
Tabela 3.	Hemograma de animais portadores de tumor após análise de biodistribuição	90
Tabela 4.	Análise bioquímica após a última sessão de tratamento	96
Tabela 5.	Hemograma de animais portadores de tumor após a última sessão de tratamento	97
Tabela 6.	Conclusões relevantes da terapia fotodinâmica mediada por NanoALA ou ALA	106

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μg	Micrograma
4T1	Linhagem celular de carcinoma mamário murino
4T1- <i>luci</i>	Linhagem celular de carcinoma mamário murino com expressão de luciferase <i>firefly</i>
ALA	Ácido 5-aminolevulínico
ALA-D	ALA desidratase
ALA-S	ALA sintetase
ALT	Alanina aminotransferase
AST	Aspartato aminotransferase
ATP	Adenosina trifosfato
<i>BRCA1</i>	Câncer de mama tipo 1 (<i>Breast Cancer type 1</i>)
<i>BRCA2</i>	Câncer de mama tipo 2 (<i>Breast Cancer type 2</i>)
CDIS	Carcinoma ductal <i>in situ</i>
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
Coprogen III	Coproporfirinogênio III
CPO	Coproporfirinogênio oxidase
DHPY	Ácido 3,6-dihidropirazina-2,5-dipropanóico
DLS	Espalhamento de luz dinâmico (<i>Dynamic light scattering</i>)
DMEM	Meio Eagle modificado por Dulbecco
DMSO	Dimetilssulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EC	Estrato córneo
EDTA	Ácido dietilaminotetracético
EP-D	Epiderme-derme
EPR	Permeabilidade e retenção aumentadas (<i>Enhanced Permeability and Retention</i>)
ERO / ROS	Espécies reativas de oxigênio / <i>Reactive oxygen species</i>
FBS	Soro fetal bovino (<i>Fetal bovine serum</i>)
FCH	Ferroquelatase
FDA	Food and Drug Administration
FP	Folículo piloso
FS / PS	Fotossensibilizante / <i>Photosensitizer</i>
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HCT	Hematócrito
HGB	Hemoglobina
HMB	Hidroximetilbilano
IL-6	Interleucina-6
LDH	Lactato desidrogenase
LED	Diodo emissor de luz (<i>Ligh Emitting Diode</i>)
MAL	Ácido metil-aminolevulínico
MCH	Hemoglobina corpuscular média
MCHC	Concentração de hemoglobina corpuscular média
MCV	Volume corpuscular médio
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade

mL	Mililitro
mM	Milimolar
mTOR	Alvo da rapamicina em mamíferos (<i>Mammalian Target of Rapamycin</i>)
MTT	Brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium
mV	Milivolts
n	Nanometro
NanoALA	Nanocápsulas de poli(ácido láctico-co-ácido glicólico) carregadas com ácido 5-aminolevulínico
NO	Óxido nítrico
NP	Nanopartícula
OMS	Organização Mundial da Saúde
PARP-1	Poli (adenosina difosfato-ribose) polimerase-1
PBG	Porfobilinogênio
PBG-D	Porfobilinogênio desaminase
PBS	Tampão fosfato-salino (<i>Phosphate buffered saline</i>)
PDD	Detecção fotodinâmica (<i>Photodynamic detection</i>)
PdI	Índice de polidispersividade (<i>Polydispersity index</i>)
pH	Potencial hidrogeniônico
PLGA	Poli(ácido láctico-co-glicólico)
PLT	Contagem de plaquetas
PpIX	Protoporfirina IX
PPO	Protoporfirinogênio oxidase
Protogen III	Protoporfirinogênio III
PVM/MA	Poli(metil vinil-éter co-anidrido maléico)
PY	2,5-(β-carboxietil)pirazina
RBC	Glóbulos vermelhos do sangue
RDW	Distribuição da largura das células vermelhas
SEM	Erro padrão da média (<i>Standard error of mean</i>)
SFM	Meio livre de soro (<i>Serum-free medium</i>)
TFD / PDT	Terapia fotodinâmica / <i>Photodynamic Therapy</i>
TFD-ALA	Terapia fotodinâmica mediada por ácido 5-aminolevulínico
TFD-NanoALA	Terapia fotodinâmica mediada por nanocápsulas de poli(ácido láctico-co-ácido glicólico) carregadas com ácido 5-aminolevulínico
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
UCS	Uroporfirinogênio cosintase
UGD	Uroporfirinogênio descarboxilase
Urogen III	Uroporfirinogênio III
WBC	Glóbulos brancos totais
W-LCR	Células grandes (neutrófilos)
W-MCR	Células medianas (monócitos, basófilos e eosinófilos)
W-SCR	Células pequenas (linfócitos)
ΔΨ _m	Potencial de membrana mitocondrial

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
2. OBJETIVOS	20
2.1 Objetivos gerais	20
2.2 Objetivos específicos	20
Etapa <i>in vitro</i>	20
Etapa <i>in vivo</i>	20
3. REFERENCIAL TEÓRICO	22
3.1 Câncer de mama.....	22
3.2 Terapia Fotodinâmica	24
3.3 Ácido 5-aminolevulínico	27
3.4 Sistemas nanoestruturados	30
4. CAPÍTULOS	32
CAPÍTULO 1	33
1. INTRODUÇÃO.....	34
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	35
2.1 Pró-fármaco	35
2.2 Método analítico para quantificação de ALA	35
2.2.1 Validação do método analítico para quantificação de ALA	36
2.2.1.1 Linearidade	36
2.2.1.2 Precisão.....	37
2.2.1.3 Exatidão	37
2.2.1.4 Especificidade/seletividade	38
2.2.1.5 Limite de Detecção	38
2.2.1.6 Limite de Quantificação	38
2.3 Estudo de liberação <i>in vitro</i>	38
2.4 Estudo de permeação e retenção cutânea <i>in vitro</i>	40
2.4.1 Pele.....	40
2.4.2 Ensaio de recuperação de ALA a partir da pele de porco	41
2.4.3 Estudo de permeação cutânea	42
2.4.4 Estudo de retenção cutânea	43

2.5 Análise estatística	43
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
3.1 Validação do método analítico para quantificação de ALA	43
3.2 Estudo de liberação in vitro	46
3.3 Estudos de permeação e retenção cutânea in vitro.....	47
4. CONCLUSÃO.....	51
REFERÊNCIAS	51
CAPÍTULO 2	53
RESUMO	54
ABSTRACT	55
1. INTRODUCTION	56
2. MATERIALS AND METHODS	57
2.1 The preparation of NanoALA.....	57
2.2 Characterization	58
2.3 Cell culture.....	58
2.4 Uptake profile of NanoALA in 4T1 cells	58
2.5 Comparison of ALA- and NanoALA-mediated photocytotoxicity on 4T1 cells	59
2.6 Effects of NanoALA-PDT on 4T1 cell morphology	59
2.7 Assessment of anti-tumorigenic mechanisms of NanoALA.....	60
2.7.1 Apoptotic cells staining by annexin-V/propidium iodide	60
2.7.2 Analysis of mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi_m$).....	60
2.7.3 Detection of intracellular reactive oxygen species (ROS)	61
2.7.4 DNA fragmentation.....	61
2.8 Statistical analysis.....	61
3. RESULTS	62
3.1 Particle size, zeta potential and physical-chemical stability.....	62
3.2 PpIX fluorescence measurements	63
3.3 NanoALA biocompatibility	64
3.4 NanoALA-PDT efficiency and cell morphology.....	66
3.5 Analysis of the cell death profile	66
3.6 Analysis of mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi_m$).....	68
3.7 Reactive oxygen species (ROS) measurement	68
3.8 DNA fragmentation	69
4. DISCUSSION.....	70

5. CONCLUSION	73
REFERENCES	73
CAPÍTULO 3	78
RESUMO	79
ABSTRACT	80
1. INTRODUCTION	81
2. MATERIALS AND METHODS	82
2.1 NanoALA.....	82
2.2 Cell line and animals.....	83
2.3 Murine model of mammary carcinoma	83
2.4 Analysis in vivo and ex vivo of intratumoral production and biodistribution of PpIX ..	84
2.5 Photodynamic therapy – experimental design	84
2.6 Biocompatibility analysis	86
2.6.1 Hemogram and biochemical analysis.....	86
2.6.2 Analysis of DNA fragmentation and cell cycle in bone marrow cells.....	86
2.6.3 Histopathological evaluation.....	86
3. RESULTS.....	87
3.1 Evaluation of PpIX production and acute NanoALA toxicity.....	87
3.2 Evaluation of biocompatibility and efficacy of NanoALA-mediated PDT.....	94
3.3 Long-term effect of PDT applied to breast cancer.....	103
4. DISCUSSION.....	107
5. CONCLUSION	109
REFERENCES	110
5. CONSIDERAÇÕES GERAIS	116
6. CONCLUSÕES	119
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	121
ANEXO 1	127
Declaração do Comitê de Ética no uso Animal (CEUA)	127
ANEXO 2	128
Artigo publicado	128

1. INTRODUÇÃO

Câncer refere-se a um conjunto heterogêneo de doenças que têm em comum o crescimento desordenado de células atípicas (WHO, 2017a). Em um processo microevolutivo, as células adquirem alterações genéticas e/ou epigenéticas que lhes conferem capacidade de proliferação superior a seus limites habituais, podendo então invadir tecidos e órgãos reservados a outros tipos celulares. Em geral, essa proliferação descontrolada é resultado de uma sucessão de características acumuladas ao longo do processo carcinogênico, como sustentação dos sinais de proliferação, evasão aos supressores de crescimento, resistência aos mecanismos de apoptose e aos mecanismos de defesa imunológica, potencial de replicação ilimitado, indução da angiogênese, modulação da resposta inflamatória, instabilidade genética e alterações adaptativas no metabolismo energético (HANAHAN & WEISBERG, 2011).

A gênese de tais alterações celulares é complexa e multifatorial, podendo ser externas e/ou internas ao organismo. De todos os casos de cânceres, somente cerca de 10% são exclusivamente pré-determinados - derivados de oncogenes hereditários -, a maioria está associada a fatores ambientais que incluem exposição excessiva à radiação solar ou às advindas de exames médicos, infecção causada por vírus ou outros microrganismos, hábitos alimentares inapropriados, medicamentos, tabagismo, alcoolismo, fatores ocupacionais e comportamentos socioculturais (estilo e hábitos de vida) (INCA, 2016).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS) é inquestionável que o câncer é um problema de saúde pública, especialmente entre os países em desenvolvimento, onde espera-se cerca de 27 milhões de casos incidentes de câncer até o ano de 2030. A estimativa para o Brasil, biênio 2016-2017, aponta a ocorrência de 600 mil casos novos de câncer, onde os cânceres de próstata (61 mil) em homens e mama (58 mil) em mulheres serão os mais frequentes, com exceção dos cânceres de pele não-melanoma (aproximadamente 180 mil novos casos) (INCA, 2016).

O sucesso na cura dessas doenças está associado a uma detecção precoce, diagnóstico preciso e tratamento eficaz (WHO, 2017a). Portanto, cientistas têm unido esforços para o desenvolvimento de sistemas diagnósticos precisos e terapias livres dos efeitos adversos que acompanham as terapias convencionais, como a excisão cirúrgica, quimioterapia e a radioterapia (ZHANG et al., 2017). Nesse contexto se insere a terapia fotodinâmica (TFD), uma opção de tratamento que envolve a combinação de luz, um fotossensibilizante (FS) e oxigênio molecular (CHILAKAMARTHI & GIRIBABU, 2017).

Individualmente, cada componente não é tóxico, mas quando o FS é irradiado por uma luz de comprimento de onda específico, as reações fotoquímicas resultam em formação de espécies reativas de oxigênio (ERO) e estresse oxidativo responsável por morte celular. As ERO só afetam o microambiente imediatamente ao redor de onde foram geradas, geralmente dentro de um raio de 20 nm, evitando assim toxicidade sistêmica. Além disso, evidências recentes sugerem que a TFD tem o potencial de induzir imunidade contra recidiva e destruição de metástases distantes dos locais tratados, com efeitos adversos mínimos (HONG et al., 2016; BANERJEE et al., 2017; CHILAKAMARTHI & GIRIBABU, 2017; CHITGUPI et al., 2017).

A eficácia da TFD depende de vários fatores, principalmente do tipo de FS e sua biodisponibilidade nos tecidos alvo. Embora existam vários fármacos sob investigação, poucos estão aprovados para uso clínico, sendo um deles o ácido 5-aminolevulínico (ALA) (Levulan[®]) (WU et al., 2017). O ALA é um intermediário natural da via biossintética do heme e é utilizado como um precursor de protoporfirina IX (PpIX), um potente FS fluorescente. A principal vantagem da PpIX em relação aos outros FS é seu rápido *clearance* corporal – não dura mais de 48 h – e, em consequência, sua baixa citotoxicidade na ausência de irradiação. Dessa forma, os riscos de fotossensibilidade prolongada são considerados ausentes ou desprezíveis com o uso tópico ou sistêmico de ALA (RODRIGUEZ et al., 2015; BENITO et al., 2013).

Vários estudos comprovam a eficácia, além de baixa incidência de efeitos adversos e bons resultados estéticos da TFD mediada por ALA (TOREZAN et al., 2009; ISSA & MANELA-ZULAY, 2010; SZEIMIES et al., 2010). No entanto, devido a sua natureza zwitteriônica e hidrofílica, o ALA é instável em ambientes fisiológicos e seu transporte através da pele ou membranas celulares é limitado, o que restringe a eficácia da TFD-ALA ao tratamento de lesões pré-neoplásicas ou superficiais, como queratoses actínicas, doença de *Bowen*, tumores superficiais cutâneos e outras lesões não malignas, como psoríase, papiloma e micose fungóide (RUD et al., 2000; LOPEZ et al., 2004; GÓMEZ et al., 2012; PASSOS et al., 2013). O desafio atual é contornar esses inconvenientes clínicos e melhorar o perfil farmacocinético do ALA.

A associação de FS a sistemas de liberação nanoestruturados (*nanodeliverys*) tem emergido como uma estratégia promissora para o tratamento antitumoral. Além de atravessar as barreiras lipofílicas, os nanoveículos podem aumentar a estabilidade dos fármacos durante a circulação pelo corpo e promover uma entrega seletiva para os tecidos alvo, evitando possíveis efeitos tóxicos para células saudáveis (CHILAKAMARTHI & GIRIBABU, 2017;

CHITGUPI et al., 2017; HONG et al., 2016). Por consequência, a dose e a frequência de aplicação necessárias para atingir o efeito terapêutico desejado podem ser reduzidas, o que é relevante não só do ponto de vista biológico, mas também na perspectiva do sistema público de saúde, devido à redução do custo operacional, e para melhor adesão do paciente ao tratamento.

Em um estudo clínico piloto realizado pelo nosso grupo de pesquisa (Centro de Nanociência e Nanobiotecnologia da UnB), nanocápsulas de poli(ácido lático-co-ácido glicólico) (PLGA) carregadas com ALA (denominadas NanoALA) apresentaram propriedades superiores ao metilaminolevulinato (Metvix[®]), um derivado lipolífico do ALA, para fotodeteção e tratamento de campos de cancerização associados à queratose actínica e fotolesões cutâneas, utilizando apenas duas horas de oclusão, enquanto nos procedimentos clínicos, comumente o tempo de oclusão varia de 4 a 8 horas (PASSOS, 2013; PASSOS et al.; 2013).

Estes resultados preliminares nos encorajaram a investigar a ação biológica, a eficácia terapêutica e os mecanismos antitumorígenicos da TFD mediada por NanoALA em modelos experimentais, *in vitro* e *in vivo*, de carcinoma mamário murino. Na impossibilidade de contar com um modelo experimental de câncer de pele, para o qual a TFD é normalmente aplicada, células de carcinoma mamário murino (4T1) foram escolhidas como alvo terapêutico porque é uma linhagem celular altamente carcinogênica e invasiva que pode gerar metástases em diversos órgãos (pulmão, fígado, baço, nódulos linfáticos secundários, pele e, ocasionalmente, ossos e cérebro), de forma semelhante ao câncer de mama humano em estágio IV (KHAN et al.; 1993; ATCC, 2016). Os resultados a serem obtidos serão de interesse para o tratamento mais seguro e não invasivo tanto do câncer de pele, que atinge de 2 a 3 milhões de pessoas a cada ano no mundo todo, como do câncer de mama que é o mais frequente nas mulheres e que a cada ano causa cerca de 458 mil óbitos por falta de diagnóstico precoce e tratamento eficaz (WHO, 2017b; WHO, 2017c). Espera-se ainda que este trabalho possa ainda expandir e direcionar estudos futuros no uso de estratégias nanotecnológicas na área de oncologia.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

O presente estudo tem como objetivo avaliar os efeitos biológicos e eficácia do NanoALA em mediar a TFD em modelos experimentais, *in vitro* e *in vivo*, de carcinoma mamário murino, bem como a capacidade de permeação e retenção em membrana biológica natural.

2.2 Objetivos específicos

Etapa *in vitro*

1. Padronizar e validar o método de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para quantificação de ALA;
2. Avaliar a cinética de liberação do ALA a partir das nanocápsulas de PLGA utilizando sistemas de difusão do tipo *Franz*;
3. Analisar o perfil de permeação e retenção cutânea do NanoALA em modelo de pele de porco;
4. Analisar a cinética de incorporação de NanoALA em células de carcinoma mamário murino (4T1) por meio do sistema de imageamento IVIS LUMINA®;
5. Avaliar a biocompatibilidade do NanoALA e a sua eficácia em mediar a TFD por meio do ensaio de viabilidade MTT em células 4T1;
6. Avaliar do tipo de morte induzida pelo tratamento de células 4T1 com TFD-NanoALA por meio de citometria de fluxo.
7. Elucidar os mecanismos antitumorígenicos da TFD-NanoALA em células 4T1 por meio de análises do potencial de membrana mitocondrial - $\Delta\psi_m$; mensuração de ERO intracelular e análise de fragmentação de DNA em citômetro de fluxo.

Etapa *in vivo*

8. Caracterizar a transplantação de carcinoma mamário murino ortotópico por injeção de células da linhagem 4T1-*luci* (com expressão de luciferase *firefly*) em camundongos

- Balb/c* por meio de análises clínicas e por meio da análise semi-quantitativa de bioluminescência pelo equipamento IVIS LUMINA®;
9. Avaliar o perfil de distribuição do NanoALA, *in vivo* e *ex vivo*, por meio da análise semi-quantitativa de fluorescência pelo equipamento IVIS LUMINA®;
 10. Avaliar, *in vivo*, o potencial tóxico do NanoALA por meio de análise de subpopulações de células do sangue periférico, análise bioquímica do sangue, análise da fragmentação de DNA em células da medula óssea e análises histopatológicas, 24 horas após injeção intratumoral de NanoALA;
 11. Avaliar a eficácia e a biocompatibilidade da TFD-NanoALA mediante análise do desenvolvimento tumoral após o tratamento por meio da análise semi-quantitativa de bioluminescência pelo equipamento IVIS LUMINA®, e posterior análise de subpopulações de células do sangue periférico, análise bioquímica do sangue, análise da fragmentação de DNA em células da medula óssea e análises histopatológicas;
 12. Avaliar o efeito em longo prazo da TFD-NanoALA sobre a progressão tumoral, prevenção de metástases distantes e sobrevida, mediante análises clínicas periódicas e por meio de análise semi-quantitativa de bioluminescência no sítio tumoral primário e na região torácica pelo equipamento IVIS LUMINA®.

Este trabalho será dividido em três capítulos:

Capítulo 1: Estudo *in vitro* de permeação e retenção cutânea de ácido 5-aminolevulínico carregado em nanocápsulas de PLGA (Objetivos 1 a 3);

Capítulo 2: Avaliação *in vitro* dos mecanismos anti-tumorigênicos e eficácia do NanoALA, uma nanoformulação de ácido aminolevulínico projetada para terapia fotodinâmica anticâncer (Objetivos 4 a 7);

Capítulo 3: Indução de morte de células tumorais em modelo de câncer de mama ortotópico por ácido 5-aminolevulínico nanoestruturado: uma nova perspectiva da terapia fotodinâmica em oncologia (Objetivos 8-12).

3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Câncer de mama

O câncer de mama corresponde ao tipo de câncer mais frequente entre as mulheres em todo o mundo, respondendo por cerca de 25% dos novos casos a cada ano (com exceção do câncer de pele não-melanoma). No Brasil, estima-se 57.960 novos casos nos anos 2016-2017, com risco estimado de 56,2 casos a cada 100 mil mulheres. Cabe ressaltar que também pode acometer homens, mas numa taxa muito menor - 1% do total de casos da doença (INCA, 2016).

A idade avançada, sobretudo a partir dos 50 anos, é o principal fator de risco para a maioria dos cânceres, incluindo o câncer de mama. O acúmulo de exposições a carcinógenos e as próprias alterações biológicas decorrentes do envelhecimento aumentam a chance de ocorrência. O câncer de mama hereditário representa cerca de 5 a 10% dos casos que, geralmente, estão associados a mutações nos genes *BRCA1* e *BRCA2*. Os demais fatores de risco estão relacionados principalmente à exposição prolongada do tecido mamário ao hormônio estrógeno, como história de menarca precoce, menopausa tardia, primeira gravidez tardia, nuliparidade, uso de contraceptivos hormonais e terapia de reposição hormonal pós menopausa (NIH, 2016a).

A mama é constituída basicamente por glândulas com uma grande quantidade de tecidos conjuntivo e adiposo circundantes. As glândulas, do tipo tubuloalveolares compostas, são responsáveis pela produção de leite que é conduzido para o mamilo por meio dos ductos galactóforos e suas ramificações menores. Dentre os vários subtipos de câncer de mama, o mais comum é o carcinoma ductal *in situ* (CDIS), que tem origem nas células epiteliais dos ductos mamários. Em alguns casos, o CDIS pode se tornar invasivo e se espalhar para outros tecidos da mama. Durante os processos de metástase, as células tumorais são frequentemente encontradas nos linfonodos próximos à mama, mas podem se instalar também nos ossos, fígado, pulmão e cérebro. Podem ser sinais de câncer de mama: a presença nódulos ou espessamento na região mamária ou nas axilas; alterações no tamanho ou forma da mama; ondulações ou enrugamento na pele da mama (alteração “*peau d'orange*”); mamilo invertido; secreções do mamilo; pele escamosa, vermelha ou inchada na mama, mamilo ou aréola (NIH, 2016a).

A escolha da modalidade terapêutica depende principalmente do tipo de câncer, do seu estágio de desenvolvimento e da saúde geral do paciente. Embora a remoção parcial ou total da mama acometida seja o tratamento mais comum, existem os riscos associados ao procedimento cirúrgico, como dor, infecção, hemorragia, danos aos tecidos vizinhos, reações à anestesia, linfedema no braço, além de perda da sensibilidade nos seios, impossibilidade de amamentar e diminuição da autoestima da mulher devido à mutilação do órgão. Em casos de doença em estágio mais avançado, com lesões grandes e disseminação para outras partes do corpo, normalmente, realizam-se terapias neoadjuvantes e/ou adjuvantes (NIH, 2016b).

A quimioterapia, por exemplo, pode ser utilizada antes da cirurgia para reduzir o tamanho tumoral, ou após a cirurgia para erradicar as células tumorais remanescentes e metastáticas. A maioria dos quimioterápicos, entretanto, não tem especificidade somente para as células tumorais, eles agem também em células normais de rápida proliferação (células da medula óssea, folículos pilosos, mucosa gastrointestinal, etc), o que leva à toxicidade sistêmica e a efeitos adversos tardios dependendo da dose administrada. Ademais, resistência celular às drogas tem sido relatada como uma das falhas da quimioterapia. A radioterapia que utiliza altas doses de radiações ionizantes para o tratamento, também não discrimina as células saudáveis das tumorais. Portanto, pode causar efeitos secundários graves se tecidos saudáveis forem expostos à radiação. Entre os efeitos adversos induzidos pela quimioterapia e pela radioterapia pode-se citar a infertilidade, fraqueza, cansaço, tontura, diarreia, náuseas, vômitos, ausência de apetite, alopecia, insuficiência cardíaca, trombose, menopausa prematura, câncer secundário, entre outros (NIH, 2016b; CHILAKAMARTHI & GIRIBABU, 2017).

Os tratamentos hormonais também podem ser aplicados como adjuvantes, principalmente em cânceres de mama positivos para receptores hormonais. Raramente têm objetivo curativo quando usados isoladamente. A terapia hormonal consiste na redução ou bloqueio da ação de hormônios importantes para o desenvolvimento tumoral, como o estrógeno. A ablação ovariana (com fármacos, radioterapia ou cirurgia), uso de tamoxifeno e inibidores de aromatase são os procedimentos mais comumente empregados para esse propósito. Entretanto, os pacientes apresentam riscos aumentados de desenvolver câncer endometrial, trombose, cistos ovarianos, irritação vaginal e fogachos (NASCIMENTO, 2005; NIH, 2016b).

Já a terapia dirigida é um tipo de tratamento relativamente novo, frequentemente utilizado em combinação com outras terapias, que usa drogas capazes de reconhecer e atacar, especificamente, as células tumorais. Para o câncer de mama tem-se empregado anticorpos

monoclonais, inibidores de tirosina quinase, inibidores de cinases dependentes de ciclina, inibidores de mTOR (alvo da rapamicina em mamíferos) e inibidores da enzima poli (ADP-ribose) polimerase-1 (PARP-1). De uma forma geral, essas drogas alteram a maneira como uma célula tumoral cresce, se divide, se auto repara ou interage com outras células. Apesar de promissora, problemas cardíacos têm sido relatados como efeitos tardios da terapia dirigida (NIH, 2016b).

Conforme apresentado, todos os tratamentos padrão para o câncer de mama apresentam efeitos adversos severos, contribuindo para o aumento significativo das taxas de morbidade dos pacientes. Além disso, a metástase decorrente do câncer de mama ainda permanece como principal obstáculo para o sucesso terapêutico. Segundo Jung e cols (2011), 20% dos pacientes diagnosticados precocemente (linfonodos negativos) e pelo menos 50-60% de pacientes com linfonodos positivos desenvolvem metástases dentro de 5 anos do diagnóstico inicial. Nesses casos, o tempo de sobrevida pode variar de menos de 9 meses a mais de três anos.

A TFD emerge como uma alternativa promissora para o tratamento não só dos tumores primários de mama, mas também dos sítios metastáticos, oferecendo um risco mínimo de efeitos adversos quando comparada às outras terapias (BANERJEE et al., 2017).

3.2 Terapia Fotodinâmica

A TFD envolve a ativação de um agente FS por uma fonte de luz visível e posterior transferência de energia absorvida para o oxigênio molecular, gerando agentes citotóxicos que induzem morte celular. Nos casos de câncer de pele ou metástases cutâneas, o fotossensibilizante é administrado preferencialmente por via tópica e a luz visível é aplicada em um comprimento de onda específico, que coincide com o comprimento de onda de absorção máxima do fotossensibilizante (CASTANO et al., 2004).

O processo fotodinâmico inicia-se quando o FS absorve um fóton de luz e sai do seu estado fundamental para o primeiro estado excitado *singlete*. A partir desta transformação inicial, o FS pode retornar ao seu estado fundamental – energeticamente mais favorável – liberando energia de excitação em forma de fluorescência ou calor, ou passar para outro estado de excitação menos instável, denominado de estado *triplete*. A forma *triplete* do FS pode, por sua vez, promover dois tipos de reações. Na reação Tipo I o FS interage com biomoléculas do meio, excitando-as, e estas reagem com o oxigênio molecular, gerando uma

casca de ERO, como íons peróxidos, superóxidos e radicais hidroxilas. Alternativamente, na reação Tipo II, o FS transfere energia diretamente para o oxigênio molecular (triplete), transformando-o em oxigênio *singlete*, também uma ERO. As ERO são agentes oxidantes altamente reativos e tendem a reagir com qualquer biomolécula afim de alcançar a estabilidade química (CASTANO et al., 2004).

A eficácia da TFD no tratamento do câncer é dependente de vários fatores, incluindo o tipo de FS, a concentração do ativo no tecido alvo, a sua localização intracelular, a dose de luz, o tempo entre a administração do ativo e a exposição à luz e a disponibilidade de oxigênio tecidual (SILVA et al., 2009). Esses fatores modulam três mecanismos distintos, mas possivelmente inter-relacionados, que levam à destruição tumoral (Figura 1): (i) destruição direta da massa tumoral pela ação das ERO; (ii) alteração da vascularização tumoral, levando à privação de oxigênio e nutrientes e, conseqüentemente, infarto do tumor; (iii) ativação da resposta imune contra as células tumorais remanescentes (CASTANO et al., 2005a).

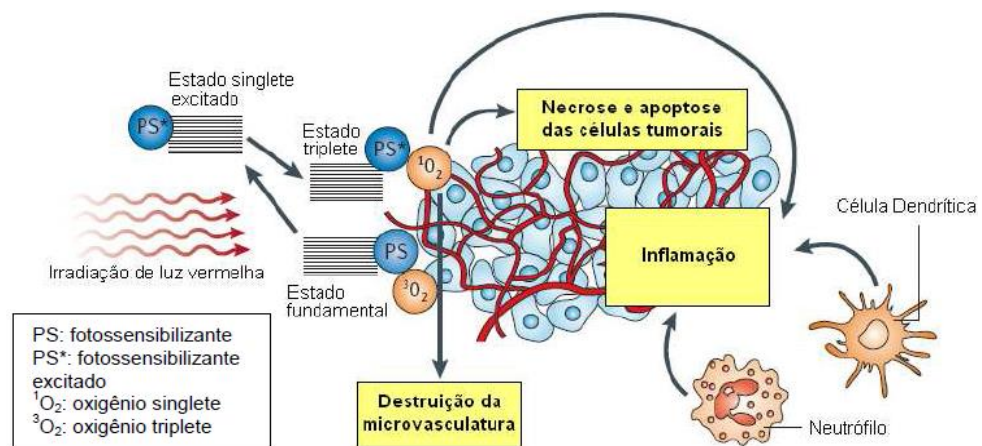


Figura 1. Mecanismos de ação da TFD nos tumores (Adaptado de CASTANO et al., 2006).

Na via direta, as ERO induzem a morte celular dos clones tumorais, principalmente via apoptose e/ou necrose. A necrose é caracterizada pela presença de núcleo picnótico, inchaço citoplasmático e ruptura da membrana plasmática que conduz à liberação do conteúdo intracelular e, conseqüentemente, à geração de um intenso processo inflamatório. Em geral, a morte celular por necrose está associada a um estímulo agressor de alta intensidade e ao acúmulo de FS nas membranas celulares e lisossomos. Nessas situações, ocorre perda rápida de integridade de membrana e rápida depleção intracelular de ATP, tornando ineficientes os mecanismos básicos de defesa e escape celular. Segundo Mroz et al.

(2011), elevadas taxas de citotoxicidade ($\geq 90\%$) são preditivas de necrose. Já a apoptose é caracterizada pela compactação nuclear e liberação de fragmentos citoplasmáticos e organelas em microvesículas envoltas por membrana plasmática, os corpos apoptóticos. Esses corpos apoptóticos são fagocitados, desencadeando processos inflamatórios em menor intensidade quando comparados aos processos relacionados à necrose. O acúmulo de FS na mitocôndria e no retículo endoplasmático, associado a menores doses de energia e de luz propiciam a morte celular via apoptose (CASTANO et al., 2005b; MROZ et al., 2011).

Alterações da vasculatura tumoral também são observadas logo após a TFD. No entanto, os mecanismos subjacentes aos efeitos vasculares da TFD diferem muito entre os diferentes FS. Dentre os principais eventos descritos na literatura, cita-se a vasoconstrição, hemorragia, adesão leucocitária e formação de trombo. Esses eventos promovem diminuição e colapso do fluxo sanguíneo, resultando em inanição e hipóxia severa e persistente que culmina com o infarto do tumor (CASTANO et al., 2005b). Barnes et al. (2009) demonstraram que curtos intervalos de tempo entre a administração do FS e a irradiação tumoral favorecem a ocorrência de lesões vasculares, uma vez que não há completa dissipação do FS às células tumorais.

A ativação do sistema imunológico contribui para a destruição e, principalmente, para o controle tumoral em longo prazo. O processo de inflamação e liberação massiva de citocinas resulta num influxo de neutrófilos e macrófagos que fagocitam um grande número de células mortas ou danificadas pelos efeitos citotóxicos da TFD. Além disso, as células apresentadoras de antígenos processam peptídeos tumor-específicos, associando-os às moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) classe II presentes na superfície celular. Tais peptídeos antigênicos são reconhecidos por linfócitos *T-helper* CD4⁺ e, uma vez ativados, sensibilizam as células T-citotóxicas CD8⁺ ao peptídeo tumor-específico. Dessa forma, a resposta imune não é restrita ao sítio primário tumoral, mas pode incluir lesões metastáticas que não foram submetidas à TFD (CASTANO et al., 2006).

Um dos primeiros trabalhos que demonstraram o efeito da TFD sobre o sistema imune foi realizado por Korbelik et al. (1996). A aplicação de TFD em camundongos *Balb/c* imunocompetentes e camundongos *SCID* imunossuprimidos portadores de sarcomas mamários EMT6 levou à ablação inicial dos tumores, mas curas em longo prazo só foram observadas nos camundongos imunocompetentes. Além disso, a transferência adotiva de células da medula óssea de camundongos *Balb/c* para *SCID* restaurou a capacidade da TFD de produzir curas em longo prazo. Diversos estudos, desde então, têm demonstrado a indução de

resposta imune-tumoral associada à TFD (CECIC & KORBELIK, 2002; GOLLNICK & BRACKETT, 2010; DENIS et al. 2011).

3.3 Ácido 5-aminolevulínico

Em 1990, Kennedy e cols revolucionaram a TFD por meio do uso de uma substância tópica, o ácido 5-aminolevulínico (ALA). O uso do ALA tópico permitiu a restrição da fototoxicidade ao local de aplicação, diferentemente dos fármacos de primeira geração, os derivados de hematoporfirina, que são de uso sistêmico e causam fotossensibilidade geral e prolongada (KENNEDY et al., 1990; TOREZAN et al., 2009).

O ALA é um pró-fármaco precursor de PpIX endógena, um potente FS. Uma vez interiorizado pelas células via transporte ativo, o ALA sofre uma cascata de reações na rota biossintética do grupo heme que leva ao acúmulo de PpIX (Figura 2). Em condições normais, o primeiro passo da via é a síntese de ALA a partir da glicina e succinil-CoA. Essa reação é catalisada pela enzima ALA sintetase que, por sua vez, é inibida quando ocorre acúmulo de heme livre (*feedback* negativo). Já o último passo da via, controlado pela enzima ferroquelatase (FCH), corresponde à incorporação de ferro à PpIX, sendo essa a etapa limitante. Entretanto, um excesso de ALA exógeno contorna o mecanismo de controle por *feedback* negativo, resultando em um acúmulo de PpIX devido à capacidade limitada da enzima ferroquelatase de transformar PpIX em heme (CASTANO et al., 2004).

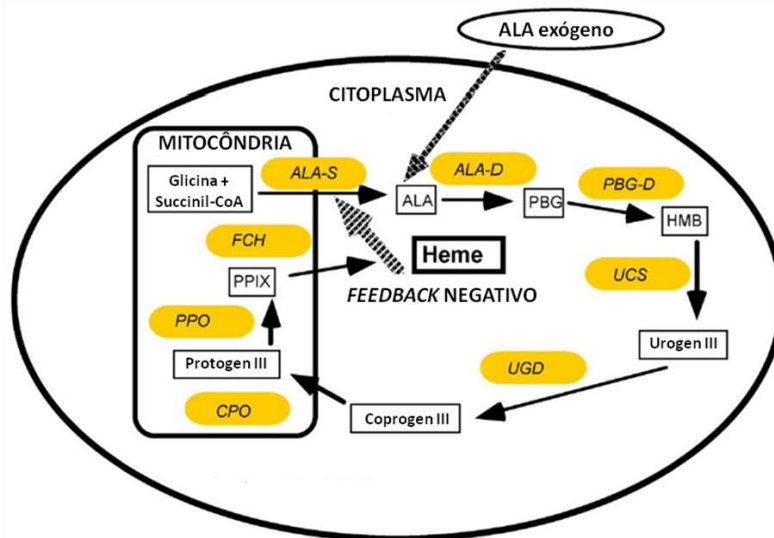


Figura 2. Ilustração esquemática da interação da via biossintética do heme com ALA exógeno para formação de protoporfirina IX (PpIX). O ALA é sintetizado na via de biossíntese do grupo heme, a partir de glicina e

succinil-CoA, no interior da mitocôndria. Essa reação é catalisada pela enzima ALA sintetase (ALA-S). Já no citoplasma, duas moléculas de ALA formam o porfobilinogênio (PBG) pela ação da ALA desidratase (ALA-D). Em seguida, quatro moléculas de PBG formam o hidroximetilbilano (HMB) pela porfobilinogênio desaminase (PBG-D) e esse é convertido em uroporfirinogênio III (Urogen III) catalisado pela uroporfirinogênio cosintase (UCS). Urogen III é então convertido em coproporfirinogênio III (Coprogen III) pela uroporfirinogênio descarboxilase (UGD). Este último volta para o interior da mitocôndria, se transforma em protoporfirinogênio III (Proto III) pela ação da coproporfirinogênio oxidase (CPO) e é convertido em protoporfirina IX (PpIX), pela ação da protoporfirinogênio oxidase (PPO). A enzima ferroquelatase (FCH) converte a PpIX em heme (Adaptado de CASTANO et al., 2004).

Embora seja formada na mitocôndria, a PpIX rapidamente se difunde para outros sítios intracelulares e é eliminada do organismo 24 horas após a administração de ALA exógeno e, dessa forma, os riscos de fotossensibilidade prolongada são considerados ausentes ou desprezíveis com o uso tópico ou sistêmico de ALA (BABILAS et al., 2010).

O acúmulo de PpIX é mais pronunciado em células tumorais do que em células normais. Ainda que esse fenômeno não esteja totalmente esclarecido, algumas evidências experimentais sugerem que a atividade da enzima porfobilinogênio desaminase (PBG-D) é maior nas células tumorais do que nas células normais, enquanto que a atividade da FCH é menor. Juntamente com as deficiências na via metabólica do heme, outros fatores, incluindo a maior atividade proliferativa, captação aumentada de ALA, disponibilidade limitada de ferro, maior densidade mitocondrial e menores valores de pH propiciam o acúmulo de PpIX nas células tumorais (LOPEZ et al., 2004).

A PpIX possui vários picos de absorção da luz, um de maior intensidade na região de 400 nm, denominada banda de *Soret*, e outros de menor intensidade localizadas em maiores comprimentos de onda (500-650 nm – bandas Q) (Figura 3). Apesar dos picos de 620 a 635 nm serem menores, as fontes de luz vermelha são as mais utilizadas na TFD, pois proporcionam maior penetração no tecido, otimizando a TFD para lesões mais profundas (TOREZAN et al., 2009).

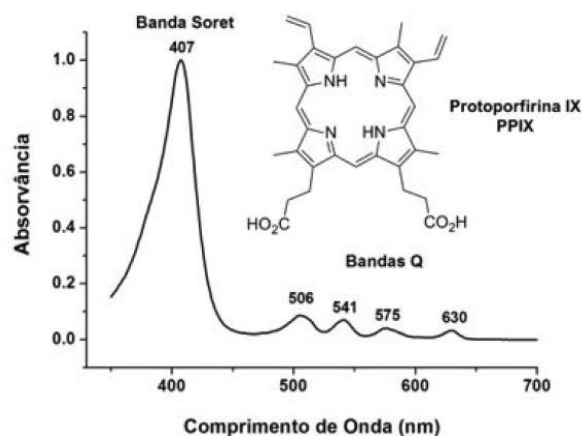


Figura 3. Fórmula estrutural e espectro de absorção da Protoporfirina IX (DE OLIVEIRA et al., 2015).

Os primeiros estudos com TFD-ALA indicaram boa resposta clínica, bem como excelentes resultados cosméticos para queratoses actínicas (QA), doença de *Bowen*, tumores superficiais cutâneos e outras lesões não malignas, como psoríase, papiloma, micose fungóide, entre outras. No entanto, a literatura evidencia que as taxas de cura são bastante variadas (50 -100%) e isso se deve, principalmente, às diferentes condições de tratamento. Os melhores resultados terapêuticos foram obtidos com concentrações entre 10 e 20% e com tempo de aplicação prolongado (14-18 horas) (PENG et al., 1997; LOPEZ et al., 2004; TOREZAN et al., 2009).

Por ser uma molécula de natureza hidrofílica e zwitteriônica em pH fisiológico, o ALA apresenta capacidade reduzida para atravessar barreiras biológicas, como o estrato córneo da pele e as membranas celulares, compostas predominantemente por moléculas lipofílicas. Em geral, a distribuição limitada e não homogênea do pró-fármaco, associada à pouca penetração da luz reduzem drasticamente o sucesso da TFD para o tratamento de lesões mais profundas (≥ 2 mm) (LOPEZ et al., 2004).

Diversas estratégias têm sido adotadas para aumentar, direta ou indiretamente a biodisponibilidade da PpIX nos tecidos tumorais. A adição de agentes que inibem a ação da enzima FCH, como a desferroxamina (YANG et al., 2010), ou desestruturam o estrato córneo aumentando a penetração do ALA, como o ácido dietilaminotetracético (EDTA) e o dimetilssulfóxido (DMSO), constituem exemplos de aditivos que potencializam a TFD (ORENSTEIN et al., 1996; DE ROSA et al., 2000). A penetração de 5-ALA também pode ser otimizada pela técnica de iontoforese (LOPEZ et al., 2001) ou por mudanças estruturais na sua molécula. Reação de esterificação do 5-ALA com adição de alcoóis com cadeias alifáticas de tamanhos variados formam ésteres como o hexil, octil, decil e dodecil-éster que são mais lipofílicos e atravessam as membranas celulares mais facilmente que o ALA (DE ROSA et al., 2003). Atualmente, o ácido metil-aminolevulínico, conhecido como MAL (Metvix^R, Galderma) é o único éster derivado do ALA disponível no mercado e empregado para o tratamento de câncer de pele não-melanoma (VALENTINE et al., 2011; PASSOS, 2013; KOZAK, 2014).

Outra abordagem proposta mais recentemente para aumentar a biodisponibilidade do ALA e melhorar a eficácia terapêutica da TFD-ALA é o desenvolvimento de sistemas carreadores de fármacos nanoestruturados (*nanodelivery*). Vários estudos têm demonstrado que esses sistemas apresentam uma série de vantagens em relação aos sistemas convencionais, pois além de aumentar a penetração do pró-fármaco, esses sistemas podem aumentar a estabilidade do ALA em ambiente fisiológico e garantir uma liberação sítio-específica,

minimizando possíveis efeitos tóxicos às células saudáveis (OH et al., 2011; PASSOS et al., 2011; SHI et al., 2013; PASSOS et al., 2013).

3.4 Sistemas nanoestruturados

O termo nanotecnologia refere-se à criação e utilização de materiais, dispositivos e sistemas por meio do entendimento e controle da matéria na escala nanométrica (1 nanometro = 10^{-9} m). Nessa escala de tamanho, os materiais adquirem propriedades térmicas, ópticas, magnéticas, elétricas e biológicas diferentes daquelas observadas quando os mesmos materiais estão nas escalas micro ou macroscópica. Uma das principais características dos nanomateriais é a grande área de superfície em relação ao volume. Essa peculiaridade pode ser apontada como uma de suas grandes vantagens, uma vez que os tornam bastante reativos, permitindo uma infinidade de aplicações nos mais diversos campos, como eletrônica, engenharia, medicina, entre outros (FERREIRA & RANGEL et al., 2009).

A aplicação da nanotecnologia na área biológica é denominada nanobiotecnologia e vem se mostrando bastante promissora para o aprimoramento dos sistemas de entrega de fármacos (*drug delivery*), dos sistemas de diagnóstico e tratamento de doenças, bem como para o monitoramento da saúde (NANOWERK, 2015). O crescimento expressivo do número de publicações relacionando os termos “*drug delivery*” e “nanopartículas” nas duas últimas décadas reflete o potencial da nanobiotecnologia como uma alternativa para a otimização de sistemas terapêuticos (HOLTZ, 2009). Nanoemulsões (CÂMARA et al., 2017), nanopartículas (NP) inorgânicas (ouro, prata, magnéticas) (NEVES et al., 2017; RAMACHANDRAN et al., 2017), NP poliméricas (quitosana, PLGA, PVM/MA) (LONGO et al., 2016; SHARMA et al., 2017; ANDRADE et al., 2017), lipossomas (ROCHA et al., 2012), nanopartículas lipídicas sólidas (BAKHTIARY et al., 2017), nanotubos de carbono (SIDDIQUI et al., 2017), *quantum dots* (BWATANGLANG et al., 2016), dendrímeros (ZHANG et al., 2016), entre outras NP, têm sido propostas para o diagnóstico e tratamento do câncer.

Embora o ALA tenha aprovação pelo FDA (Food and Drug Administration, USA) apenas para tratamento de queratoses actínicas (O’CONNOR et al., 2009), a investigação da TFD mediada por ALA nanoveiculado sobre outros tipos de lesões oncológicas não-cutâneas representa uma expansão para a sua aplicação. É bem documentado que em condições fisiológicas o ALA sofre dimerização. O seu grupo amino desprotonado é capaz de reagir com

o grupo cetona de moléculas próximas gerando diidropirazina cíclica (ácido 3,6-dihidropirazina-2,5-dipropanóico - DHPY), um produto de degradação (ONUKEI et al., 2002). Existem evidências, no entanto, de que os sistemas nanoestruturados têm o potencial de aumentar a estabilidade do ALA e propiciar a captação pelas células-alvo por meio de endocitose, ao invés de transporte ativo lento e saturável como ocorre com o pró-fármaco livre (SHI et al., 2013). Segundo Smith et al. (2012), as nanoestruturas também podem induzir discontinuidades nas membranas plasmáticas e entrar diretamente nas células carregando o fármaco.

Além das vantagens supracitadas, os sistemas nanoestruturados podem aprimorar a retenção de FS nos sítios tumorais por mecanismos de vetorização ativa e passiva. A primeira caracteriza-se pela funcionalização ou uso de ligantes na superfície das nanopartículas que irão interagir especificamente com as células tumorais. A última, por sua vez, está relacionada à fisiologia anormal dos vasos neoformados nos tumores que apresentam largas fenestrações (100 a 780 nm). Assim, as NP atravessam o endotélio e ficam retidas no tumor devido à reduzida drenagem linfática (OLIVEIRA et al., 2012).

Muitos sistemas nanoestruturados têm sido projetados com o objetivo de tratar o câncer de mama por meio de terapia fotodinâmica, como NP de ouro funcionalizadas com lactose-ftalocianina (CALAVIA et al., 2017), NP poliméricas associadas a alumínio-cloro-ftalocianina (LONGO et al., 2016) e lipossomas carregados com indocianina verde (SHEMESH et al., 2014). Entretanto, apesar das vantagens inerentes ao ALA, poucos estudos nesse campo têm sido associados a ele. Fukuda et al. (1992) demonstraram, *in vivo*, que a injeção intratumoral de ALA em sistemas lipossomais aumenta a síntese de PpIX em carcinoma mamário comparado ao pró-fármaco livre. Feng et al. (2016) também relataram efeito fotodinâmico superior do ALA conjugado a quantum-dots em linhagem celular de câncer de mama (MCF-7).

Um novo sistema para veiculação de ALA foi desenvolvido com a intenção de melhorar a estabilidade, aumentar a penetração e reduzir o tempo de exposição ao pró-fármaco (PASSOS et al., 2013). Esse sistema, baseado em nanoemulsão lipídico-polimérica, será avaliado no presente trabalho em relação (i) aos mecanismos anti-tumorigênicos, (ii) à biocompatibilidade, (iii) à eficácia em mediar a TFD para o tratamento de carcinoma mamário murino e (iv) à capacidade de permeação e retenção cutânea.

Em acordo com os objetivos apresentados, a Figura 4 mostra uma síntese do desenho experimental desenvolvido.

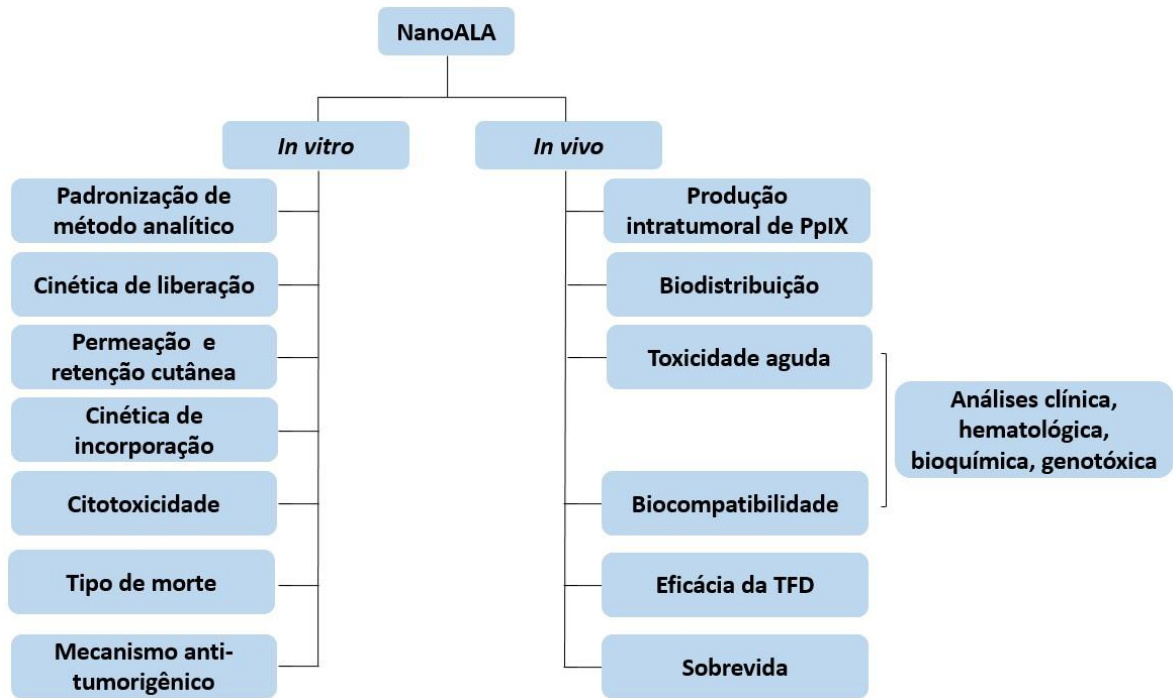


Figura 4. Fluxograma do desenho experimental.

4. CAPÍTULOS

CAPÍTULO 1

ESTUDO *IN VITRO* DE PERMEAÇÃO E RETENÇÃO CUTÂNEA DE ÁCIDO 5-AMINOLEVULÍNICO CARREADO EM NANOCÁPSULAS DE PLGA

1. INTRODUÇÃO

No que concerne ao tratamento tópico de neoplasias, alguns problemas, como o fato de muitos fármacos não apresentarem propriedades fisicoquímicas favoráveis para penetrar/permeiar efetivamente na pele, podem ser contornados com o uso de carreadores nanoestruturados. O pequeno tamanho e a grande área superficial desses materiais podem induzir mudanças na permeabilidade ou condutividade das membranas biológicas, favorecendo a penetração de fármacos. Nos últimos dez anos, o número de publicações relacionando os termos “nanopartículas” e “liberação tópica” teve um crescimento expressivo, refletindo a busca desses sistemas para aplicação dérmica como uma alternativa para a otimização de formulações cosméticas e de sistemas terapêuticos (CERIZE, 2012).

Embora muitos estudos tenham sido realizados no intuito de desenvolver *nanodeliveries* para aplicações tópicas, poucos avançaram e estão em fase clínica (PASSOS et al., 2011; PASSOS et al., 2013). O primeiro desafio é controlar a reprodutibilidade da produção desses sistemas através de processos padrão (já empregados nas indústrias atualmente), controlar as propriedades fisicoquímicas, como a estabilidade, além de empregar materiais comercialmente disponíveis e biocompatíveis. Outro grande desafio consiste na barreira altamente complexa da pele que limita o grau e a velocidade de penetração dos fármacos (CERIZE, 2012).

O fármaco ou ativo pode ter três vias potenciais de penetração através do tecido cutâneo; (i) a via intercelular, em que a substância se difunde ao redor dos corneócitos passando somente pela matriz lipídica; (ii) a via transcelular em que o fármaco passa diretamente através dos corneócitos e da matriz lipídica intercelular e (iii) via apêndices, uma rota paralela na qual os fármacos podem ser absorvidos pelo folículo piloso, glândulas sebáceas e glândulas sudoríparas. A penetração/permeação depende de um grande número de fatores, incluindo as condições da pele em que o produto será aplicado, como integridade e idade, as propriedades fisicoquímicas do fármaco (tamanho, solubilidade, coeficiente de partição), o tempo de exposição e características do veículo farmacêutico. Trabalhos prévios demonstraram que a nanoveiculação de fármacos pode alterar significativamente o perfil de permeação através da pele (ESCOBAR-CHÁVEZ et al., 2012).

No intuito de otimizar a penetração/permeação cutânea do ácido 5-aminolevulinico (ALA), um fotossensibilizante empregado na terapia fotodinâmica (TFD), alguns trabalhos propuseram a veiculação do mesmo em sistemas nanoestruturados, entre eles cita-se,

nanopartículas de quitosana (FERREIRA, 2012), nanoemulsão (MAISH et al., 2010; ZHANG et al., 2011), lipossomos (PIERRE et al., 2001; OH et al., 2011) e nanopartículas de PLGA (SHI et al., 2013). No entanto, esses sistemas apresentam algumas desvantagens, como instabilidade e efeitos secundários desconhecidos em longo prazo.

Neste trabalho, uma nova nanoformulação de ALA, baseada em nanoemulsão lipídico-polimérica, será avaliada em relação à capacidade de permeação e retenção cutânea, ampliando as perspectivas de aplicação da TFD mediada por ALA para além do tratamento de queratoses actínicas atualmente aprovado.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Pró-fármaco

O NanoALA foi preparado em concentração final de ALA equivalente a 20% (m/m) pelo processo de emulsificação espontânea e caracterizado em relação ao tamanho (210 nm), dispersão do tamanho (0,16), potencial zeta (-51,4 mV) e estabilidade físico-química (90 dias), conforme descrito por Passos et al. (2013).

2.2 Método analítico para quantificação de ALA

A quantificação de ALA foi realizada em um Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (CLAE), modelo Shimadzu-Prominence, composto por um desgaseificador (modelo DGU 20A5), duas bombas (modelo LC-20AT), um injetor automático (modelo SIL-20AHT) e forno (modelo CTO-20A), acoplados a um detector de fluorescência (modelo FR-10AXL) e a um sistema controlador (modelo CBM-20A).

Dez microlitros das amostras foram injetados em uma coluna de fase reversa C₁₈ ACE AQ (25 × 0,4 cm, diâmetro da partícula 5 µm) (ACE, Aberdeen, Scotland) associada a uma pré-coluna (1 × 0,4 cm, diâmetro da partícula 5 µm) (ACE, Aberdeen, Scotland). A eluição foi realizada a 30°C com uma fase móvel composta por metanol e água deionizada + TFA 0,12% na proporção 50:50 (v/v) em uma vazão de 1 mL/min. A intensidade de fluorescência foi determinada por excitação em 370 nm e emissão em 460 nm, ganho de 4× e sensibilidade média.

Uma vez que o ALA não apresenta fluorescência intrínseca, as amostras foram previamente submetidas a uma reação de derivatização que consiste em converter o pró-fármaco em um composto fluorescente, o 2,6-diacetil-1,5-dimetil-7-(2-carboxietil)-3H-pirrolizina (Figura 1) (OISHI et al., 1996). A reação de derivatização foi realizada em tubos de ensaio protegidos da luz, aos quais foram adicionados 50 μ L de solução de ALA, 3,5 mL de solução de acetilacetona (15% de acetilacetona, 10% de etanol e 75% de água destilada v/v) e 0,45 mL de solução de formaldeído 10% (v/v). A mistura foi agitada em vórtex por aproximadamente 3 segundos e aquecida em banho-maria a 90°C por 10 minutos. Em seguida, as amostras foram resfriadas em banho de gelo, filtradas utilizando filtro Millipore com 0,2 μ m de porosidade e mantidas ao abrigo de luz até o momento da análise.

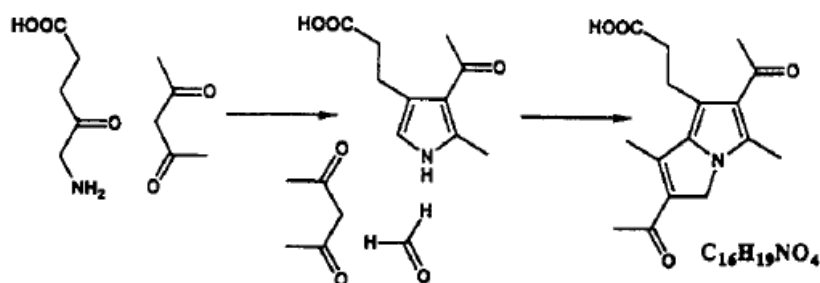


Figura 1. Formação do derivado fluorescente pela reação de ALA com acetilacetona e formaldeído (Oishi et al., 1996).

2.2.1 Validação do método analítico para quantificação de ALA

O método analítico foi validado em termos de linearidade, precisão, exatidão, especificidade/seletividade, limite de detecção e limite de quantificação, de acordo com ICH *guidelines* (ICH, 2005), conforme detalhado a seguir.

2.2.1.1 Linearidade

A linearidade corresponde à capacidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância em análise, dentro de um intervalo especificado. Para determinar a linearidade, foram construídas curvas analíticas de ALA com concentrações variando de 0,01 a 5 μ g/mL, usando como solventes tampão fosfato-salino (PBS), pH 5, e uma mistura de metanol e triton X-100 a 10% (1:1 v/v).

Inicialmente, foi preparada uma solução padrão de ALA a 100 µg/mL, diluindo-se 10 mg do pró-fármaco em 100 mL de solvente. Em seguida, diluiu-se 5 mL da solução padrão em 45 mL de solvente, obtendo-se uma solução a 10 µg/mL, a partir da qual foram feitas diluições para obtenção de concentrações equivalentes a 0,01; 0,03; 0,06; 0,012; 0,25; 0,5; 1; 1,5; 2; 2,5; 3; 3,5; 4; 4,5 e 5 µg/mL, em triplicata para cada concentração. As soluções foram derivatizadas, conforme descrito no item 2.2.

2.2.1.2 Precisão

A precisão do método analítico expressa o grau de dispersão entre uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra. A precisão do método foi determinada em termos de repetibilidade (precisão intracorrída) e precisão intermediária (precisão intercorrída). Para estabelecer a precisão intra e intercorrída foram feitas análises repetidas (3×) de três concentrações (0,25; 2,5 e 5 µg/mL), em triplicata, no mesmo dia da construção das curvas analíticas e em dois dias diferentes, respectivamente. As concentrações escolhidas contemplam o intervalo linear do método. Os resultados foram expressos através do coeficiente de variação (CV%), calculado de acordo com a equação:

$$CV\% = (DP/C_{\text{média}}) \times 100 \text{ (Equação 1),}$$

onde: DP = estimativa do desvio padrão da média; $C_{\text{média}}$ = médias das medidas em triplicata para cada amostra analisada

2.2.1.3 Exatidão

A exatidão representa o grau de concordância entre os resultados encontrados na análise e um valor de referência ou teórico aceito como verdadeiro. A análise foi feita com as mesmas concentrações utilizadas para o cálculo da precisão do método e os resultados foram expressos em função da porcentagem de recuperação (E%), segundo a equação:

$$E\% = (C_{\text{obt}}/C) \times 100 \text{ (Equação 2),}$$

onde: C_{obt} = concentração obtida após a análise; C = concentração teórica

2.2.1.4 Especificidade/seletividade

Especificidade/seletividade equivale à capacidade do método de medir exatamente um composto na presença de outros componentes, tais como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz.

Para confirmar a ausência de interferência de compostos endógenos da pele de porco no tempo de retenção do ALA, uma matriz isenta de ALA (branco) e uma matriz dopada com ALA (padrão) foram comparadas. Além disso, foram injetados no CLAE os solventes utilizados para a construção das curvas analíticas. Todas as amostras foram derivatizadas.

2.2.1.5 Limite de Detecção

O Limite de Detecção (LD) corresponde à menor quantidade de analito presente em uma amostra que pode ser detectada sob as condições experimentais estabelecidas, porém não necessariamente quantificada com precisão e exatidão aceitáveis. O LD foi expresso como:

$$LD = 3,3\sigma/S \text{ (Equação 3)},$$

onde: σ = coeficiente linear da curva analítica; S = coeficiente angular da curva analítica

2.2.1.6 Limite de Quantificação

O Limite de Quantificação (LQ) corresponde à menor quantidade de analito que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas. O LQ teórico foi expresso como:

$$LQ = 10\sigma/S \text{ (Equação 4)},$$

onde: σ = coeficiente linear da curva analítica; S = coeficiente angular da curva analítica.

2.3 Estudo de liberação *in vitro*

O perfil de liberação de ALA a partir da formulação desenvolvida foi avaliado utilizando-se células de difusão do tipo *Franz* modificadas com área de perfusão de 1,77 cm² e membranas sintéticas de acetato de celulose. As membranas foram previamente hidratadas

em água deionizada a 100°C durante 5 min, por três vezes. Posteriormente, foram acopladas entre os compartimentos doador e receptor das células utilizando graxa de silicone para vedação (Figura 2).

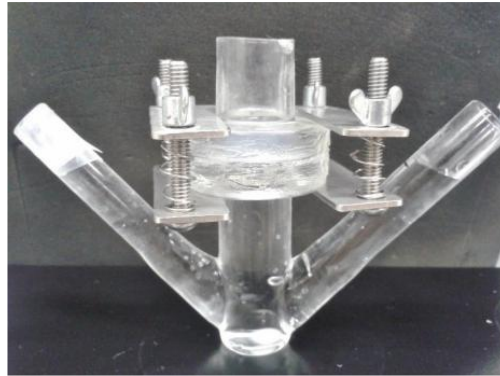


Figura 2. Célula de difusão do tipo *Franz* modificada montada para o estudo de liberação.

O compartimento receptor foi preenchido com 15 mL de PSB, pH 5, mantido à temperatura ambiente e sob agitação constante a 900 rpm com uma pequena barra magnética. Teve-se o cuidado de evitar a formação de bolhas de ar abaixo da membrana para não comprometer o processo de difusão.

No compartimento doador, foram aplicados 250 µL de NanoALA. Em intervalos de tempo de 0,25; 0,5; 0,75; 1; 1,25; 1,5; 1,75; 2; 3; 4; 5; 6; 7 e 8 h, alíquotas de 1 mL da solução receptora foram coletadas e derivatizadas para análise por CLAE. Imediatamente após a coleta, foi repostado igual volume de nova solução receptora, mantendo desta maneira o volume constante no compartimento receptor. Utilizou-se como controle 250 µL de solução aquosa de ALA a 20% (m/v). Tanto o NanoALA, quanto a solução de ALA, apresentaram pH de aproximadamente 3. Os experimentos foram realizados em quintuplicata. A quantidade de pró-fármaco liberado que se difunde através da membrana foi calculada, segundo a equação:

$$Q_{\text{realt}} = C_{\text{mensuradot}} \times V_r + V_a \times \sum^{n-1} C_a \text{ (Equação 5),}$$

onde: Q_{realt} = quantidade liberada acumulada de fármaco no tempo t ; C_{mensurat} = a concentração mensurada do fármaco da coleta no tempo t ; V_r = volume do compartimento receptor da célula de difusão; V_a = volume de amostra removido na coleta; C_a = concentração de fármaco na amostra removida.

O perfil de liberação do NanoALA e do ALA foram comparados graficamente relacionando-se a quantidade de pró-fármaco liberada (%) em função do tempo (h).

2.4 Estudo de permeação e retenção cutânea *in vitro*

Estudos de permeação e retenção cutânea foram realizados no sistema de difusão de *Franz*, exposto anteriormente, utilizando fragmentos de pele de orelha de porco como membrana separando os compartimentos doador e receptor (Figura 3).

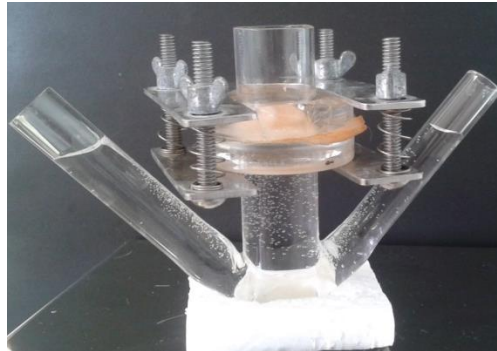


Figura 3. Célula de difusão do tipo *Franz* modificada montada para o estudo de permeação e retenção cutânea.

2.4.1 Pele

Os fragmentos de pele utilizados neste trabalho foram obtidos de orelhas de porcos saudáveis. As orelhas foram cedidas pelo frigorífico Bonasa (Brasília, Brasil) imediatamente após o abate dos animais e transportadas, sob refrigeração, para o laboratório. A pele foi limpa, removida da cartilagem, teve o tecido subcutâneo removido com o auxílio de tesoura e pinça, foi recoberta com papel-filme e armazenada a -20°C por um período máximo de dois meses (Figura 4).



Figura 4. Remoção da pele da orelha do porco: (A) A orelha é fixada em uma placa de isopor, (B) Com auxílio de um bisturi a pele é excisada, (C) O tecido adiposo adjacente é retirado com auxílio de uma tesoura. A pele de porco é recoberta com papel-filme e mantida sob refrigeração a -20°C .

2.4.2 Ensaio de recuperação de ALA a partir da pele de porco

Ensaio de recuperação foram realizados com o intuito de validar o processo de extração do ALA a partir do estrato córneo (EC), dos folículos pilosos (FP) e da epiderme remanescente + derme (EP + D).

Sobre um fragmento de pele de porco, fixou-se um *template* de plástico com área de exposição de $\sim 1 \text{ cm}^2$. O EC foi removido com auxílio de 15 pedaços de fitas adesivas. Em seguida, para a extração dos FP, adicionou-se uma gota de cola de cianoacrilato sobre a pele remanescente e um pedaço de fita adesiva foi colocado sobre a gota, pressionada por 5 min até completa polimerização da cola e removida em um único movimento. A pele fora da área de exposição do *template* foi desprezada e a parte remanescente (EP + D) foi picotada (Figura 5).

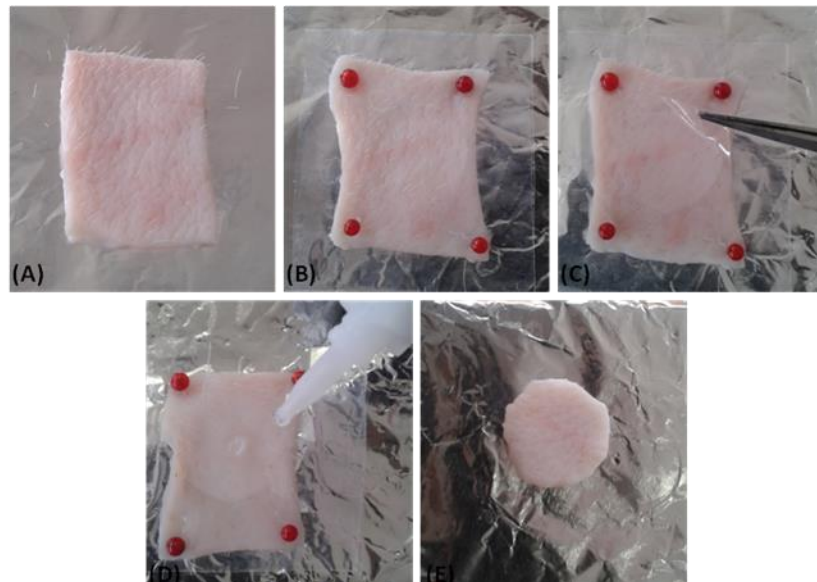


Figura 5. Separação dos estratos da pele da orelha de porco: (A) Fragmento de pele com área de $\sim 3 \text{ cm}^2$; (B) Um *template* de plástico com área de exposição de $\sim 2 \text{ cm}^2$ é fixado à pele; (C) Remoção do estrato córneo com auxílio de 15 pedaços de fita adesiva; (D) Adição de cola de cianoacrilato para remoção dos folículos pilosos e (E) Pele remanescente (EP + D) após a remoção dos folículos pilosos.

Cada um dos estratos cutâneos foi transferido para tubos Falcon de 50 mL e dopados com 500 μL de soluções metanólicas de ALA com concentrações conhecidas. Após a completa evaporação das soluções, adicionou-se 10 mL de solvente extrator e as amostras foram submetidas a diferentes processamentos para posterior quantificação por CLAE. O experimento foi realizado em triplicata para cada concentração. Os solventes e processamentos avaliados para extração de ALA da pele estão listados na Tabela 1.

Tabela 1. Métodos avaliados para recuperação de ALA retido na pele

Solvente extrator	Processamento
Ácido Acético 1% + DMSO 10% + Etanol 89%	Agitação <i>overnight</i>
DMSO	Agitação <i>overnight</i>
DMSO	Agitação <i>overnight</i> , vórtex 3 min, sonicador 10 min, turrax 2 min
MeOH	Agitação <i>overnight</i>
MeOH	Vórtex 1 min
MeOH	Banho ultrassônico 10 min e vórtex 1 min
MeOH	Agitação <i>overnight</i> , vórtex 3 min, banho ultrassônico 1 h
MeOH + TX-100 10% (1:1)	Agitação <i>overnight</i>
MeOH + TX-100 10% (1:1)	Agitação <i>overnight</i> , dupla extração (vórtex 5 min, banho ultrassônico 20 min)
MeOH + TX-100 10% (1:1)	Banho ultrassônico 15, 30, 45 e 60 min
MeOH + TX-100 10% (1:1)	Agitação <i>overnight</i> , vórtex 3 min, banho ultrassônico 1 h
MeOH + TX-100 10% (1:1)	Vórtex 2 min, banho ultrassônico 1 h, vórtex 2 min
MeOH + TX-100 20% (1:2)	Agitação <i>overnight</i> , vórtex 5 min, banho ultrassônico 20 min

*MeOH + TX-100: Metanol + Triton X-100

2.4.3 Estudo de permeação cutânea

A pele de porco foi acoplada na célula de difusão com o EC voltado para o compartimento doador. O compartimento receptor foi preenchido com 15 mL de PBS, pH 5, mantido à temperatura ambiente e sob agitação constante a 900 rpm com auxílio de uma pequena barra magnética. A pele ficou em contato com a solução receptora durante 30 min com intuito de hidratá-la antes de aplicar a formulação.

No compartimento doador foram adicionados 250 µL de NanoALA. A cada 1 h, durante um período de 8 h, uma alíquota de 1 mL de solução receptora foi sendo coletada, havendo reposição do volume com nova solução receptora. As amostras foram analisadas por CLAE e as concentrações de ALA foram estimadas a partir da curva analítica do ALA diluído em PBS. Utilizou-se 250 µL de solução aquosa de ALA a 20% (m/v) como controle. O fluxo do pró-fármaco foi determinado relacionando a quantidade de ALA permeada ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) em função do tempo (h). Os estudos foram realizados em quintuplicata para cada formulação avaliada.

2.4.4 Estudo de retenção cutânea

Após o término do tempo estabelecido para o estudo de permeação (8 h), determinou-se a quantidade de ALA que ficou retida no EC, nos FP e na EP utilizando a técnica de *tape stripping* diferencial. A pele foi retirada da célula de difusão e cuidadosamente lavada com água destilada para remover o excesso de formulação. Um *template* de plástico com área de $\sim 2 \text{ cm}^2$ foi fixado sobre a pele de modo a deixar exposta somente a área de perfusão. Os estratos foram separados conforme detalhado no item 2.4.2.

O ALA foi recuperado dos estratos de acordo com o método previamente estabelecido utilizando-se 10 mL de metanol e triton-X 100 10% (1:1 v/v), que foram adicionados aos tubos contendo o EC, os FP e a EP e, em seguida, as amostras foram agitadas por 2 min no vórtex, permaneceram 1 h no banho ultrassônico e mais 2 min de agitação no vórtex. Por fim, foram derivatizadas e filtradas com filtros Millipore com $0,2 \mu\text{m}$ de porosidade e analisadas por CLAE utilizando a curva analítica do ALA em metanol + triton X-100 10% (1:1 v/v) para estimar as concentrações. Os experimentos foram realizados em quintuplicata para cada formulação analisada.

2.5 Análise estatística

As análises estatísticas dos dados foram realizadas no programa R 3.1.2 (R Development Core Team, 2015) após a verificação das premissas estatísticas dos testes por inspeção visual dos resíduos. Diferenças significativas entre os conjuntos de dados foram verificados por Análise de Variância (ANOVA), seguida de teste de Tukey. O nível de significância estatística foi fixado como sendo $P < 0,05$.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Validação do método analítico para quantificação de ALA

A validação do método analítico é um aspecto essencial para a garantia da qualidade de análise. Por meio da validação, confirma-se que o método atende aos requisitos necessários

para assegurar a reprodutibilidade e confiabilidade dos resultados. A quantificação de ALA nos estudos de cinética de liberação e nos de permeação e retenção cutânea foi feita por meio do método de CLAE, o qual foi previamente validado em termos de linearidade, precisão, exatidão, especificidade/seletividade, limite de detecção e limite de quantificação.

Nas Figuras 6 e 7 estão apresentadas as curvas analíticas do composto fluorescente resultante da reação de derivatização do ALA em PBS (pH 5) e em metanol + triton X-100 10% (1:1), respectivamente. Os solventes foram selecionados por serem os meios a partir dos quais se pretende quantificar o ALA nos estudos de permeação, uma vez que o compartimento receptor das células de *Franz* foi preenchido com PBS e a mistura de metanol + triton foi utilizada para extração do ALA retido na pele.

Observa-se que ambas as curvas apresentaram um comportamento linear na faixa de concentração entre 0,01-5µg/mL. O coeficiente de correlação foi de 0,9994 para a curva de PBS e 0,9988 para a curva de metanol + triton, o que demonstra a linearidade do método proposto, de acordo com o que preconiza o ICH (ICH, 2005).

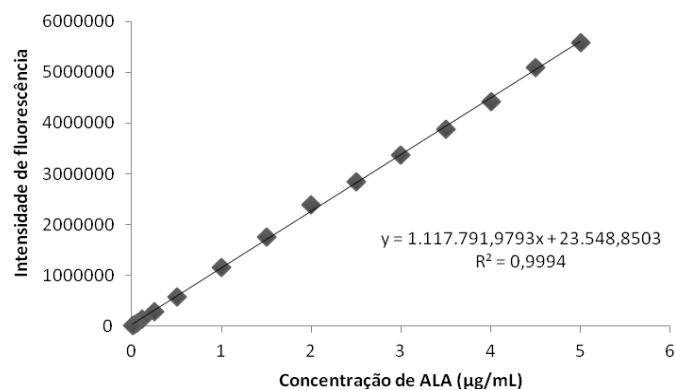


Figura 6. Representação gráfica da curva analítica para a quantificação de ALA em PBS (pH 5). Equação da reta: $y = 1.117.791,9793x + 23.548,8503$ e coeficiente de correlação linear: $r = 0,9994$

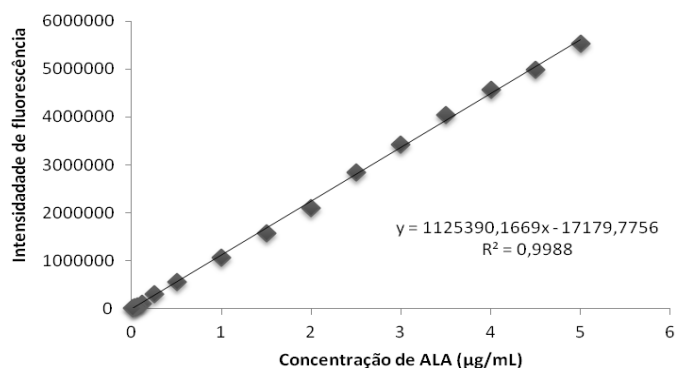


Figura 7. Representação gráfica da curva analítica para a quantificação de ALA em metanol + triton X-100 10% (1:1). Equação da reta: $y = 1.125.390,1669x - 17.179,7756$ e coeficiente de correlação linear: $r = 0,9988$.

Os valores de CV e E obtidos, que estão contidos nas Tabelas 3 e 4, demonstram que o método desenvolvido é preciso e exato (ICH, 2005). Para a curva analítica do ALA em PBS, a média de erro relativo variou de 94,92 a 101,23% (CV 0,16-1,07%) e de 109,44 a 121,26% (CV 0,26-3,95%) nas análises intra e intercorrida, respectivamente. Para a curva analítica do ALA em metanol + triton, a média de recuperação variou de 98,50 a 114,87% (CV 0,18-2,29%) e 90,77 a 114% (CV 0,58-5,72%) nas análises intra e intercorrida, respectivamente.

Tabela 2. Precisão e exatidão do método HPLC para quantificação de ALA em PBS (pH 5)

Concentração teórica (µg/mL)	Concentração experimental (µg/mL)	CV (%) ^a	E (%) ^b
Intracorrída (n=9)			
0,25	0,24	1,07	94,92
2,5	2,53	0,16	101,23
5	4,98	0,53	99,60
Intercorrída (n=9)			
0,25	0,30	3,95	121,26
2,5	2,84	1,92	113,76
5	5,47	0,26	109,44

^aPrecisão: CV% = (SD/média) x 100

^bExatidão: E% = ([] obtida/[] teórica) x 100

Tabela 3. Precisão e exatidão do método HPLC para quantificação de ALA em metanol + triton X-100 10% (1:1)

Concentração teórica (µg/mL)	Concentração experimental (µg/mL)	CV (%) ^a	E (%) ^b
Intracorrída (n=9)			
0,25	0,29	2,29	114,87
2,5	2,55	0,46	101,90
5	4,92	0,18	98,50
Intercorrída (n=9)			
0,25	0,28	5,72	114,00
2,5	2,69	3,67	107,69
5	4,54	0,58	90,77

^aPrecisão: CV% = (SD/média) x 100

^bExatidão: E% = ([] obtida/[] teórica) x 100

Os cromatogramas referentes à solução de PBS (pH 5), de metanol + triton X-100, bem como de um homogeneizado da pele em metanol + triton X-100 foram sobrepostos, demonstrando que não houve interferência dos brancos e de nenhum componente da matriz no

tempo de retenção do ALA (~8 min). Dessa forma, o método se mostrou específico/seletivo para a quantificação de ALA.

Os limites de detecção e quantificação do método foram calculados como sendo, respectivamente, 0,07 $\mu\text{g/mL}$ e 0,21 $\mu\text{g/mL}$ para a curva analítica de ALA em PBS, e 0,05 $\mu\text{g/mL}$ e 0,15 $\mu\text{g/mL}$ para a curva analítica de ALA em metanol + triton X-100.

3.2 Estudo de liberação *in vitro*

Os ensaios de cinética de liberação foram realizados *in vitro* com intuito de avaliar a capacidade do sistema nanoestruturado em sustentar a liberação do pró-fármaco em condições biológicas tumorais (pH = 5). Os perfis de liberação do ALA incorporado à nanoemulsão polimérica e o obtido a partir de uma solução aquosa contendo o pró-fármaco livre dissolvido (controle), ambos com mesma concentração de ALA e mesmo pH (~3), estão mostrados na Figura 8. A partir de 0,25 h a quantidade de pró-fármaco liberado a partir da nanoemulsão foi significativamente menor ($F_{11,36} = 25,58$; $P < 0,001$) quando comparada com a solução de ALA livre, sugerindo que a formulação nanoestruturada retarda a liberação do composto. Observa-se que em ~ 1 h, os sistemas entram em equilíbrio e, a partir deste momento, a diferença entre as massas liberadas é de cerca de 20%.

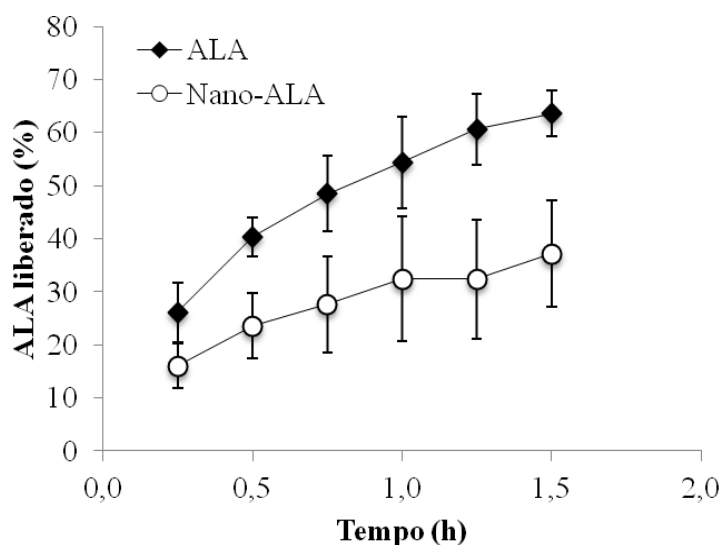


Figura 8. Perfil de liberação do ALA a partir da nanoemulsão polimérica e da solução aquosa (controle).

A análise do fluxo de liberação (Tabela 5) calculado nas primeiras 1h e 30 min de experimento evidencia que a formulação nanoestruturada sustentou a liberação de ALA em

aproximadamente 2 vezes se comparado à livre difusão do fármaco dissolvido na solução controle através da membrana de celulose. Esse fato pode ser atribuído à ancoragem das moléculas do pró-fármaco no domínio interfacial dos nanocolóides que resultou em uma diminuição da mobilidade das mesmas. Resultados similares foram relatados por Zhang et al. (2011), em que os fluxos de liberação de ALA a partir de nanoemulsões óleo em água (o/w) foram significativamente menores (7 a 646 nmol/cm²/h) quando comparados ao fluxo de uma solução aquosa (1850.76 ± 40.95 nmol/cm²/h). Ferreira (2012) também demonstrou que nanopartículas de quitosana carreando 5-ALA, com tamanho de 573 nm (± 5,7) e distribuição de tamanho homogênea (PDI = 0,37), foram capazes de retardar a liberação do fármaco cerca de 2,5 vezes, quando comparadas ao 5-ALA em PBS.

Tabela 4. Fluxo de liberação (µg/cm²/h) de ALA

Matrizes	Fluxo de liberação (µg/cm²/h)
ALA	14,57 ± 0,82
NanoALA	7,83 ± 2,16

3.3 Estudos de permeação e retenção cutânea *in vitro*

O ensaio de recuperação do ALA foi realizado previamente aos estudos de permeação e retenção cutânea com objetivo de validar o processo de extração do fármaco retido no EC, FP e na EP + D. Dentre os diversos solventes extratores avaliados, somente a mistura de metanol e triton X-100 10% (1:1) conseguiu extrair efetivamente o fármaco dos estratos da pele. Após a adição do solvente extrator, os estratos foram submetidos à agitação no vórtex durante 2 min, banho ultrassônico por 1 h e mais 2 min de agitação no vórtex. Conforme apresentado na Tabela 5, nota-se que a recuperação média no EC, FP e na EP + D foi de, aproximadamente, 84%, 80% e 73%, respectivamente. Os demais processos testados, utilizando solventes como DMSO, metanol e uma mistura de ácido acético + DMSO + etanol, apresentaram valores de recuperação ≤ 30%, estando fora do limite aceito para validação de métodos envolvendo processos extrativos.

Tabela 5. Recuperação do 5-ALA retido dos diferentes estratos da pele.

Estrato da pele	Concentração experimental de ALA ($\mu\text{g/mL}$)	Quantidade recuperada de ALA	% Recuperada de ALA
EC	0,18	0,20	109,4
	2,17	1,68	77,6
	4,65	2,97	63,9
Folículos pilosos	0,18	0,16	86,6
	2,17	1,50	69,0
	4,65	3,83	82,4
EP+D	0,18	0,17	93,2
	2,17	1,63	75,2
	4,65	2,33	50,1

Apesar dos valores obtidos para a recuperação de ALA estarem no limite aceitável para a validação de métodos extrativos, o estabelecimento da metodologia adequada para extração de ALA retido na pele sempre foi um grande desafio para os pesquisadores. No trabalho realizado por Araújo et al. (2010) são apresentados dados de permeação cutânea do ALA, mas não de retenção, provavelmente por não terem conseguido extraí-lo efetivamente. Outros trabalhos que apresentam resultados de retenção cutânea de ALA após extrações com tampão acetato (PIERRE et al., 2001), metanol (PIERRE et al., 2009; DE ROSA et al., 2003) e uma mistura de metanol + triton X-100 10% (OH et al., 2011) não reportam os valores de recuperação, inviabilizando a comparação de resultados.

Os estudos de permeação e retenção cutânea foram realizados *in vitro* utilizando células de difusão de *Franz* modificadas e pele de orelha de porco como membrana biológica, visando avaliar o impacto da nanoemulsão polimérica sobre a biodistribuição do ALA no tecido cutâneo. Schmook et al. (2001) demonstraram que a pele de porco, devido à sua semelhança estrutural e de composição com a pele humana é um bom modelo para estudos relacionados ao desenvolvimento de formulações para aplicação tópica e transdérmica.

Como mostra a Figura 9, durante um período de 8 h, não houve diferença estatisticamente significativa ($F_{1,10} = 0,083$; $P = 0,7782$) entre a quantidade de ALA permeada a partir do nanossistema em relação à solução do pró-fármaco. A partir de ~ 2,5 horas, o transporte do pró-fármaco através da pele ocorreu no estado estacionário e os fluxos de permeação foram similares: $6,97 \pm 1,82 \mu\text{g/cm}^2/\text{h}$ para o ALA em solução e de $6,43 \pm 1,85 \mu\text{g/cm}^2/\text{h}$ para o ALA em nanoemulsão. É interessante notar que essa semelhança entre os perfis de permeação do NanoALA e do ALA ocorre apesar do nanossistema retardar em aproximadamente 2 vezes o fluxo de liberação da substância. Esse fato permite hipotetizar

que ao mesmo tempo que a nanoemulsão polimérica restringe a liberação do ALA, essa mesma formulação atua na pele permeabilizando-a, de modo a anular esse efeito de retardo da liberação no momento da permeação do fármaco através da pele. Vale ressaltar que a manutenção ou redução do fluxo de permeação é uma característica desejável a fim de evitar o risco de efeitos secundários sistêmicos (PIERRE et al., 2009).

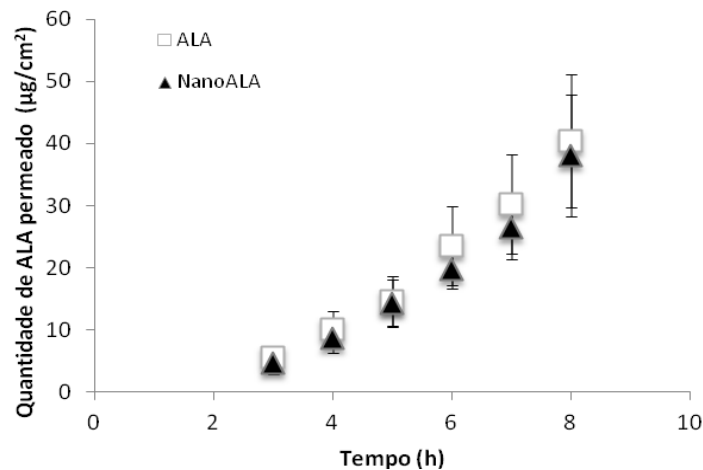


Figura 9. Perfil de permeação do ALA em pele de porco a partir da nanoemulsão polimérica e da solução aquosa (controle). *O ALA permeou a pele nas primeiras 2 h em valores abaixo do LQ do método analítico.

Decorridas as 8 h estabelecidas para o estudo de permeação, procedeu-se às análises da quantidade de ALA que penetrou a pele e permaneceu retido em suas camadas. A Figura 10 mostra que, apesar de não influenciar a permeação do ALA em relação à solução do fármaco livre, a nanoemulsão diminuiu significativamente a retenção do pró-fármaco no EC ao mesmo tempo que aumentou seu acúmulo nos FP. Trabalhos recentes reforçam a hipótese de que partículas com diâmetro ≥ 20 nm dificilmente penetram em uma pele viável através do EC, mas podem se acumular nas aberturas dos folículos pilosos (PROW et al., 2011), o que corrobora os resultados aqui apresentados.

Considerando que os folículos se estendem da epiderme até a derme, os resultados sugerem que a quantidade de ALA retida nas camadas mais profundas da pele também aumenta, o que seria apropriado para o tratamento de lesões neoplásicas mais profundas por meio da TFD.

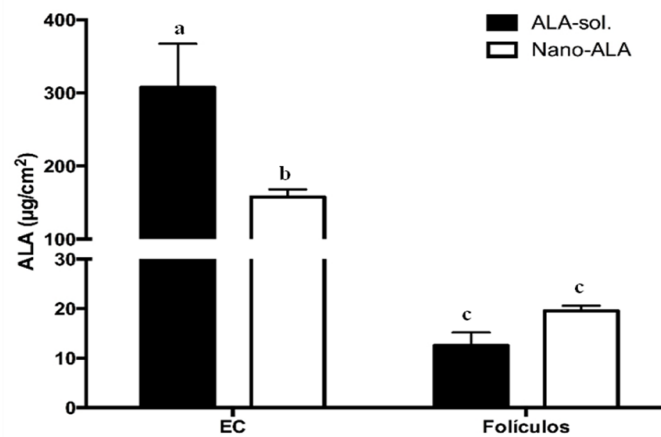


Figura 10. Quantidade de 5-ALA ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) recuperada do estrato córneo (EC) e dos folículos pilosos após 8 h de aplicação passiva de NanoALA e solução aquosa de ALA. As barras de erro indicam o desvio padrão das médias. Significância estatística indicada por ANOVA: $P < 0,05$.

Ensaio conduzido em pele de camundongo *hairless* mostrou que lipossomos com composição similar ao estrato córneo de mamíferos retardaram significativamente o fluxo de permeação de ALA, mas aumentaram a quantidade retida na EP (sem EC) + D após um período de 36 h de aplicação (PIERRE et al., 2001). Oh et al. (2011) demonstraram que lipossomos ultradeformáveis catiônicos aumentaram cerca de 7 vezes a permeação de ALA através da pele de camundongos *hairless* e, após 8 h de aplicação do pró-fármaco, a quantidade retida nas camadas mais profundas foi significativamente maior. Segundo Zhang et al. (2011), a incorporação de ALA em nanoemulsões óleo em água, usando óleo de soja como a fase oleosa, resultou em um aumento de 2,6 vezes no fluxo de ALA através da pele de porco. Embora esses trabalhos apresentem uma diversidade de protocolos experimentais (tipo/condição de pele, tempo de exposição, concentração de ALA), dificultando a comparação de resultados, todos confirmam a habilidade dos sistemas nanoestruturados em maximizar a penetração cutânea de ALA.

Juntos, os resultados permitem inferir que as nanocápsulas de PLGA facilitam a passagem de ALA através das membranas biológicas. Isso explicaria a maior quantidade de pró-fármaco retido nas camadas mais profundas da pele e uma taxa de permeação semelhante à solução aquosa, apesar de apresentar um menor fluxo de liberação. Na solução aquosa, praticamente 70% da massa de ALA foi liberada dentro 1,5 horas, mas a maior fração ficou retida no EC.

4. CONCLUSÃO

A nanoemulsão polimérica desenvolvida promove a liberação sustentada de ALA e maior penetração cutânea comparada ao pró-farmacólio livre. A manutenção de ALA em níveis terapêuticos nos tecidos tumorais é um efeito desejado para a TFD, pois permite a redução das doses administradas e da frequência de aplicação necessárias para atingir o efeito esperado. Além disso, mais sessões de irradiação podem ser realizadas com uma única aplicação do pró-farmacólio, otimizando o tratamento. A capacidade de penetração cutânea aumentada também gera perspectivas de aplicação da TFD-NanoALA para, além do câncer de pele superficial, também para lesões oncológicas mais profundas.

REFERÊNCIAS

- ARAÚJO, L.M.P.C.; THOMAZINE, J.A.; LOPEZ, R.F.V. Development of microemulsions to topically deliver 5-aminolevulinic acid in photodynamic therapy. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v.75, p.48-55, 2010.
- CERIZE, N.N.P. Estudo de sistemas nanocarreadores para o ácido 5-aminolevulínico com aplicação na terapia fotodinâmica. 2012. 48 f. Tese de doutorado da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-USP, 2012.
- DE ROSA, F.S.; TEDESCO, A.C.; LOPEZ, R.F.V.; PIERRE, M.B.R.; LANGE, N.; MARCHETTI, J.M.; ROTTA, J, C.G.; BENTLEY, M.V.L.B. *In vitro* skin permeation and retention of 5-aminolevulinic acid ester derivatives for photodynamic therapy. *Journal of Controlled Release*, v.89, p. 261–269, 2003.
- ESCOBAR-CHÁVEZ, J.J.; DÍAZ-TORRES, R.; RODRÍGUEZ-CRUZ, I.M.; DOMÍNGUEZ-DELGADO, C.L.; MORALES, R.S.; ÁNGELES-ANGUIANO, E.; MELGOZA-CONTRERAS, L. Nanocarriers for transdermal drug delivery. *Research and Reports in Transdermal Drug Delivery*, v.01, p.3–17, 2012.
- FERREIRA, D.M. Estudos de sistemas nanocarreadores para o ácido 5-aminolevulínico (5-ALA) e seu éster derivado (8-ALA) aplicados na Eletroquimioterapia e Terapia Fotodinâmica contra câncer de pele. 2012. 93f. Tese de Doutorado da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP, 2012.
- ICH. ICH Topic Q2 (R1) Validation of Analytical Procedures : Text and Methodology. *Int. Conf. Harmon.* 1994, v.17, 2005.
- MAISCH, T., SANTARELLI, F., SCHREML, S., BABILAS, P. & SZEIMIES, R.-M. Fluorescence induction of protoporphyrin IX by a new 5-aminolevulinic acid nanoemulsion used for photodynamic therapy in a full-thickness ex vivo skin model. *Exp. Dermatol.*, v.19, p.302–305, 2009.
- OH, E.K.; JIN, S.E.; KIM, J.K.; PARK, J.S.; PARK, Y.; KIM, C.K. Retained topical delivery of 5-aminolevulinic acid using cationic ultradeformable liposomes for photodynamic therapy. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.44, p.149–157, 2011.

- OISHI, H., NOMIYAMA, H., NOMIYAMA, K. & TOMOKUNI, K. Fluorometric HPLC determination of 5-aminolevulinic acid (ALA) in the plasma and urine of lead workers: biological indicators of lead exposure. *J. Anal. Toxicol.*, v.20, 1996.
- PASSOS, S.K. Terapia fotodinâmica com ácido 5-amino-levulínico em nanoemulsão no tratamento de queratoses actínicas e câncer de pele não melanoma: estudo clínico. Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Patologia Molecular, FS, UnB, 2013.
- PASSOS, S.K.; DE SOUZA, P.E.N.; SOARES, P.K.P.; EID, D.R.M.; PRIMO, F.L.; TEDESCO, A.C.; LACAVA, Z.G.M.; MORAIS, P.C. Quantitative approach to skin field cancerization using a nanoencapsulated photodynamic therapy agent: a pilot study. *Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology*, v.06, p. 51–59, 2013.
- PIERRE, M.B.R.; LOPEZ, R.F.V.; BENTLEY, M.V.L.B. Influence of ceramide 2 on *in vitro* skin permeation and retention of 5-ALA and its ester derivatives, for Photodynamic Therapy. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.45, p.109-116, 2009.
- PIERRE, M.B.R.; TEDESCO, A.C.; MARCHETTI, J.M.; BENTLEY, M.V.L.B. Stratum corneum lipids liposomes for the topical delivery of 5-aminolevulinic acid in photodynamic therapy of skin cancer: preparation and *in vitro* permeation study. *BMC Dermatology*, p.1-5, 2001
- PROW, T. W. *et al.* Nanoparticles and microparticles for skin drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, v.63, p.470–491 .2011.
- SCHMOOK, P.F.; MEINGASSNER, G.J.; BILLICH, A. Comparison of human skin or epidermis models with human and animal skin *in vitro* percutaneous absorption. *International Journal of Pharmaceutics*, v.215, p.51-56, 2001.
- SHI, L.; WANG, X.; ZHAO, F.; LUAN, H.; TU, Q.; HUANG, Z.; WANG-HAO; WANG-HONGWEI. *In vitro* evaluation of 5-aminolevulinic acid (ALA) loaded PLGA nanoparticles. *International Journal of Nanomedicine*, v.08, p.2669–2676, 2013.
- ZHANG, L.W.; AL-SUWAYEH, S.A.; HUNG, C.F.; CHEN, C.C.; FANG, J.Y. Oil components modulate the skin delivery of 5-aminolevulinic acid and its ester prodrug from oil-in-water and water-in-oil nanoemulsions. *International Journal of Nanomedicine*, v.06, p.693–704, 2011.

CAPÍTULO 2

AVALIAÇÃO *IN VITRO* DOS MECANISMOS ANTI-TUMORIGÊNICOS E EFICÁCIA
DO NANOALA, UMA NANOFORMULAÇÃO DE ÁCIDO AMINOLEVULÍNICO
PROJETADA PARA TERAPIA FOTODINÂMICA ANTICÂNCER

In vitro assessment of anti-tumorigenic mechanisms and efficacy of NanoALA, a nanoformulation of aminolevulinic acid designed for photodynamic therapy of cancer

Este capítulo será apresentado na forma de artigo já publicado

RESUMO

Introdução: O desenvolvimento de nanocarreadores é uma importante abordagem para aumentar a biodisponibilidade de fármacos hidrofílicos em células-alvo. Neste trabalho, avaliamos os mecanismos anti-tumorigênicos e a eficácia do NanoALA, uma nova nanoformulação de ácido aminolevulínico (ALA) à base de nanocápsulas de poli(ácido láctico-co-glicólico) (PLGA) projetadas para terapia fotodinâmica (TFD) anticâncer.

Métodos: Para isto, foram realizados testes de caracterização físico-química, cinética de incorporação de pró-fármaco, ensaios de biocompatibilidade e fotocitotoxicidade, análise do tipo de morte celular e função mitocondrial, mensuração da produção intracelular de espécies reativas de oxigênio e análise de fragmentação de DNA em células de carcinoma mamário murino (4T1).

Resultados: A formulação NanoALA, estável durante um período de 90 dias após a síntese, apresentou diâmetro hidrodinâmico de $220 \pm 8,7$ nm, potencial zeta de -30,6 mV e baixo valor de índice de polidispersividade (0,28). Os ensaios biológicos indicaram que o produto nanoestruturado promove maior captação de ALA por células 4T1 e, conseqüentemente, mais citotoxicidade na TFD. Pela primeira vez na literatura científica, há um relato de eficácia terapêutica de, aproximadamente, 80% após apenas 1 hora de incubação com pró-fármaco a $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (equivalente a 0,6 mM de ALA). As mitocôndrias são, provavelmente, o alvo inicial do tratamento, culminando em desordens do metabolismo energético e morte celular por apoptose.

Conclusões: NanoALA surge como uma estratégia promissora para TFD anticâncer. Além de ser eficaz contra uma linhagem celular tumoral altamente agressiva, o tratamento pode ser economicamente vantajoso porque permite uma redução na dose e na frequência de aplicação comparado ao ALA livre.

Palavras-chave: ácido aminolevulínico (ALA), terapia fotodinâmica (TFD), nanocarreadores, poli(ácido láctico-co-glicólico) (PLGA), carcinoma mamário

ABSTRACT

Background: The development of nanocarriers is an important approach to increase the bioavailability of hydrophilic drugs in target cells. In this work, we evaluated the anti-tumorigenic mechanisms and efficacy of NanoALA, a novel nanoformulation of aminolevulinic acid (ALA) based on poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) nanocapsules designed for anticancer photodynamic therapy (PDT).

Methods: For this purpose, physicochemical characterization, prodrug incorporation kinetics, biocompatibility and photocytotoxicity tests, analysis of the cell death type and mitochondrial function, measurement of the intracellular reactive oxygen species production and DNA fragmentation were performed in murine mammary carcinoma (4T1) cells.

Results: NanoALA formulation, stable over a period of 90 days following synthesis, presented hydrodynamic diameter of 220 ± 8.7 nm, zeta potential of -30.6 mV and low value of polydispersity index (0.28). The biological assays indicated that the nanostructured product promotes greater ALA uptake by 4T1 cells and consequently more cytotoxicity in the PDT process. For the first time in the scientific literature, there is a therapeutic efficacy report of approximately 80%, after only 1 h of incubation with $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ prodrug (0.6 mM ALA equivalent). The mitochondria are probably the initial target of treatment, culminating in energy metabolism disorders and cell death by apoptosis.

Conclusions: NanoALA emerges as a promising strategy for anticancer PDT. Besides being effective against a highly aggressive tumor cell line, the treatment may be economically advantageous because it allows a reduction in the dose and frequency of application compared to free ALA.

Keywords: Aminolevulinic-acid (ALA), photodynamic therapy (PDT), nanocarriers, poly(lactide-co-glycolide) (PLGA), mammary carcinoma.

1. INTRODUCTION

Aminolevulinic acid (ALA) is commonly used in photodynamic therapy (PDT) and detection (PDD) as a precursor of protoporphyrin IX (PpIX), a potent fluorescent photosensitizer. ALA is the naturally occurring first intermediate in the heme synthesis pathway, and its exogenous administration results in overproduction and preferential accumulation of PpIX in cells undergoing high metabolic turnover, providing therapeutic selectivity for dysplastic and neoplastic cells [1–7]. Upon irradiation at specific wavelength, the PpIX in triplet state reacts with molecular oxygen or other biomolecules in surrounding areas, producing reactive oxygen species (ROS), which can cause irreversible oxidative damage and trigger apoptotic and necrotic cell death [8–11].

An important advantage of PpIX relative to other photosensitizers is its fast clearance of the body – it lasts no longer than 48 h. Subsequently, it induces low cytotoxicity in the absence of irradiation [12–14]. However, some clinical drawbacks come from ALA, the precursor prodrug of PpIX. Due to its zwitterionic and hydrophilic nature, ALA is unstable in physiological environments and presents limitations in its transport across skin or cell membranes, thus restricting the effectiveness of ALA-mediated PDT in the treatment of preneoplastic or superficial diseases [2,15,16]. To overcome these drawbacks, different tools and strategies for improving the pharmacokinetic profile were proposed, such as application of ferrochelatase inhibitors [17], use of skin permeability enhancers [18], iontophoresis technique [19] or the use of more lipophilic ALA ester derivatives [20].

A relatively new and exciting concept for targeted and effective PDT, especially in the oncology field, is the incorporation of ALA into nanodelivery systems. In theory, these systems offer advantages over other approaches, because besides bypassing lipophilic barriers they can protect labile molecules from degradation and promote selective delivery to the target sites, avoiding possible toxic effects on healthy cells [5,11,21]. For instance, poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) is one of the most studied synthetic polymers for the development of delivery systems due to its excellent biocompatibility, biodegradability, and approval for human use by the US FDA [22–24].

Although about twenty ALA nanocarriers have been designed in the last two decades [3,5,7,12–14,21,25–37], to the best of our knowledge, only two reports are found about the use of PLGA-based nanoparticles for ALA delivery. In one of them, ALA-loaded amorphous PLGA nanoparticles were effectively internalized by squamous cell carcinoma, and its

photocytotoxicity was more efficient than that presented by free ALA [38]. However, a long exposure period (24 h) was necessary to achieve a more pronounced therapeutic effect. Furthermore, this sample presented some physicochemical characteristics that are undesirable for medical purposes, such as high polydispersity index (PDI 0.62) and low loading capacity (LC $0.62\% \pm 0.27\%$), which could lead to multiscattering phenomena and particle aggregation. In the other report, conducted by our group [2], ALA-loaded PLGA nanocapsules (NanoALA) showed high stability and better properties than ALA derivative methyl aminolevulinate (MAL) for photodetection and treatment of field cancerization associated with actinic keratosis and skin photodamage, using only 2 h of occlusion.

Even with these positive results, the study of the effects and mechanism of action of ALA as a nanoparticle is of great importance before recommending NanoALA-PDT for broad clinical use, including safety and regulation issues. The necessity for deeper knowledge of NanoALA encouraged us to investigate the biological action, the therapeutic efficacy/efficiency and the anti-tumorigenic mechanisms of NanoALA-PDT in a new preclinical experimental model. Although PDT is usually focused on skin cancer, the investigation of PDT on another type of cancer represents an expansion for its applications.

Considering that a human cell line develops only in immunosuppressed mice and that there is evidence that the immune system plays a key role in response to PDT [39,40], murine mammary carcinoma (4T1) cells were chosen as a therapeutic target, especially due to the high carcinogenic and invasive ability of this cell line, capable of inducing tumors analogous to stage IV human breast cancer [41]. Considering also that breast cancer is the most frequent cancer in women and that each year there are 458,000 deaths related to this cancer for lack of early diagnosis and effective treatment [42], this work may contribute to the understanding of a new safe and noninvasive treatment option, while expanding and directing future studies related to the use of nanotechnology strategies in the field of oncology.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 The preparation of NanoALA

NanoALA is an oil-in-water (o/w) polymeric nanoemulsion prepared by a spontaneous emulsification process following the protocol described elsewhere [2]. In brief, an organic phase containing poly(lactide-co-glycolide) (PLGA), egg-phosphatidylcholine lipids (50:50

w/w polymer:lipids) and ALA (Dye Pharmaceuticals, São José dos Campos, São Paulo, Brazil) in a 20% final concentration was prepared at 55°C. This organic phase was added into the aqueous phase containing the anionic surfactant, poloxamer 188 (Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA) under controlled magnetic stirring. Lastly, the organic solvents were removed by evaporation under reduced pressure at 60°C for a period of 6 h.

2.2 Characterization

The average size, polydispersity index, and zeta potential of the systems were investigated by dynamic light scattering (DLS) and electrophoretic measurement (Malvern Instruments[®], Nano ZS ZEN3600, UK). The analyses were performed with a He–Ne laser operating at 633 nm, scattering angle of 173°, and temperature of 25.0 ± 0.1°C. For stability analysis, the formulations were stored at 4°C and characterized by DLS for 90 days following synthesis.

2.3 Cell culture

4T1 mouse mammary tumor cell line (ATCC – CRL-2539[™]) was cultured in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Gibco[®] Life Technologies, Ltd., USA) supplemented with 10% (v/v) fetal bovine serum (Gibco[®] Invitrogen[™], USA) and 100 IU.mL⁻¹ penicillin and 100 µg.mL⁻¹ streptomycin (Sigma–Aldrich). Cell cultures were routinely maintained in a humidified atmosphere containing 5% CO₂ at 37°C.

2.4 Uptake profile of NanoALA in 4T1 cells

4T1 cells (5×10⁴ cells/well) were seeded in 24-well plates and cultured for 24 h. After being washed twice with phosphate buffered saline (PBS), cells were incubated, under light protection, with 200 µL serum-free medium (SFM) containing 6.25 µg.mL⁻¹ and 200 µg.mL⁻¹ NanoALA. SFM was used to avoid the ATP-binding cassette transporter-mediated PpIX efflux from the cell [43]; the absence of serum during treatment did not cause cell death or morphological abnormalities. However, after treatment, the cells were incubated in complete

medium for 24 h before the tests were performed. Each hour for a period of 10 h and at 24 h, the protoporphyrin IX (PpIX) fluorescence was determined using IVIS LUMINA® imaging system (XRIII model, PerkinElmer, USA) in excitation and emission conditions: 420–620 λ_{ex} - λ_{em} . Data were corrected for autofluorescence background by cells not exposed to the PpIX precursors. All experiments were performed under the same conditions with free ALA solutions for comparison purposes.

2.5 Comparison of ALA- and NanoALA-mediated photocytotoxicity on 4T1 cells

4T1 cells were seeded in 96-well plates at a density of 1×10^4 cells/ well and cultured for 24 h. Attached cells were washed twice with PBS solution and incubated with 200 μL SFM containing NanoALA in concentrations ranging from 6.25 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ to 200 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ for 0.5 h, 1 h, 6 h or 24 h. Dark toxicity was determined by removing the treatment solutions, followed by PBS washing and culture medium reestablishment for 24 h. To perform PDT treatment, cells were irradiated in PBS by a 630 nm wavelength Light Emitting Diode (LED) at a power density of 24.9 mW/cm^2 and fluency of 22.44 J/cm^2 . Following irradiation, cells were incubated in complete medium for another 24 h. The potential cytotoxic effect was determined by (4,5-dimethylthiazol-2-yl)- 2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay. MTT solution (0.5 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 150 $\mu\text{L}/\text{well}$) was added to the wells, and the cells were incubated for 2 h at 37 °C in a CO₂ incubator. Dimethyl sulfoxide (DMSO, 200 $\mu\text{L}/\text{well}$) was added to dissolve the formazan crystals produced after discarding the supernatant. The absorbance values were measured in a spectrophotometer with a microplate reader (Molecular Devices SpectraMax M2®, USA) at 595 nm. No baseline correction was applied at log wavelength. Unloaded PLGA nanocapsules were tested previously and showed no toxicity [2,44,45], as expected [22–24].

2.6 Effects of NanoALA-PDT on 4T1 cell morphology

As the MTT assay does not discriminate between cytostatic and cytotoxic activities, and nor does it differentiate the viable cells from cells in the early death process, the effect of the NanoALA-mediated PDT on 4T1 cells was investigated by phase contrast microscopy (Invitrogen EVOS FL Auto Cell Imaging System, Thermo Fisher Scientific, USA). First, the

4T1 cells (1×10^5 cell/well) grown in 6-well-plate were incubated with $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ NanoALA for 1 h. After 24 h of PDT (as described above), the morphological changes were examined and recorded at $200\times$ total magnification.

2.7 Assessment of anti-tumorigenic mechanisms of NanoALA

NanoALA-induced cell death profile, mitochondrial membrane potential, ROS production and DNA fragmentation analyses were performed by flow cytometry. The ideal concentration for these analyses should generate two cell populations (live and dead), preferably equidistributed. For practical convenience, the shortest incubation time in which the NanoALA-PDT was able to reduce about 50% of cell viability was chosen. Briefly, at 24 h post-treatment, cells were harvested by trypsinization (0.25% trypsin-EDTA; Sigma). Cell pellets were washed with 1 mL of ice-cold PBS and re-suspended in an appropriate buffer for incubation with specific markers. The samples were immediately analyzed by flow cytometry (FACSVerse, BD, USA) equipped with FlowJo[®] vX 0.7 software. A total of 10,000 events per sample were analyzed. The forward scatter (FSC) and side scatter (SSC) of particles were simultaneously measured and cell debris was excluded.

2.7.1 Apoptotic cells staining by annexin-V/propidium iodide

To explore the mechanism underlying the reduction of 4T1 cell viability, the modes of cell death (apoptosis or necrosis) induced by NanoALA-PDT were determined by the AnnexinV-FITC/PI staining method, according to the manufacturer's instructions (BD, USA/Probes – Thermo Fisher, USA). Cell pellets were re-suspended in 400 μL binding buffer [10 mM HEPES/NaOH (pH 7.4), 140 mM NaCl, 2.5 mM CaCl_2] and incubated with 5 μL of Annexin-V/FITC solution for 15 min at room temperature in the dark. After that, the cells were incubated for an additional 5 min with 10 μL propidium iodide (PI; $20 \mu\text{g.mL}^{-1}$).

2.7.2 Analysis of mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi\text{m}$)

The mitochondrial function was monitored using rhodamine 123, a cationic lipophilic fluorochrome that can accumulate in active mitochondria. The fluorescence intensity is proportional to the mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi_m$). Mitochondrial leakage often results in the opening of membrane permeability transition pores and dissipation of the $\Delta\psi_m$ [46], which promotes the efflux of rhodamine from mitochondria. To perform the analysis, the cells resuspended in 1 mL PBS were incubated with 1 μL of Rhodamine 123 solution (5 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$; Probes – Thermo Fisher, USA) for 15 min at room temperature in the dark. They were then washed twice with PBS and immediately analyzed.

2.7.3 Detection of intracellular reactive oxygen species (ROS)

Production of a significant amount of intracellular ROS is an important indicator of PDT efficiency [26]. The effect of treatment with NanoALA-PDT on the intracellular ROS level was determined by the cell-permeable CellROX Green[®] reagent, which exhibits a strong fluorescent signal upon oxidation in the nucleus and cytoplasm of living cells. The cell suspension was incubated with 2 μL of CellROX Green[®] solution (250 μM ; Molecular Probes[®]) for 40 min at 37°C, protected from light. During the final 5 min of staining, 10 μL propidium iodide (PI, 20 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) was added. Cells treated with 20 μM hydrogen peroxide (H_2O_2) for 30 min were used as positive control.

2.7.4 DNA fragmentation

Cells were fixed in 70% ethanol at -20°C for 24 h. After centrifugation (5 min, 10 °C, 2000 rpm), the supernatant was removed and the cells were incubated with 200 μL of lysis buffer containing PI and RNase (0.1% sodium citrate, 0.1% TritonX-100, 20 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ propidium iodide, 250 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ RNase) for 30 min at room temperature.

2.8 Statistical analysis

Data were expressed as mean \pm SEM. Differences among groups were tested by two-way ANOVA. Comparisons between the groups were evaluated using Tukey's multiple comparisons test. A value of $P < 0.05$ was considered significant.

3. RESULTS

3.1 Particle size, zeta potential and physical-chemical stability

Table 1 shows the sample NanoALA physical-chemical characteristics obtained by DLS and electrophoretic measurement. As a result of ALA nanoencapsulation, an increase in the average hydrodynamic diameter (from 180 ± 2.8 nm to 220 ± 8.7 nm) and a reduction in the zeta potential (from -28.5 mV to -30.6 mV) were observed when compared to unloaded nanocapsules (Nano). The low value of polydispersity index (0.28) denotes the monodisperse system. Over a period of 90 days following synthesis, the NanoALA formulation remained stable in terms of hydrodynamic size and polydispersity index (PdI) (Fig. 1).

Table 1. Particle size analyses for Nano-ALA formulations from dynamic light scattering technique (DLS)

	Size, nm	PdI	Zeta, mV
Nano unloaded	180 ± 2.8	0.23	- 28.5
Nano-ALA	220 ± 8.7	0.28	-30.6

*Statistical analyses from triplicate of different batches for each formulation (n = 3)

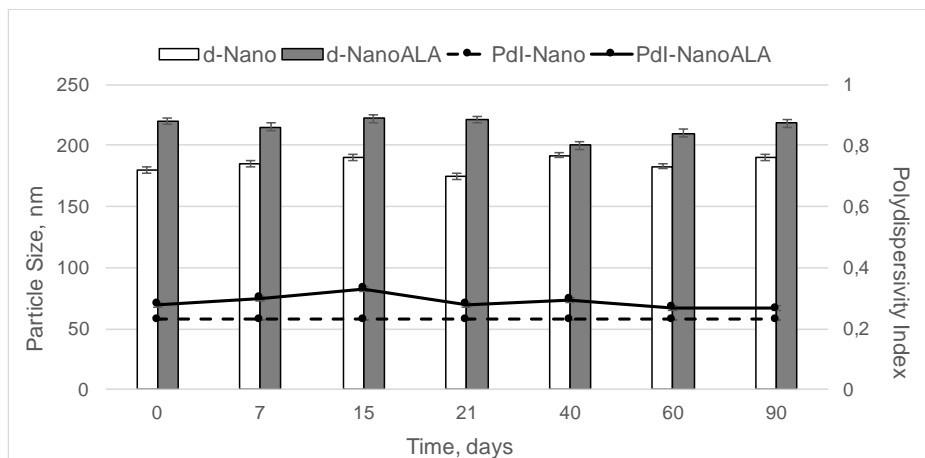


Figure 1. Physical-chemical stability of Nano and NanoALA formulations (unloaded and loaded with aminolevulinic acid, respectively) obtained from DLS analyses until 90 days after synthesis (n=3).

3.2 PpIX fluorescence measurements

The influence of prodrug concentration and exposure time on the 4T1 cell uptake rate was evaluated by the fluorescence intensity of PpIX production (Fig. 2). At the lowest concentration ($6.25 \mu\text{g.mL}^{-1}$), there was no considerable PpIX production by cells incubated in the dark with ALA or NanoALA, over all the period analyzed. The highest concentration ($200 \mu\text{g.mL}^{-1}$) of ALA led to a subtle amount of PpIX only after 24 h. At this time, the fluorescence intensity was around four times higher in cells incubated with NanoALA. It is important to note that the NanoALA uptake did not progressively increase. The PpIX production increased by approximately 50% in 1 h and 30% in 6 h, which was enough to generate a different cytotoxic effect.

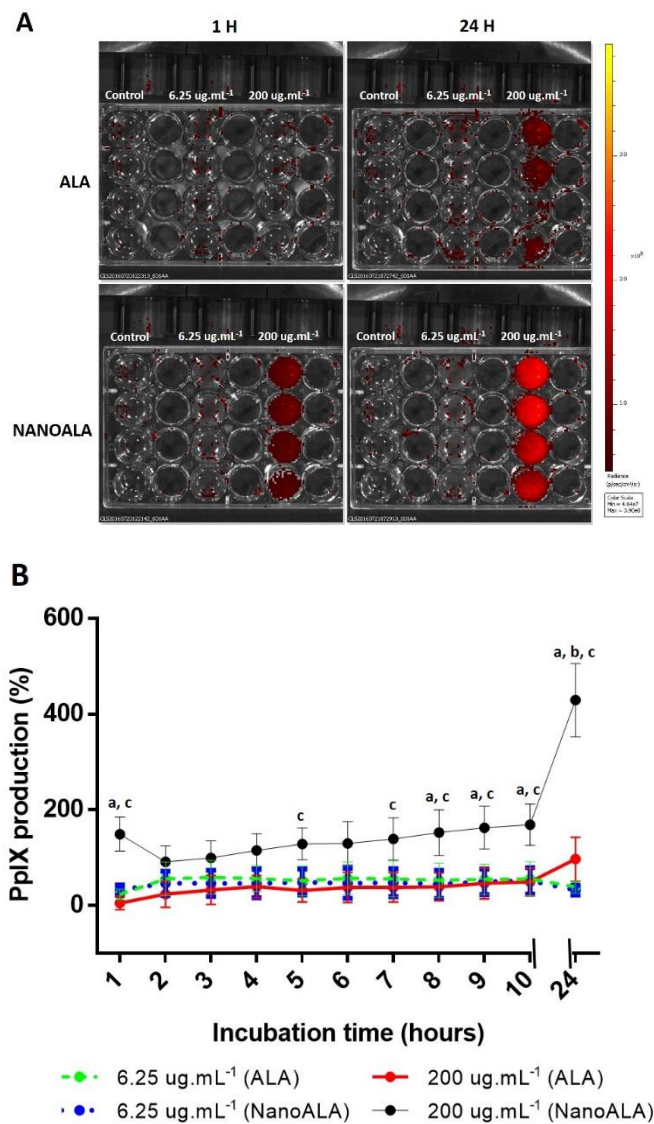


Figure 2. Protoporphyrin IX (PpIX) fluorescence measurements in 4T1 cells. (A) Image representative of the intensity of PpIX fluorescence after 1 h and 24 h of incubation with ALA or NanoALA in the absence of light determined by IVIS LUMINA[®] imaging system (420–620 $\lambda_{\text{ex}}-\lambda_{\text{em}}$). (B) Data were corrected for autofluorescence and presented as mean \pm standard deviation; (n=4). Note that the time scale between 10 h and 24 h is longer than the other times. Statistical significance was determined by two-way ANOVA ($P < 0.05$). The letters indicate significant differences detected by Tukey's multiple comparisons test. ^aComparisons between 6.25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ NanoALA and 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ NanoALA at the same incubation times; ^bComparisons between different incubation times with 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ NanoALA; ^cComparisons between 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ NanoALA and 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ALA at the same incubation times.

3.3 NanoALA biocompatibility

To test the effects of NanoALA on 4T1 cells, the MTT assay was first performed under dark conditions. In agreement with the PpIX fluorescence measurements, the results indicate that the NanoALA biocompatibility is dependent on both concentration and exposure time (Fig. 3, DARK). Incubation for 0.5, 1 and 6 h with both samples (ALA and NanoALA) had no effects on the cell viability, and the reduction was about 10% for all concentrations tested. However, after 24 h of incubation with high concentrations of NanoALA there was a significant loss of cell viability. NanoALA at concentrations of 50, 100 and 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ reduced, respectively, about 15%, 40% and 63% of cell viability compared to control group (cells without treatment). ALA alone did not affect the cell viability in the same conditions.

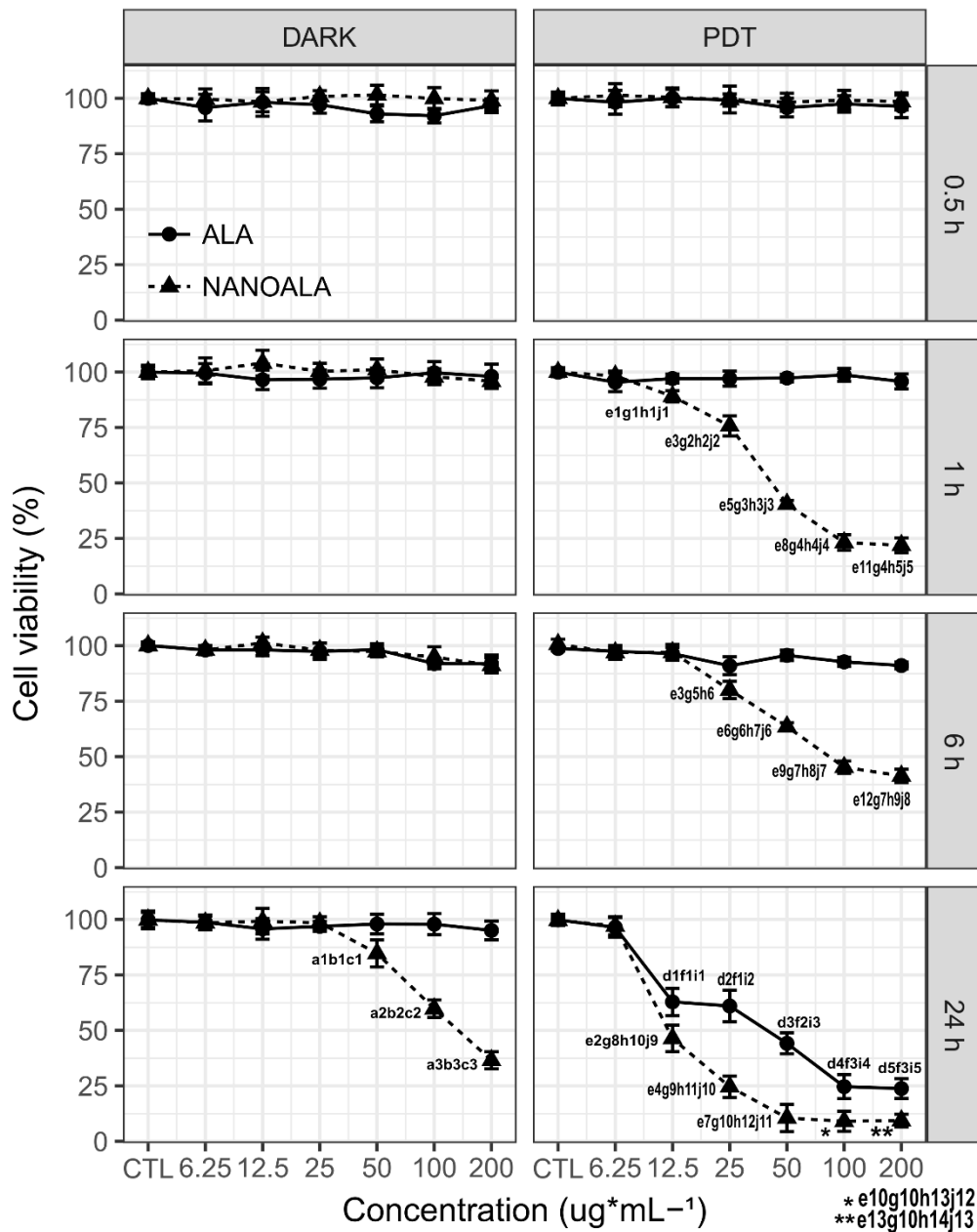


Figure 3. NanoALA- and ALA-mediated photodynamic therapy effect on viability of the 4T1 cells determined by MTT ((4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) assay. Cells were incubated with NanoALA (▲) or ALA (●) at concentrations ranging from 6.25 to 200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ for different periods of time (0.5 h to 24 h) in the presence and absence of light. Data were presented as mean \pm standard deviation from three independent experiments. Statistical significance was determined by two-way ANOVA ($P < 0.05$). The letters indicate the types of comparisons made and the numbers indicate the significant differences between the comparisons detected by Tukey's multiple comparisons test. ^aComparisons between different incubation times with the same concentrations of NanoALA in the dark; ^bComparisons between different concentrations of NanoALA at the same incubation time in the dark; ^cComparisons between ALA and NanoALA at the same concentrations and at the same incubation time in the dark; ^dComparisons between different incubation times with the same concentrations of ALA-PDT; ^eComparisons between different incubation times with the same concentrations of NanoALA-PDT; ^fComparisons between different concentrations of ALA-PDT at the same incubation time; ^gComparisons between different concentrations of NanoALA-PDT at the same incubation time; ^hComparisons between ALA-PDT and NanoALA-PDT at the same concentrations and at the same incubation time; ⁱComparisons between ALA in the dark and ALA-PDT at the same concentrations and at the same incubation time; ^jComparisons between NanoALA in the dark and NanoALA-PDT at the same concentrations and at the same incubation time.

3.4 NanoALA-PDT efficiency and cell morphology

The PDT treatment using concentrations higher than $6.25 \mu\text{g.mL}^{-1}$ NanoALA was photocytotoxic when the incubation times were 1, 6 and 24 h, while the ALA solutions were photocytotoxic only after 24 h of incubation (Fig. 3, PDT). After 1 h of NanoALA incubation, the cell viability was reduced from 11% ($12.5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ NanoALA) to 78% ($200 \mu\text{g.mL}^{-1}$ NanoALA), and the living cells showed morphological abnormalities, such as cell shrinkage, membrane damage, and innumerable cytoplasmic vacuoles (Fig. 4). The NanoALA-mediated photocytotoxicity after 6 h of incubation was significantly lower than in 1 h for the same concentrations, except in the concentration of $25 \mu\text{g.mL}^{-1}$, which did not present a significant difference. For example, the inhibitory rate decreased from 78% at 1 h to 59% at 6 h using $200 \mu\text{g.mL}^{-1}$ NanoALA. After 24 h of incubation the cytotoxic effect of NanoALA was enhanced dramatically. At $12.5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ NanoALA the viability was reduced to 46%, reaching 90% reduction in the higher concentrations ($\geq 50 \mu\text{g.mL}^{-1}$). ALA-mediated photocytotoxicity was significantly lower than the NanoALA. About 56% to 76% of viability was reduced in ALA concentrations $\geq 50 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Together, these results evidence the enhanced efficacy of NanoALA-mediated PDT compared to the free ALA-PDT, since a much longer incubation time was required for ALA to achieve a similar effect to 1 h of incubation with NanoALA.

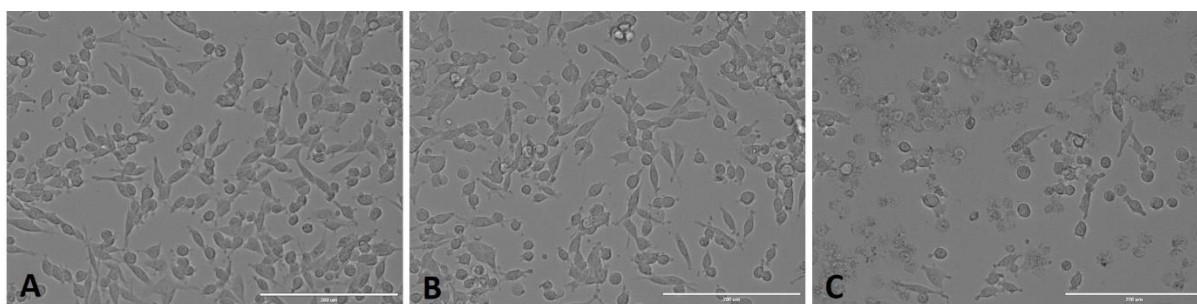


Figure 4. Effect of photodynamic therapy (PDT) on the morphology of 4T1 cells incubated for 1 h with $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ NanoALA or ALA before irradiation. The untreated cells (A) and cells treated with ALA-PDT (B) displayed a standard shape with no cell death. Cells treated with NanoALA-PDT (C) present evident morphological abnormalities. Scale: 200 μm .

3.5 Analysis of the cell death profile

Figure 5 indicates the percentage of intact 4T1 cells (unmarked), cells in early apoptosis with intact membranes (AnnexinV-FITC⁺), late apoptosis/necrosis (PI⁺/AnnexinV-

FITC⁺) and necrotic cells (PI⁺) after different treatments. In the absence of irradiation, 4T1 cells incubated with 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ALA or NanoALA for 1 h did not show any significant increase in the percentage of apoptotic and/or necrotic cells compared to the control. It is important to note that irradiation alone does not sensitize cells or induce cell death, excluding a possible thermal effect of light, observed by MTT as well. After NanoALA-PDT, the percentages of early apoptotic cells (8%) and late apoptotic/necrotic cells (16%) were significantly higher than in the control group. NanoALA-PDT probably induces plasma membrane alterations that culminate in a loss of integrity at subsequent times, as was observed in microscopy images (Fig. 4).

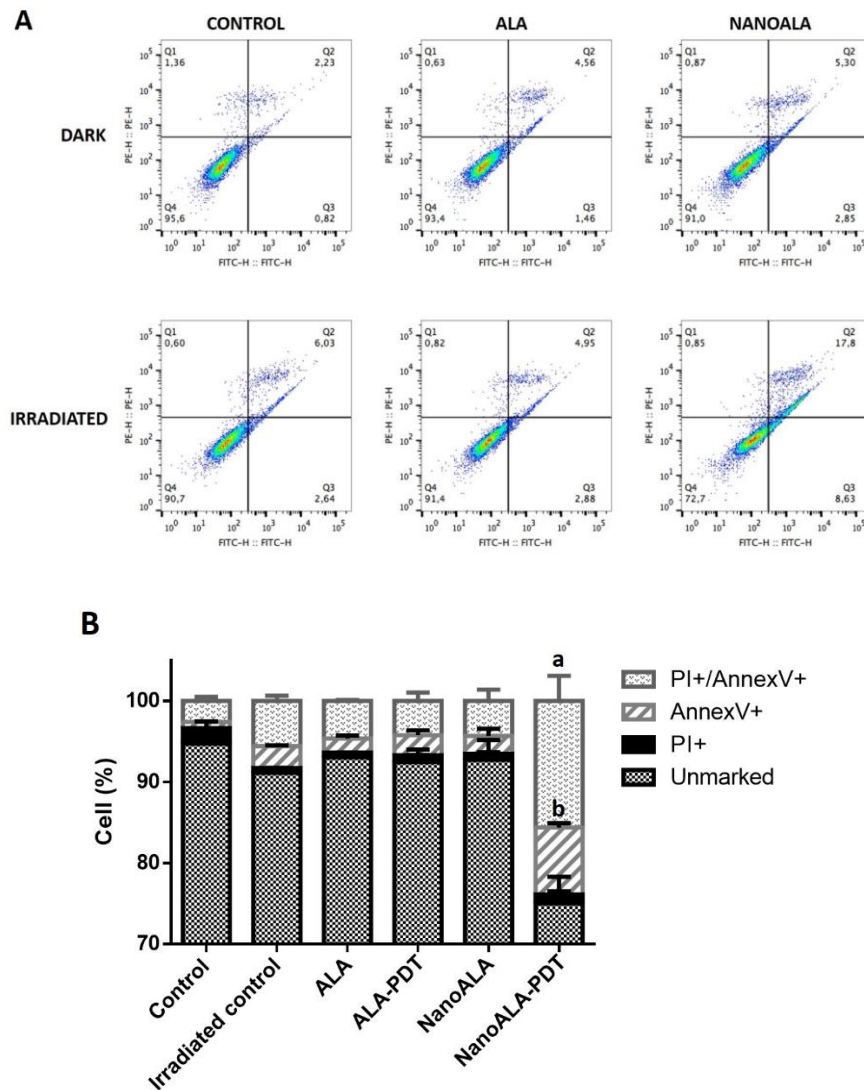


Figure 5. (A) Cell death profile after treatment with 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ NanoALA or ALA for 1 h in the absence or presence of irradiation. 4T1 cells were labeled with annexin-V FITC (AnnexV) and propidium iodide (PI) after treatment. Cell populations marked: intact (Q4 – unmarked), early apoptotic (Q3 – AnnexV⁺), late apoptotic/necrotic (Q2 – PI⁺/AnnexV⁺). (B) Results were expressed as mean \pm SD for two independent experiments. P values were generated by ANOVA using Tukey's multiple comparisons ($P < 0.05$). ^aSignificant

difference between late apoptotic/necrotic cells of the NanoALA-PDT group and control or treated groups; ^bSignificant difference between early apoptotic cells of the NanoALA-PDT group and control or treated groups.

3.6 Analysis of mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi_m$)

Consistent with mitochondrial leakage, the results indicated that the $\Delta\psi_m$ of 4T1 cells was significantly reduced from 97% to 78% by NanoALA-PDT treatment, compared with irradiated control. Treatment with NanoALA or ALA in the dark and ALA-PDT did not induce changes in $\Delta\psi_m$ (Fig. 6).

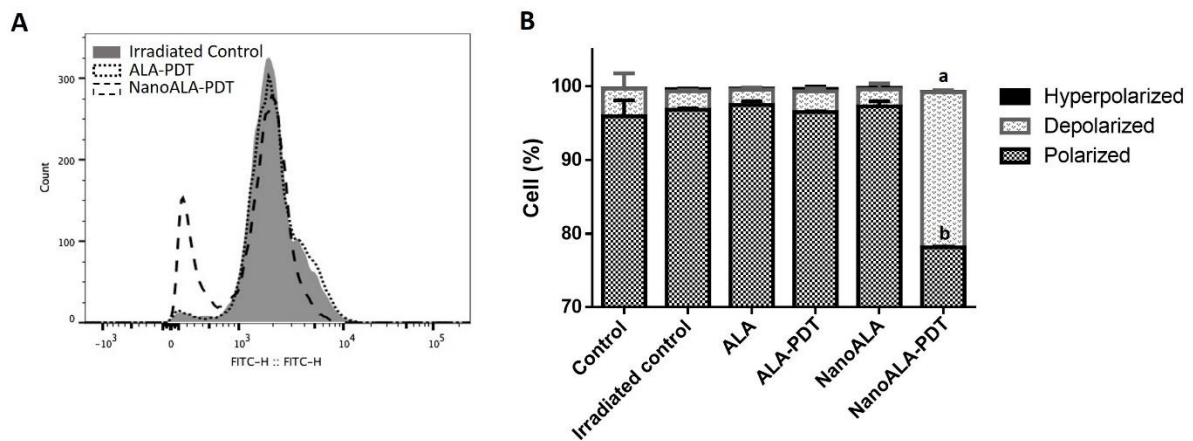


Figure 6. Analysis of the mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi_m$) by flow cytometry. (A) Representative fluorescence histogram of the $\Delta\psi_m$ of cells treated with 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ NanoALA or ALA for 1 h in the presence of irradiation and stained with Rhodamine 123. Loss of the Rhodamine 123 dye accumulation indicates dissipation of $\Delta\psi_m$. (B) Bar graphs represent % of polarized (normal $\Delta\psi_m$), depolarized (dissipation of $\Delta\psi_m$) and hyperpolarized cells (enhanced $\Delta\psi_m$). Values are mean \pm SD for two independent experiments. Statistical significance was determined by ANOVA and Tukey's test for multiple comparisons ($P < 0.05$). ^aSignificant differences between depolarized cells of the NanoALA-PDT group and control or treated groups; ^bSignificant differences between polarized cells of the NanoALA-PDT group and control or treated groups.

3.7 Reactive oxygen species (ROS) measurement

Figure 7 represents the amount of ROS produced per living cell. The remaining cells of the NanoALA-PDT group had about two times more ROS compared to the other groups evaluated, indicating that the NanoALA sample led to a much greater increase in the ROS level than free ALA after irradiation. It is important to note that in the dark, NanoALA does not increase the production of cytotoxic ROS.

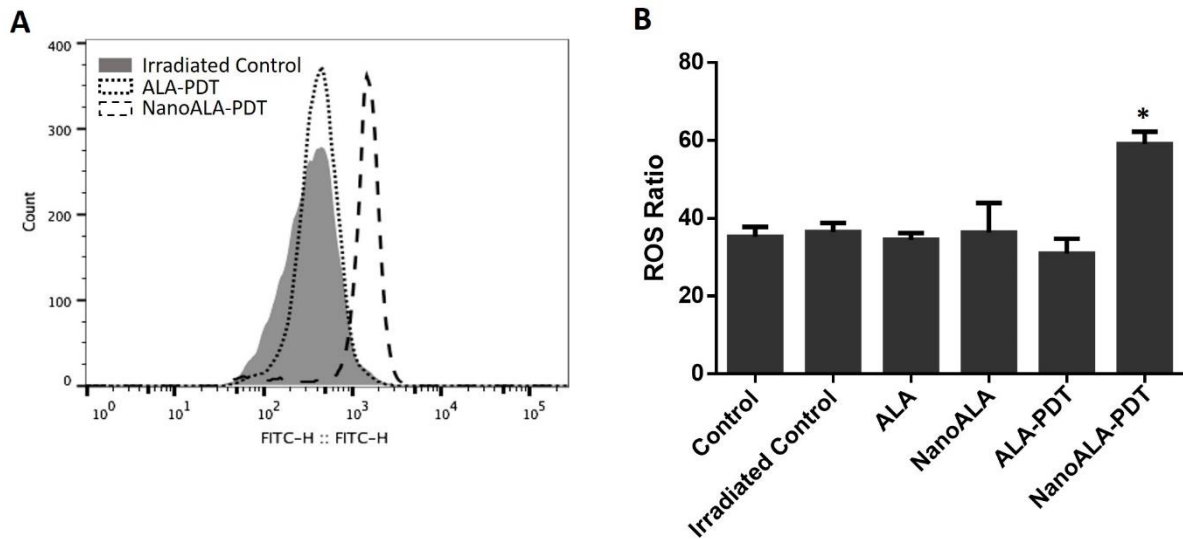


Figure 7. Detection of intracellular reactive oxygen species (ROS) in 4T1 cells by flow cytometry. (A) Representative fluorescence histogram of the ROS levels detected by CellROX Green[®] reagent after exposure to 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ NanoALA or ALA for 1 h in the presence of irradiation. (B) Bar graphs represent the ROS ratio (ROS production/live cells). Values are mean \pm SD for two independent experiments. Statistical significance was determined by ANOVA and Tukey's test for multiple comparisons ($P < 0.05$). Asterisks indicate significant differences compared to control and treated groups.

3.8 DNA fragmentation

To further characterize the growth inhibitory effects observed by MTT assay, DNA fragmentation analyses were performed. As shown in Fig. 8, NanoALA-PDT resulted in an increase in DNA fragmentation by approximately 12-fold compared to the control, probably causing a blockage in the G1 phase of the cell cycle.

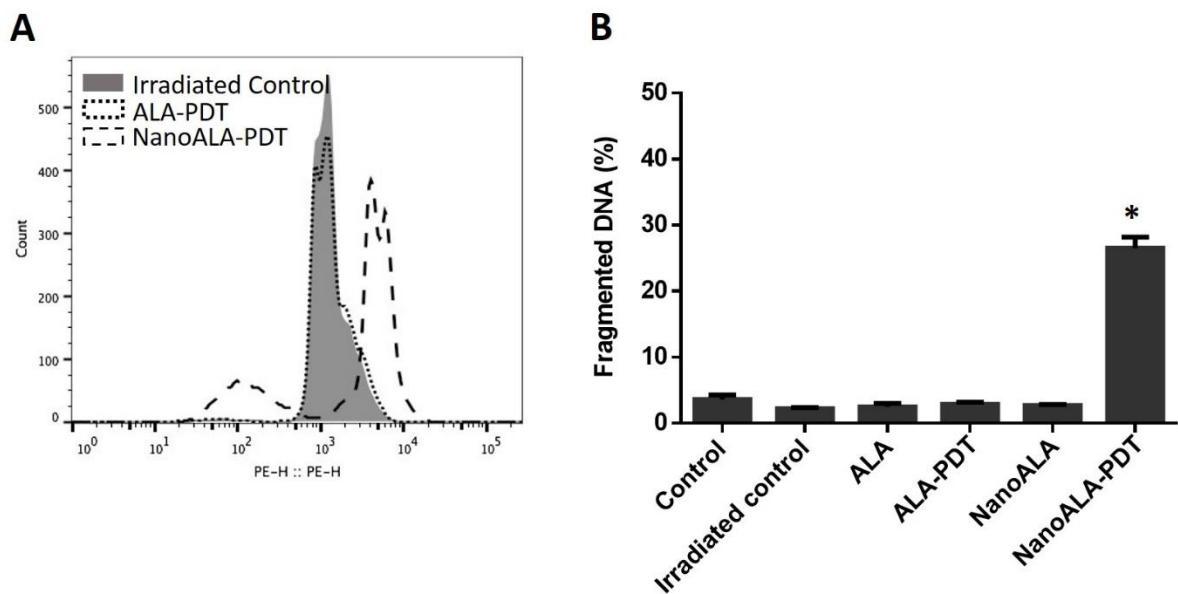


Figure 8. (A) Analysis of DNA integrity after treatments with 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ NanoALA or ALA for 1 h in the presence of irradiation. (B) Bar graphs represent % of fragmented DNA. Values are mean \pm SD for two independent experiments. Statistical significance was determined by ANOVA and Tukey's test for multiple comparisons ($P < 0.05$). Asterisks indicate significant differences compared to control and treated groups.

4. DISCUSSION

This work aimed to evaluate the biocompatibility of PLGA-nanocapsules loaded with ALA (NanoALA) and their efficacy/efficiency in mediating PDT in a highly carcinogenic and invasive *in vitro* model. The results demonstrate that the highly stable-as-produced nanocarrier promotes greater uptake of the prodrug by 4T1 cells. As a result, in a short incubation time – equivalent to 1 h – up to 70% more cells were killed than following the use of ALA-PDT. It is notable that in this period, NanoALA is biocompatible even at the highest concentrations tested. As expected, after irradiation the NanoALA sample led to a much greater increase in the level of reactive oxygen species than ALA, an important indicator of PDT efficiency.

Under physiological conditions ALA undergoes dimerization. The unprotonated amino group reacts with the ketone group from the neighboring molecule to form products such as 3,6-dihydropyrazine-2,5-dipropanoic acid (DHPY) and 2,5-(β -carboxyethyl)pyrazine (PY), resulting in a loss of biological activity [5,47,48]. So, it is possible that a free ALA fraction has been degraded in the culture medium, which would, at least in part, explain the restricted ALA transport rate to the intracellular environment and the insufficient PpIX production to overload the heme biosynthesis pathway and generate cytotoxicity at shorter exposure times. In contrast, the anchoring of the prodrug molecules in the interfacial domain of the PLGA nanocapsules can increase their stability [2] and favor a higher uptake via endocytosis, compared to the conventional uptake of free ALA via active transport [11,38].

Although the nanovehicle favored the incorporation of prodrug into the cells, the photocytotoxic effect of NanoALA did not progress continuously, and milder effects were observed at 6 h of incubation in comparison to 1 h. The existence of transporters that cause PpIX efflux, such as ABCG2, an ATP-binding cassette transporter, as well as the conversion of PpIX to heme in the presence of iron by the enzyme ferrochelatase, discourage the accumulation of FS and, therefore, reduce the PDT efficacy [43]. The PpIX was probably partially metabolized or exported during the first hours of incubation, causing a slight

reduction in fluorescence between 1 h and 6 h. Albeit not significant, this may have been enough to generate different cytotoxic effects.

The mechanism underlying the anti-tumorigenic effect of PDT is modulated by multiple factors, but low doses of PDT and photosensitizer located in mitochondria usually direct cells towards apoptosis, whereas high doses of PDT and photosensitizer localized in plasma membrane and lysosomes cause necrosis [10]. Our results confirm that PpIX-loaded mitochondria are the initial targets of NanoALA-photoinduced damage. Most likely, mitochondrial leakage caused by oxidative stress resulted in dissipation of the $\Delta\psi_m$ and alterations in energy metabolism, particularly in the failure of oxidative phosphorylation and progressive depletion of adenosine triphosphate (ATP), triggering cell death via apoptosis. An increase in DNA fragmentation is a common feature of apoptotic cells, which reinforces our conjecture.

We searched the scientific literature for the effectiveness of ALA-mediated PDT conjugated to nanoparticles (assessed by MTT cell viability assay) (see Table 2). In most of the papers presented, the irradiation is often carried out following 4–6 h of incubation with nanostructured ALA. This is the first work to show a reduction in cell viability of approximately 80% in just one hour of incubation, with a relatively low concentration of NanoALA ($100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ – 0.6 mM ALA equivalent). More interestingly, the use of NanoALA reduced by 4 times the required ALA concentration for inducing the same therapeutic effect. These results are very convenient for clinical practice, because NanoALA-mediated PDT will avoid the probable adverse effects on healthy tissues, in addition to reducing the operational cost for the health system.

Table 2. Effectiveness of ALA-mediated PDT conjugated to nanoparticles assessed by MTT cell viability assay: a review

Author	ALA nanocarriers	Concentration	Exposure time	Irradiation conditions	Cell line	% Cell viability (best condition)
Battah et al. (2001) [12]	Dendrimers (D16 and D21)	0.1 mM and 0.5 mM	4 h	Power density: 40mW/cm ² Energy density: 5 J/cm ²	PAM 212	20% (D21- 0.5 mM)
Oo et al. (2008) [26]	Gold nanoparticles	1 mM	4 h	Light source: 150 w halogen lamp for 1 min	NHDF HT 1080	30%
Huang et al. (2011) [30]	Dendrimer-modified multi-walled carbon nanotubes	0–100 µM	24 h	Energy density: 4.35 J/cm ²	MGC-803	10% (>30 µM)
Xu et al. (2012) [33]	Cationic gold nanoparticles	1, 2 and 3 mM	4h	Power density: 1 mW/cm ² Time: 1 h Light sources: - Mercury lamp - Purple LEDs - Green LEDs - Red LEDs	K562	30% (Green LEDs – 2 and 3 mM)
Benito et al. (2013) [14]	Gold nanoparticles: - ALA–AuNP1 (14-nm-diameter) - ALA–AuNP2 – (136nm of diameter)	200 µM	4 h	Power density: 40mW/cm ² Time: 7 min λ: 640 nm, Distance: 8 cm from the cells	HeLa	19.1% (ALA–AuNP2)
Mohammadi et al. (2013) [34]	Gold nanoparticles	1 mM	4H	Light source: He-Ne laser Energy density: 20, 40, 60 and 80 J/cm ²	MeL-Rm	~30% (60 J/cm ²)
Chung et al. (2013) [21]	Methoxy polyethylene glycol/chitosan (PEG-Chito) copolymer	0.1 mM	24 h	Light source: 635 nm LED Energy density: 0.6, 1.2, and 1.8 J/cm ²	CT26	30% (1.8 J/cm ²)
Rodriguez et al. (2015) [13]	Dendrimers carrying 6 and 9 ALA residues (6m-ALA and 9m-ALA)	0.025 mM	3h	Energy density: 0.15 J/cm ² – LM3 cell Energy density: 0.6 J/cm ² – HMEC-1 and Raw264.7	LM3 HMEC-1 Raw264.7	0% (LM3 cell -9m-ALA) 0% (Raw264.7)
Zhang et al. (2015) [36]	5-ALA-GNPs	2 mM	6h	Energy density: 24 J/cm ² Light source: - 502-nm LED - 635-nm Laser - Xenon lamp	K562	~30% (LED)
Feng et al. (2016) [37]	CIS/ZnS QDs-ALA (Quantum dots-ALA conjugates)	1 mM and 2 mM	4 h	Light source: Femtosecond laser with pulse widths of 50 fs Power: 100 Mw Time: 120 seconds	MCF-7	<40% (2mM)
Wu et al. (2017) [7]	Thiolated stealth peptide and hydrazone-containing ALA to gold nanoparticles	50 µg/mL	4 h	Light source: 635 nm laser Power: 500 mW Times: 0.5 min to 10 min.	A549	25% (5 min light irradiation)
Shi et al. (2013) [38]	ALA loaded poly(lactic-co-glycolic acid) nanoparticles	0.1 mM	6 h and 24 h	Light source: 632.8 nm helium-neon laser Power density: 8.6 mW/cm ² Energy density: 8 J/cm ²	A431	20% (24 h)

5. CONCLUSION

Aminolevulinic acid-loaded PLGA nanocapsules, denominated NanoALA, emerge as a promising strategy for anti-cancer PDT. It was evidenced that the nanostructured end product enhances the stability of the prodrug under physiological conditions and promotes greater uptake by 4T1 tumor cells. These results are convenient for clinical practice, in terms of efficacy and efficiency, where shorter exposure times and lower concentration are desired to achieve the expected therapeutic effect with minimal adverse effects. Now other biological parameters such as biodistribution, biocompatibility and *in vivo* efficacy should be investigated to complement this study and to ensure the safe and broad clinical use of NanoALA-mediated PDT.

REFERENCES

- [1] Ramanujam, Preferential accumulation of 5-aminolevulinic acid-induced protoporphyrin IX in breast cancer: a comprehensive study on six breast cell lines with varying phenotypes, *J. Biomed. Opt.* 15 (2010) 18002–18008. doi:10.1117/1.3302811.
- [2] S.K. Passos, P.E. de Souza, P.K. Soares, D.R. Eid, F.L. Primo, A. Cláudio Tedesco, Z.G. Lacava, P.C. Morais, Quantitative approach to skin field cancerization using a nanoencapsulated photodynamic therapy agent: a pilot study, *Clin. Cosmet. Investig. Dermatol.* 6 (2013) 51–59. doi:10.2147/CCID.S36758.
- [3] S.-J. Yang, F.-H. Lin, H.-M. Tsai, C.-F. Lin, H.-C. Chin, J.-M. Wong, M.-J. Shieh, Alginate-folic acid-modified chitosan nanoparticles for photodynamic detection of intestinal neoplasms, *Biomaterials.* 32 (2011) 2174–2182. doi:10.1016/j.biomaterials.2010.11.039.
- [4] X. Yang, P. Palasuberniam, D. Kraus, B. Chen, Aminolevulinic Acid-Based Tumor Detection and Therapy: Molecular Mechanisms and Strategies for Enhancement, *Int. J. Mol. Sci.* 16 (2015) 25865–25880. doi:10.3390/ijms161025865.
- [5] I. Miletto, E. Bottinelli, A. Siviero, D. Fabbri, P. Calza, G. Berlier, Mesoporous nanocarriers for the loading and stabilization of 5-aminolevulinic acid, *J. Nanoparticle Res.* 18 (2016) 227. doi:10.1007/s11051-016-3535-6.
- [6] C. Thunshelle, R. Yin, Q. Chen, M.R. Hamblin, Current Advances in 5-Aminolevulinic Acid Mediated Photodynamic Therapy, *Curr. Dermatol. Rep.* 5 (2016) 179–190. doi:10.1007/s13671-016-0154-5.
- [7] J. Wu, Y. Lin, H. Li, Q. Jin, J. Ji, Zwitterionic stealth peptide-capped 5-aminolevulinic acid prodrug nanoparticles for targeted photodynamic therapy, *J. Colloid Interface Sci.* 485 (2017) 251–259. doi:10.1016/j.jcis.2016.09.012.
- [8] S.M. Banerjee, A.J. MacRobert, C.A. Mosse, B. Periera, S.G. Bown, M.R.S. Keshtgar, Photodynamic therapy: Inception to application in breast cancer, *The Breast.* 31 (2017)

- 105–113. doi:10.1016/j.breast.2016.09.016.
- [9] U. Chitgupi, Y. Qin, J.F. Lovell, Targeted Nanomaterials for Phototherapy, *Nanotheranostics*. 1 (2017) 38–58. doi:10.7150/ntno.17694.
- [10] U. Chilakamarthi, L. Giribabu, Photodynamic Therapy: Past, Present and Future, *Chem. Rec.* (2017). doi:10.1002/tcr.201600121.
- [11] E.J. Hong, D.G. Choi, M.S. Shim, Targeted and effective photodynamic therapy for cancer using functionalized nanomaterials, *Acta Pharm. Sin. B*. 6 (2016) 297–307. doi:10.1016/j.apsb.2016.01.007.
- [12] S.H. Battah, C.-E. Chee, H. Nakanishi, S. Gerscher, A.J. MacRobert, C. Edwards, Synthesis and Biological Studies of 5-Aminolevulinic Acid-Containing Dendrimers for Photodynamic Therapy, *Bioconjug. Chem.* 12 (2001) 980–988. doi:10.1021/bc010027n.
- [13] L. Rodriguez, P. Vallecorsa, S. Battah, G. Di Venosa, G. Calvo, L. Mamone, D. Saenz, M.C. Gonzalez, A. Batlle, A.J. MacRobert, A. Casas, Aminolevulinic acid dendrimers in photodynamic treatment of cancer and atheromatous disease, *Photochem. Photobiol. Sci.* 14 (2015) 1617–1627. doi:10.1039/C5PP00126A.
- [14] M. Benito, V. Martin, M.D. Blanco, J.M. Teijon, C. Gomez, Cooperative effect of 5-aminolevulinic acid and gold nanoparticles for photodynamic therapy of cancer, *J Pharm Sci.* 102 (2013) 2760–2769. doi:10.1002/jps.23621.
- [15] E. Rud, O. Gederaas, A. Høgset, K. Berg, 5-Aminolevulinic Acid, but not 5-Aminolevulinic Acid Esters, is Transported into Adenocarcinoma Cells by System BETA Transporters, *Photochem. Photobiol.* 71 (2000) 640. doi:10.1562/0031-8655(2000)071<0640:AABNAA>2.0.CO;2.
- [16] C. Gómez, M. Benito, I. Katime, J.M. Teijón, M.D. Blanco, In vitro transdermal and biological evaluation of ALA-loaded poly(N-isopropylacrylamide) and poly(N-isopropylacrylamide-co-acrylic acid) microgels for photodynamic therapy, *J. Microencapsul.* 29 (2012) 626–635. doi:10.3109/02652048.2012.676091.
- [17] J. Yang, Y. Xia, X. Liu, S. Jiang, L. Xiong, Desferrioxamine shows different potentials for enhancing 5-aminolaevulinic acid-based photodynamic therapy in several cutaneous cell lines, *Lasers Med. Sci.* 25 (2010) 251–257. doi:10.1007/s10103-009-0721-0.
- [18] F.S. De Rosa, J.M. Marchetti, J.A. Thomazini, A.C. Tedesco, M.V.L.B. Bentley, A vehicle for photodynamic therapy of skin cancer: influence of dimethylsulphoxide on 5-aminolevulinic acid in vitro cutaneous permeation and in vivo protoporphyrin IX accumulation determined by confocal microscopy, *J. Control. Release.* 65 (2000) 359–366. doi:10.1016/S0168-3659(99)00213-8.
- [19] R.F. V Lopez, M.V.L.B. Bentley, M.B. Delgado-Charro, R.H. Guy, Iontophoretic Delivery of 5-Aminolevulinic Acid (ALA): Effect of pH, *Pharm. Res.* 18 (2001) 311–315. doi:10.1023/A:1011050829531.
- [20] F.S. De Rosa, A.C. Tedesco, R.F.V. Lopez, M.B. Riemma Pierre, N. Lange, J.M. Marchetti, J.C. Gomes Rotta, M.V. Lopes Badra Bentley, In vitro skin permeation and retention of 5-aminolevulinic acid ester derivatives for photodynamic therapy, *J. Control. Release.* 89 (2003) 261–269. doi:10.1016/S0168-3659(03)00125-1.
- [21] C.W. Chung, K.D. Chung, Y. Il Jeong, D.H. Kang, 5-aminolevulinic acid-incorporated nanoparticles of methoxy poly(ethylene glycol)-chitosan copolymer for photodynamic therapy, *Int. J. Nanomedicine.* 8 (2013) 809–819. doi:10.2147/IJN.S39615.

- [22] R.A. Jain, The manufacturing techniques of various drug loaded biodegradable poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) devices, *Biomaterials*. 21 (2000) 2475–2490. doi:10.1016/S0142-9612(00)00115-0.
- [23] J.-M. Lü, X. Wang, C. Marin-Muller, H. Wang, P.H. Lin, Q. Yao, C. Chen, Current advances in research and clinical applications of PLGA-based nanotechnology, *Expert Rev. Mol. Diagn.* 9 (2009) 325–341. doi:10.1586/erm.09.15.
- [24] H.K. Makadia, S.J. Siegel, Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) as Biodegradable Controlled Drug Delivery Carrier, *Polymers (Basel)*. 3 (2011) 1377–1397. doi:10.3390/polym3031377.
- [25] M.B.R. Pierre, A.C. Tedesco, J.M. Marchetti, M.V.L.B. Bentley, Stratum corneum lipids liposomes for the topical delivery of 5-aminolevulinic acid in photodynamic therapy of skin cancer: preparation and in vitro permeation study, *BMC Dermatol.* 1 (2001) 5. doi:10.1186/1471-5945-1-5.
- [26] M.K. Khaing Oo, X. Yang, H. Du, H. Wang, 5-aminolevulinic acid-conjugated gold nanoparticles for photodynamic therapy of cancer, *Nanomedicine*. 3 (2008) 777–786. doi:10.2217/17435889.3.6.777.
- [27] T. Maisch, F. Santarelli, S. Schreml, P. Babilas, R.-M. Szeimies, Fluorescence induction of protoporphyrin IX by a new 5-aminolevulinic acid nanoemulsion used for photodynamic therapy in a full-thickness ex vivo skin model, *Exp. Dermatol.* 19 (2009) e302–e305. doi:10.1111/j.1600-0625.2009.01001.x.
- [28] S.-J. Yang, M.-J. Shieh, F.-H. Lin, P.-J. Lou, C.-L. Peng, M.-F. Wei, C.-J. Yao, P.-S. Lai, T.-H. Young, Colorectal cancer cell detection by 5-aminolaevulinic acid-loaded chitosan nano-particles, *Cancer Lett.* 273 (2009) 210–220. doi:10.1016/j.canlet.2008.08.014.
- [29] S.-J. Yang, F.-H. Lin, K.-C. Tsai, M.-F. Wei, H.-M. Tsai, J.-M. Wong, M.-J. Shieh, Folic Acid-Conjugated Chitosan Nanoparticles Enhanced Protoporphyrin IX Accumulation in Colorectal Cancer Cells, *Bioconjug. Chem.* 21 (2010) 679–689. doi:10.1021/bc9004798.
- [30] P. Huang, J. Lin, D. Yang, C. Zhang, Z. Li, D. Cui, Photosensitizer-loaded dendrimer-modified multi-walled carbon nanotubes for photodynamic therapy, *J. Control. Release*. 152 (2011) e33–e34. doi:10.1016/j.jconrel.2011.08.105.
- [31] E. Kyung Oh, S.-E. Jin, J.-K. Kim, J.-S. Park, Y. Park, C.-K. Kim, Retained topical delivery of 5-aminolevulinic acid using cationic ultradeformable liposomes for photodynamic therapy, *Eur. J. Pharm. Sci.* 44 (2011) 149–157. doi:https://doi.org/10.1016/j.ejps.2011.07.003.
- [32] L.-W. Zhang, saleh A. Al-suwayeh, chi-F. hung, chih-chieh chen, J.-Y. Fang, Oil components modulate the skin delivery of 5-aminolevulinic acid and its ester prodrug from oil-in-water and water-in-oil nanoemulsions, *Int. J. Nanomedicine*. 6 (2011) 693–704. doi:10.2147/IJN.S17524.
- [33] H. Xu, C. Liu, J. Mei, C. Yao, S. Wang, J. Wang, Z. Li, Z. Zhang, Effects of light irradiation upon photodynamic therapy based on 5-aminolevulinic acid–gold nanoparticle conjugates in K562 cells via singlet oxygen generation, *Int. J. Nanomedicine*. 7 (2012) 5029–5038. doi:10.2147/IJN.S33261.
- [34] Z. Mohammadi, A. Sazgarnia, O. Rajabi, S. Soudmand, H. Esmaily, H.R. Sadeghi, An in vitro study on the photosensitivity of 5-aminolevulinic acid conjugated gold nanoparticles, *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* 10 (2013) 382–388.

- doi:10.1016/j.pdpdt.2013.03.010.
- [35] A.J. Plaunt, K.M. Harmatys, K.A. Hendrie, A.J. Musso, B.D. Smith, Chemically triggered release of 5-aminolevulinic acid from liposomes, *RSC Adv.* 4 (2014) 57983–57990. doi:10.1039/C4RA10340H.
- [36] Z. Zhang, S. Wang, H. Xu, B. Wang, C. Yao, Role of 5-aminolevulinic acid-conjugated gold nanoparticles for photodynamic therapy of cancer, *J. Biomed. Opt.* 20 (2015) 51043. doi:10.1117/1.JBO.20.5.051043.
- [37] Y. Feng, L. Liu, S. Hu, Y. Liu, Y. Ren, X. Zhang, Forster resonance energy transfer properties of a new type of near-infrared excitation PDT photosensitizer: CuInS₂/ZnS quantum dots-5-aminolevulinic acid conjugates, *RSC Adv.* 6 (2016) 55568–55576. doi:10.1039/C6RA06937A.
- [38] L. Shi, X. Wang, F. Zhao, H. Luan, Q. Tu, Z. Huang, H. Wang, H. Wang, In vitro evaluation of 5-aminolevulinic acid (ALA) loaded PLGA nanoparticles, *Int. J. Nanomedicine.* 8 (2013) 2669–2676. doi:10.2147/IJN.S45821.
- [39] M.N. Theodoraki, K. Lorenz, R. Lotfi, D. Fürst, C. Tsamadou, S. Jaekle, J. Mytilineos, C. Brunner, J. Theodorakis, T.K. Hoffmann, S. Laban, P.J. Schuler, Influence of photodynamic therapy on peripheral immune cell populations and cytokine concentrations in head and neck cancer, *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* 19 (2017) 194–201. doi:https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2017.05.015.
- [40] J. Xu, L. Xu, C. Wang, R. Yang, Q. Zhuang, X. Han, Z. Dong, W. Zhu, R. Peng, Z. Liu, Near-Infrared-Triggered Photodynamic Therapy with Multitasking Upconversion Nanoparticles in Combination with Checkpoint Blockade for Immunotherapy of Colorectal Cancer, *ACS Nano.* 11 (2017) 4463–4474. doi:10.1021/acsnano.7b00715.
- [41] 4T1 ATCC ® CRL-2539™ Mus musculus mammary gland This tumor i, (n.d.). <https://www.atcc.org/Products/All/CRL-2539.aspx> (accessed April 29, 2017).
- [42] WHO | Breast Cancer Awareness Month in October, WHO. (2012). http://www.who.int/cancer/events/breast_cancer_month/en/ (accessed April 29, 2017).
- [43] T. Ogino, H. Kobuchi, K. Munetomo, H. Fujita, M. Yamamoto, T. Utsumi, K. Inoue, T. Shuin, J. Sasaki, M. Inoue, K. Utsumi, Serum-dependent export of protoporphyrin IX by ATP-binding cassette transporter G2 in T24 cells, *Mol. Cell. Biochem.* 358 (2011) 297. doi:10.1007/s11010-011-0980-5.
- [44] A.R. Simioni, F.L. Primo, A.C. Tedesco, Silicon(IV) phthalocyanine-loaded-nanoparticles for application in photodynamic process, *J. Laser Appl.* 24 (2012) 12004. doi:10.2351/1.3669442.
- [45] C.S. De Paula, A.C. Tedesco, F.L. Primo, J.M.C. Vilela, M.S. Andrade, V.C.F. Mosqueira, Chloroaluminium phthalocyanine polymeric nanoparticles as photosensitisers: Photophysical and physicochemical characterisation, release and phototoxicity in vitro, *Eur. J. Pharm. Sci.* 49 (2013) 371–381. doi:10.1016/j.ejps.2013.03.011.
- [46] P. Mroz, A. Yaroslavsky, G.B. Kharkwal, M.R. Hamblin, Cell Death Pathways in Photodynamic Therapy of Cancer, *Cancers (Basel).* 3 (2011) 2516–2539. doi:10.3390/cancers3022516.
- [47] G.A. Hunter, E. Rivera, G.C. Ferreira, Supraphysiological concentrations of 5-aminolevulinic acid dimerize in solution to produce superoxide radical anions via a protonated dihydropyrazine intermediate, *Arch. Biochem. Biophys.* 437 (2005) 128–137. doi:10.1016/j.abb.2005.03.007.

- [48] A. Babič, V. Herceg, I. Ateb, E. Allémann, N. Lange, Tunable phosphatase-sensitive stable prodrugs of 5-aminolevulinic acid for tumor fluorescence photodetection, *J. Control. Release.* 235 (2016) 155–164. doi:10.1016/j.jconrel.2016.05.047.

CAPÍTULO 3

INDUÇÃO DE MORTE DE CÉLULAS TUMORAIS EM MODELO DE CÂNCER DE MAMA ORTOTÓPICO POR ÁCIDO 5-AMINOLEVULÍNICO NANOSTRUTURADO: UMA NOVA PERSPECTIVA DA TERAPIA FOTODINÂMICA EM ONCOLOGIA

Induction of tumor cells death in orthotopic breast cancer model by nanostructured 5-aminolevulinic acid: a novel perspective of photodynamic therapy in oncology

RESUMO

Introdução: A terapia fotodinâmica (TFD) é uma estratégia de tratamento não invasiva com potencial para induzir imunidade anti-tumoral contra recorrência e aumentar a taxa de sobrevivência livre de tumor. A TFD mediada por NanoALA, uma nova nanoemulsão polimérica de óleo-em-água (o/w) de ácido 5-aminolevulínico (ALA), foi avaliada em modelo ortotópico de câncer de mama murino derivado de células 4T1 altamente invasivas.

Métodos: Este estudo foi realizado em três etapas: (i) análise da produção de PpIX derivada de ALA e teste de toxicidade aguda; (ii) biocompatibilidade e eficácia do tratamento, e (iii) efeito em longo prazo da NanoALA-TFD na progressão tumoral. Foram realizadas avaliações clínicas, hematológicas, bioquímicas, genotóxicas e histopatológicas.

Resultados: A nanoformulação favoreceu a absorção de pró-fármaco por células tumorais em um tempo mais curto e mais seletivamente do que o ALA livre. Conseqüentemente, os efeitos adversos foram insignificantes e as taxas de resposta para o controle do tumor mamário primário e a prevenção de metástases à distância foram significativamente melhoradas.

Conclusões: NanoALA é um candidato vantajoso para TFD anticâncer e tem potencial para ser aplicado como estratégia de intervenção adjuvante/neoadjuvante para o câncer de mama.

Palavras-chave: ácido 5-aminolevulínico; nanoemulsão polimérica; terapia fotodinâmica; células 4T1; câncer de mama.

ABSTRACT

Background: Photodynamic therapy (PDT) is a noninvasive treatment strategy with potential to induce anti-tumoral immunity against recurrence and increase the tumor-free survival rate. NanoALA-mediated PDT, a novel oil-in-water (o/w) polymeric nanoemulsion of 5-aminolevulinic acid (ALA), was evaluated in orthotopic murine model of breast cancer derived from highly invasive 4T1 cells.

Methods: This study was conducted in three stages: (i) analysis of the PpIX production ALA-derived and acute toxicity test; (ii) biocompatibility and treatment efficacy, and (iii) long-term effect of NanoALA-PDT on tumor progression. Clinical, hematological, biochemical, genotoxic and histopathological evaluations were performed.

Results: The nanoformulation favored the prodrug uptake by tumor cells in a shorter time and more selectively than free ALA. Consequently, the adverse effects were negligible and the response rates for primary mammary tumor control and prevention of distant metastasis were significantly improved.

Conclusions: NanoALA is an advantageous candidate for PDT against cancer and has the potential to be applied as adjuvant/neoadjuvant intervention strategy for breast cancer.

Keywords: 5-aminolevulinic acid; polymeric nanoemulsion; photodynamic therapy; 4T1 cells; breast cancer.

1. INTRODUCTION

The high incidence of new breast cancer cases diagnosed each year worldwide - over 1.5 million [1] - excites the enhancement of anticancer therapies. The genomic and transcriptomic heterogeneity of breast tumor cell, which translates into distinct clinical behaviors, limits the success of conventional therapies, such as surgery, chemotherapy, radiotherapy and hormonal therapy [2]. Although they provide a high 5-year survival rate for localized breast cancer, the recurrence from remaining resistant cells is all too common [3–5]. Alternatively, recent evidence suggests that photodynamic therapy (PDT) has the potential to induce anti-tumoral immunity against recurrence [6–8] and partially prevent distant metastases from the treated sites with minimum adverse effects [5,9].

PDT is based on selective tumor destruction by oxidative damage. Three elements are required: a photosensitizer (PS), light and oxygen. When the PS absorbs a photon of specific wavelength it becomes excited and may spontaneously undergo intersystem crossing to a relatively long lived excited triplet state, which transfer electrons to cellular substrats or molecular oxygen. The reactive oxygen species (ROS) produced can trigger cel death by apoptosis and/or necrosis, cause tumor ischemia due to vascular injury and stimulate the host immune system against tumor antigens [6,8,10–13]. Among the various PS under research, only five drugs and their derivatives, Photofrin[®], Levulan[®] (ALA), Metvix[®], Foscan[®] and Laserphyrin[®], are approved in oncology, but none for breast cancer [14].

5-Aminolevulinic acid (ALA), precursor of the fluorescent PS protoporphyrin IX (PpIX) in the heme biosynthetic pathway, is an advantageous candidate for breast cancer theranostic system. It is well documented that endogenous synthesis of ALA by ALA-synthetase undergoes feedback regulation by the amount of heme in the cell. However, exogenous administration of ALA bypasses this negative feedback mechanism and overproduced PpIX can selectively accumulate in the tumor cells that exhibit enzymatic dysfunctions, such as greater expression of porphobilinogren deaminase and reduced expression of ferrochelatase, the rate-limiting to transform PpIX to heme [15–18]. ALA-induced PpIX shows minimal toxicity in the absence of light and rapid clearance (24-48 hours) from biological systems [19]. Interestingly, PpIX has been shown to have a higher accumulation in breast cancer cells as compared to non-tumoral breast cells, brain, prostate, ovarian, lung and skin tumor cell lines [15,18,20–24]. Furthermore, different routes of ALA administration tested *in vivo* [17,25,26], such as tail vein, intraperitoneal, topical, intratumoral

and oral, and clinically (oral application) [27,28] also led to preferential PpIX accumulation and enhanced red fluorescence in the mammary tumour tissue and metastatic cell populations compared with surrounding normal tissues, suggesting differential phototoxicity and/or higher contrast for diagnosis and delineation of intraoperative margin during tumor surgery.

Despite the multifarious advantages of conventional ALA, third generation PS-mediated targeting approaches have shown the most promising results in anticancer PDT to date. In particular, nanoengineered drug delivery systems have exciting potential to allow more favorable pharmacokinetic and pharmacodynamic profiles and to improve PS retention in tumor sites by enhanced permeability and retention (EPR) effect [29–31]. There are relatively many PS nanocarriers described in the literature aiming at the treatment of breast cancer by PDT [5,32–47], however very few of them are associated with ALA [19,48,49].

Our previous study [49] reported the superior performance of NanoALA, a nanoformulation of ALA based on poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) nanocapsules, to promote successful PDT in mammary carcinoma cells compared to free ALA. As result of enhanced physiological stability and higher uptake by tumor cells, a shorter exposure time and lower prodrug concentration were required to achieve killing efficiency with NanoALA. It is noteworthy that the PLGA polymer is also already US FDA-approved for clinical practices [50]. These results encouraged us to evaluate the biocompatibility and efficacy NanoALA-mediated PDT against orthotopic model of murine breast cancer. The aggressive behavior of the 4T1 tumor model used in this work, analogous to stage IV human breast cancer [5,51], allowed us to evaluate the effect of NanoALA-PDT on primary mammary tumor evolution, as well as on the occurrence of spontaneous metastatic lesions and survival rate of treated mice. It is expected that findings of this research will contribute to bring safe and non invasive strategies for breast cancer treatment closer to clinical experimentation.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 NanoALA

NanoALA is an oil-in-water (o/w) polymeric nanoemulsion in a 20% ALA final concentration (w/w) prepared by a spontaneous emulsification process and characterized by dynamic light scattering (DLS) and electrophoretic measurement, as described by Andrade et

al. [49]. The systems present 220 ± 8.7 nm average size, 0.28 polydispersity index, -30.6 mV zeta potential and stability over a period of 90 days following synthesis.

2.2 Cell line and animals

4T1 mouse mammary tumor *cell line* (ATCC - CRL-2539™) modified to *firefly* luciferase expression [52] was cultured in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Gibco® Life Technologies, Ltd., USA) containing 10 % (v/v) fetal bovine serum (FBS, Gibco® Invitrogen™, USA), $100 \text{ IU}\cdot\text{mL}^{-1}$ penicillin and $100 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ streptomycin (Sigma – Aldrich) in a humidified atmosphere (95 %) containing 5 % CO_2 at 37°C .

Female Balb/c mice, 12-16 weeks old, weighing 23.34 ± 2.36 g, were obtained from the Federal University of Goiás (UFG-GO, BRA) and maintained under standard housing condition at room temperature in a 12-h light/dark cycle and fed with balanced diet and water *ad libitum*. All experimental procedures were performed after acclimatizing the animals for two weeks to laboratory conditions and in accordance with Animal Research Ethics Committee guidelines of the University of Brasilia, Brazil (CEUA: 66707/2016).

2.3 Murine model of mammary carcinoma

The mammary carcinoma model was obtained by orthotopic transplantation of 4T1-luci cells (1×10^5 cells in $50 \text{ }\mu\text{L}$ of medium culture without FBS) in the fifth right mammary gland of Balb/c mice after local tricotomization. The animals were treated seven days after transplantation, when the tumors were already clinically visible. The tumor development analysis was performed by IVIS Lumina® XR Series III pre-clinical *in vivo* imaging system (PerkinElmer, USA), using the Living Image® version 4.5.4 software following manufacturer's instructions. Briefly, tumor-bearing animals were injected intraperitoneally (IP) with $100 \text{ }\mu\text{L}$ of 1 mM luciferin solution (D-Luciferin Potassium Salt, Promega, WI, USA) and monitored for 20 minutes in the IVIS Lumina® under 2.5% isoflurane anesthesia (BioChimico Institute Pharm. Ind., Ltd., BRA). Bioluminescence imaging signals, which are proportional to the number of 4T1-luci cells, were recorded every minute as bioluminescent luminescence units (BLU, $\text{photons}/\text{sec}/\text{cm}^2/\text{sr}$).

2.4 Analysis *in vivo* and *ex vivo* of intratumoral production and biodistribution of PpIX

NanoALA or ALA solutions (50 μL at 20% w/w – 415 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ of body weight) were injected intratumorally (IT) and at intervals of 0.25; 0.75; 1.5; 2; 3; 4; 5; 6; 7; 8; 9; 10; 11; 12 and 24 h; the animals ($n = 6/\text{group}$) isoflurane anesthetized were analyzed using the IVIS Lumina[®] to monitor the intratumoral production of PpIX, which fluoresces in red (excitation/emission: 420/620 nm). During the procedure, the animals remained protected from light. An area of 1 cm^2 was standardized under the tumor area for fluorescence measurement. The results were expressed as radiant efficiency [(photons/sec/ cm^2/sr)/ $\mu\text{W}/\text{cm}^2$]. At the end, blood was collected for biochemical, hematological and genotoxic analyzes, and the organs were collected for histopathological analysis, as described in the section "Biocompatibility analysis".

In order to confirm the intratumoral production and biodistribution of PpIX after NanoALA or ALA intratumoral injection, organs excisions were performed at the end of a pre-established period, which coincided with the highest fluorescence peaks at the tumor site during *in vivo* analysis. The organs were washed in 0.9% saline solution to remove excess blood and immediately analyzed by IVIS Lumina[®] (excitation/emission: 420/620 nm). The results were expressed as radiant efficiency (photons/sec/ cm^2/sr)/ $\mu\text{W}/\text{cm}^2$] ($n = 3/\text{group}$).

2.5 Photodynamic therapy – experimental design

The tumor-bearing animals were randomly divided into six experimental groups to evaluate the efficacy of NanoALA-mediated PDT. Three sessions of PDT were performed with an interval of two days between each application. On the first treatment session, the animals received a IT injection of 30 μL of 20% NanoALA or ALA and, 1.5 h later, were subjected to two cycles of local irradiation with one minute interval using an LED light source (630 nm, 90.53 mW/cm^2 , 38.02 J/cm^2 , 5 cm from the tumor area). In the other sessions, the volume of the formulations was reduced to 20 μL . Over time, the mice were monitored regarding weight loss, behavioral and clinical changes and survival. The experimental groups and design are summarized in Table 1 and Figure 1.

On the seventh day after the last treatment session, half of the surviving mice from the tumor control, ALA-PDT and NanoALA-PDT groups were separated to analyze the long-term effect of the PDT. These animals were weighed at periodic intervals up to 60 days post-

treatment. In the same time interval, the bioluminescence of the primary tumor area and the thoracic region was measured by IVIS Lumina[®] system to estimate tumor progression and distant metastasis. The remaining mice were euthanized with an excess of anesthetic (xylazine and ketamine) to verify the biocompatibility and efficacy of the treatment. A digital caliper (200MM Pd 200 Vonder[®]) was used for measurement of tumor volume according to the formula: $(\text{Length}) \times (\text{Width}^2) \times 0.5$ [5].

Table 1. PDT experimental groups

Specification	Treatment (three sessions)
Negative control (n=5)	Without tumor and without treatment.
Tumor control (n=11)	Tumor treated with sterile PBS.
LED (n=6)	Tumor treated with a light dose of 38.02 J/cm ² .
ALA (n=6)	Tumor treated with ALA solution, protected from light.
NanoALA (n=6)	Tumor treated with NanoALA solution, protected from light.
ALA-PDT (n=12)	Tumor treated with ALA solution, followed by two cycles of local irradiation at a light dose of 38.02 J/cm ² .
NanoALA-PDT (n=12)	Tumor treated with NanoALA solution, followed by two cycles of local irradiation at a light dose of 38.02 J/cm ² .

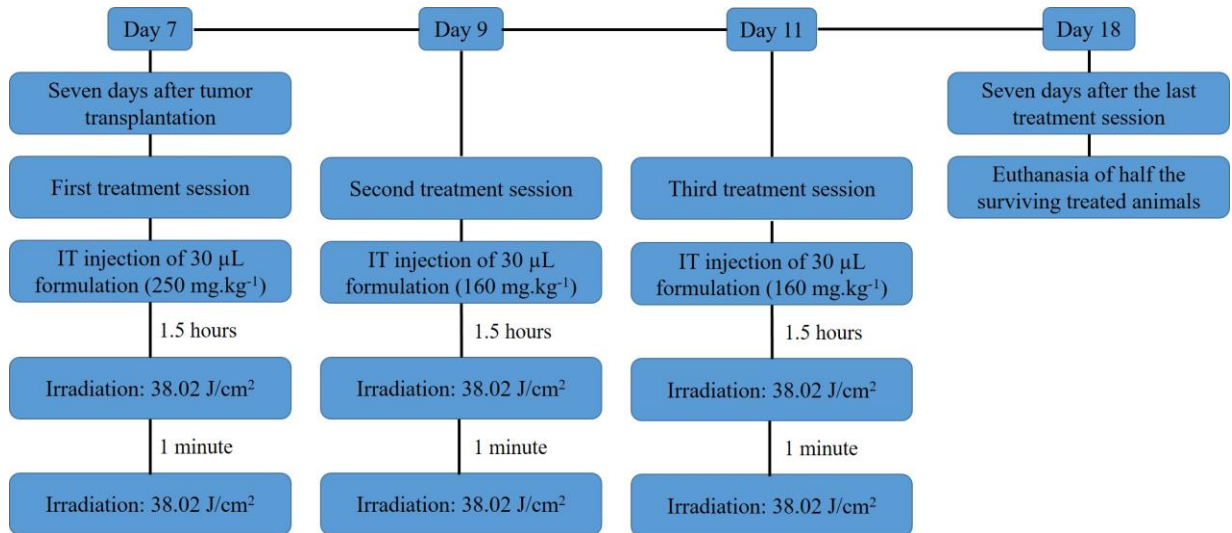


Figure 1. Details of the experimental design of the animals submitted to photodynamic therapy (PDT).

2.6 Biocompatibility analysis

2.6.1 Hemogram and biochemical analysis

Blood samples collected by cardiac puncture were transferred to Vacutte[®] microtubes containing anticoagulant EDTA for hematological analysis using the automated hematology analyzer Sysmex pocH-100Iv Diff[™] (Kobe, JAP). The biochemistry analyses were performed by automated chemistry analyzer ChemWell-T[®] (Labtest, BRA) in Vacutte[®] microtubes with gel separator. The samples were centrifuged at 5000 rpm for 5 minutes at room temperature to separate the serum from which the biochemical dosages were made for alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), lactate dehydrogenase (LDH), urea, albumin and iron.

2.6.2 Analysis of DNA fragmentation and cell cycle in bone marrow cells

Bone marrow cells collected from the femur of the mice were used for analysis of DNA fragmentation and cell cycle. Briefly, 500 μL of FBS were injected into one end of the femur and drained into a microtube. The FBS containing bone marrow cells was centrifuged at 2000 rpm for 5 minutes. After washing with PBS, the cells were incubated with 200 μL of lysis buffer containing Rnase (0.1% sodium citrate, 0.1% Triton X-100, 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ RNAase) for 30 minutes and subsequent incubation with propidium iodide (20 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$) for 15 minutes at room temperature and protected from light. Cells were analyzed on a flow cytometer (FACS Verse, Becton and Dickenson, USA). A total of 10,000 events were computed per sample.

2.6.3 Histopathological evaluation

The organs (tumor, healthy breast, sentinel and contralateral lymph nodes, spleen, liver, kidneys, lung, heart and brain) were washed in PBS to remove excess blood and fixed with 10% buffered formalin (Sigma-Aldrich, BRA) for 24 h at room temperature. Then, they were dehydrated in alcoholic solutions, diaphanized in xylol, included and embedded in paraffin using an automatic tissue processor (OMA[®] DM-40, São Paulo, BRA). Sections of 5

μm of thickness were obtained in a Leica RM2235 manual microtome (Leica Microsystems, Nussloch, Germany) and stained with hematoxylin-eosin (H&E) for light microscope analysis. A semi-quantitative score (0-4: 0 for none, 4 for 100%) was used to determine the necrosis degree relative to total tumor surface.

2.7 Statistical analyses

Statistical analysis was performed using R 3.1.2 software (R Development Core Team, 2015). The variables were tested for normal distribution with Shapiro-Wilk. Significant differences among the groups were evaluated by analysis of variance ANOVA (parametric data) or the Kruskal-Wallis test (non-parametric data) followed respectively by Tukey's or Dunn's Multiple Comparison Tests. Values of $p < 0.05$ were considered statistically significant.

3. RESULTS

3.1 Evaluation of PpIX production and acute NanoALA toxicity

Since the efficacy of PDT depends on the photosensitizer accumulated in the target tissue, it was initially evaluated the intratumoral production of PpIX at different time points following administration of the prodrugs, as shown in Figure 2. Throughout the analyzed period, except in the time of 0.25 hours, the prodrug induced an increase of the production of PpIX. The highest production of PpIX occurred at 1.5 hours post-injection of NanoALA. At this time, the fluorescence intensity of PpIX was approximately 5-fold greater than the basal amount produced by the control group and the group treated with free ALA solution. The PpIX derived from free ALA showed a later fluorescence peak, in the time of 2 hours, and was only twice the basal cell production. After 2 hours, there was a rapid decay of fluorescence and the kinetic profile of PpIX levels between the ALA and NanoALA groups became equivalent. At the end of 24 hours, the acute toxic potential of prodrugs was investigated, as described below.

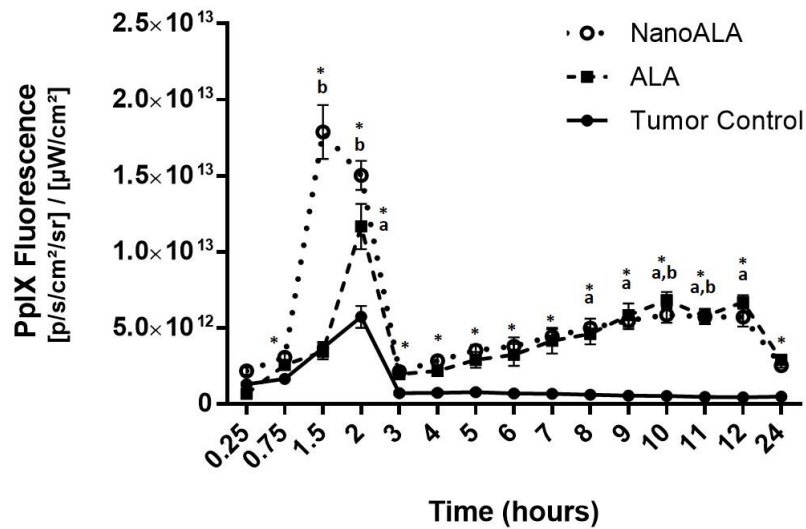


Figure 2: *In vivo* measurements of Protoporphyrin IX (PpIX) fluorescence produced intratumorally after injection of 50 μ L NanoALA or ALA. Data were determined by IVIS Lumina[®] imaging system (420-620 λ_{ex} - λ_{em}) and presented as mean \pm standard error of the mean (SEM), (n=6 animals per group). Statistical significance was determined by Kruskal-Wallis ($p < 0.05$). The letters and asterisk indicate significant differences detected by Dunn's multiple comparison test adjusted by Bonferroni. Comparisons between ALA (**a**) or NanoALA (**b**) in relation to 0.25 hours. *Comparisons between treated groups and control group in the same time.

The short-term exposure to NanoALA and ALA did not cause lethality. The animals showed no skin ulceration, behavioral or evident clinical changes during 24 hours of observation. The body weight of all groups was maintained following treatment (Figure 3a). Despite the animals treated with NanoALA presented serum urea levels lower (16%) than the control group ($p < 0.05$), the ALT, AST, LDH and albumin levels were not significantly different (Table 2), ruling out the possibility of hepatic dysfunction or malnutrition.

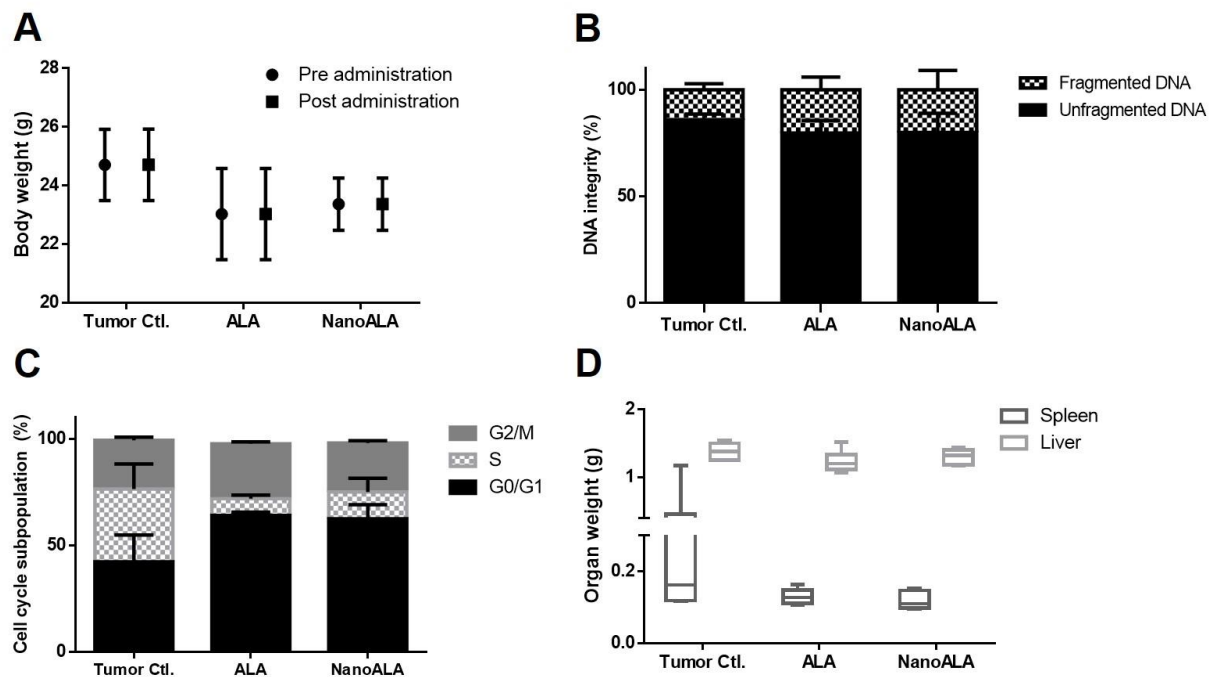


Figure 3: Acute toxicity study in tumor-bearing animals 24 h after intratumoral injection of 50 μ L NanoALA or ALA. (A) Mean body weight of mice pre- and post-treatment. (B-C) Bar graphs represent DNA integrity and distribution of cell cycle of bone marrow cells, with (B) % of fragmented and unfragmented DNA and (C) % of cell population in G0/G1, S and G2/M phases of the cell cycle. (D) The interleaved boxes graph represents spleen and liver weight. Values are mean \pm SEM (n=6 animals per group). P-values ($p>0.05$) were generated by Kruskal-Wallis.

Table 2. Biochemical analysis after *in vivo* bioistribution.

	Tumor Control	ALA	NanoALA	p-value
ALT (U/L)	146.5 \pm 55.33	144.8 \pm 34.6	115.8 \pm 27.4	0.3594
AST (U/L)	322.0 \pm 153.2	269.8 \pm 165.7	249.3 \pm 97.2	0.7279
Urea (mg/dL)	68.7 \pm 5.2	58.0 \pm 10.8	57.7 \pm 5.1*	0.0346
Albumin (g/dL)	2.4 \pm 0.3	2.3 \pm 0.3	2.5 \pm 0.1	0.3308
LDH (mg/dL)	966.8 \pm 445.4	967.5 \pm 409.1	983.2 \pm 446.5	0.9429

Serum samples were collected for analysis 24 h after prodrug injection. ALT: alanine aminotransferase; AST: aspartate aminotransferase; LDH: lactate dehydrogenase. The data correspond to the mean and standard deviation (SD) of the mean. P-values were determined by Kruskal-Wallis. *Significant difference compared to tumor control, detected by Dunn's multiple comparison test adjusted by Bonferroni.

The hematological analysis, presented in Table 3, showed significant alterations in erythrogram and leukogram of the treated animals compared to tumor control group. In the NanoALA group the values of red blood cells (RBC), total white blood cells (WBC) and middle cell ratio (W-MCR - monocytes, basophils and eosinophils) were significantly higher (16%, 77% and 20%, respectively), while the values of mean corpuscular hemoglobin (MCH) and mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC) were statistically lower (3% and 2%). In the ALA group, there was a significant increase of W-MCR (22%) and a reduction of

MCH and MCHC (3% and 2%). Note that in both groups the altered values of MCH and MCHC are physiologically negligible.

Table 3. Hemogram of tumor-bearing mice after biodistribution analysis

	Tumor Control	ALA	NanoALA	p-value
Erytrogram				
RBC ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	8 \pm 0.7	8.9 \pm 0.8	9.3 \pm 0.7*	0.04455
HGB (g/dL)	11.8 \pm 1.1	12.7 \pm 1.1	13.3 \pm 1.0	0.08265
HCT (%)	28.6 \pm 2.7	31.3 \pm 2.9	32.9 \pm 2.5	0.07071
MCV (fL)	35.5 \pm 0.1	35.2 \pm 0.5	35.2 \pm 0.4	0.07440
MCH (pg)	14.7 \pm 0.1	14.2 \pm 0.2*	14.3 \pm 0.3*	0.00500
MCHC (g/dL)	41.4 \pm 0.3	40.4 \pm 0.4*	40.5 \pm 0.5*	0.00704
RDW (%)	14.9 \pm 0.7	15.3 \pm 0.2	15.1 \pm 0.4	0.42780
Leukogram				
WBC ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	3.1 \pm 1.6	4.5 \pm 1.0	5.5 \pm 1.3*	0.02361
W-SCR (%)	66.8 \pm 3.9	62.3 \pm 3.5	63.5 \pm 2.2	0.09697
W-MCR (%)	28.8 \pm 3.8	35.2 \pm 4.6*	34.7 \pm 2.2*	0.02497
W-LCR (%)	4.4 \pm 3.5	2.5 \pm 2.9	1.8 \pm 1.8	0.14290
Plateletgram				
PLT ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	506.7 \pm 314.2	859.2 \pm 313.7	926.8 \pm 242.3	0.08728

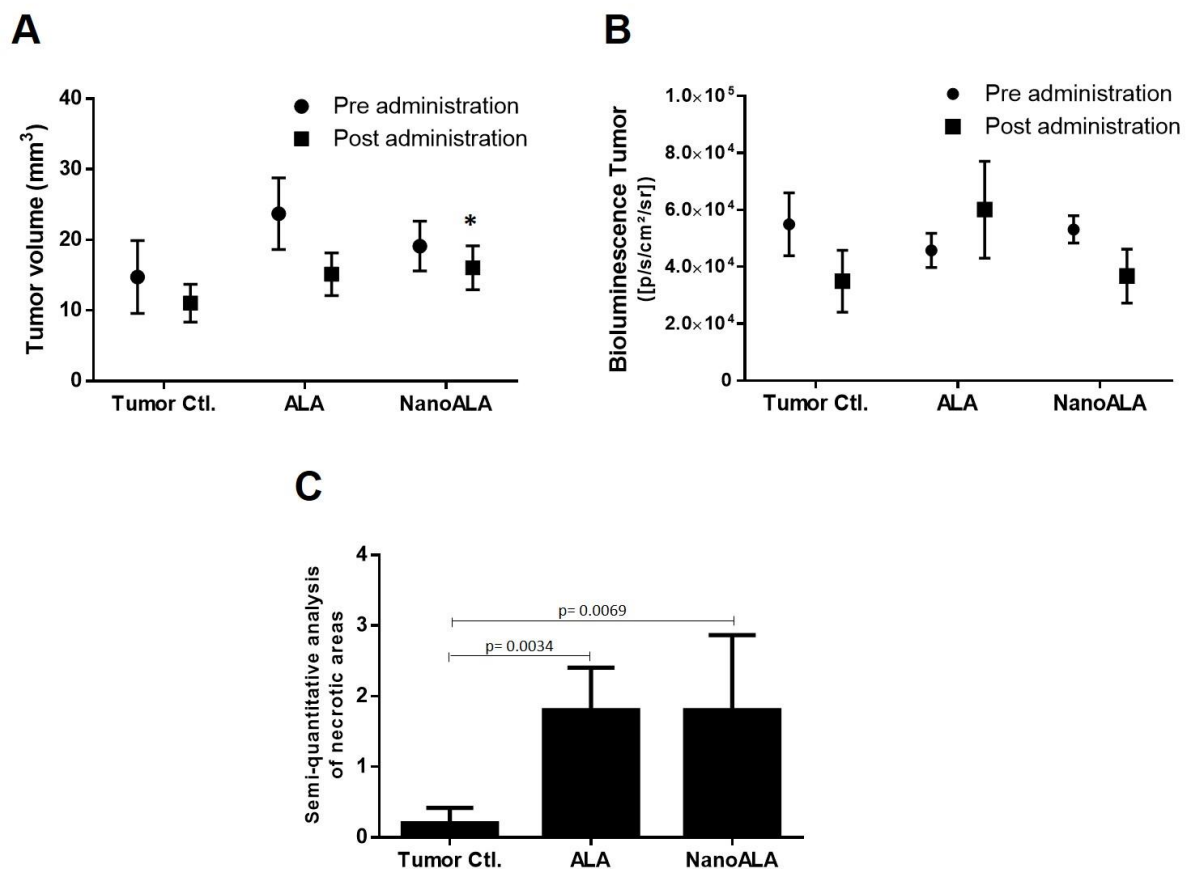
RBC - Red Blood Cells; HGB - Hemoglobin; HCT - Hematocrit; MCV - Mean Corpuscular Volume; MCH - Mean Corpuscular Hemoglobin; MCHC - Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration; RDW - Red Cell Distribution Width; WBC - Total White Blood Cells; W-SCR – Small Cell Ratio (lymphocytes); W-MCR – Middle Cell Ratio (monocytes, basophils and eosinophils); W-LCR – Large Cell Ratio (neutrophils); PLT - Platelet Count; g/Dl - grams per deciliter; fL - femtoliters; pg - picograms. Data correspond to mean \pm standard deviation (SD). P-values were determined by Kruskal-Wallis. *Significant difference compared to tumor control, detected by Dunn's multiple comparison test adjusted by Bonferroni.

The bone marrow is the main organ that reflects the state of the hematopoietic system and, together with the liver, are the main sites of endogenous porphyrin synthesis [53]. So, to verify if the hematological disorders observed in peripheral blood were associated to bone marrow dysfunction, the potential of the prodrugs to induce cytogenetic alterations in bone marrow cells was evaluated. As shown in Figures 3b and 3c, NanoALA and ALA groups exhibited no alterations in the DNA integrity, nor increased global cell population in the proliferative phases (S/G2/M).

The treated animals also showed no hepatomegaly and splenomegaly (Figure 3d), or any other changes in color or consistency of the liver and spleen (data not shown). The results

of histopathological exams were consistent with the absence of toxicity in most of the non-target organs evaluated. The contralateral breast, contralateral lymph node, spleen, liver, kidneys, lung, heart and brain exhibited standard morphology. Sinus histiocytosis in sentinel lymph nodes (SL) was observed in ALA (n=3/6) and NanoALA (n=1/6) groups.

Regarding tumor tissues, it was observed a significant reduction (35%) of the tumor volume 24 h after NanoALA treatment (Figure 4a). Although not statistically significant, the results of the IVIS Lumina[®] imaging system also showed an evident reduction of bioluminescence from 4T1-luci cells at the primary tumor site treated with NanoALA (Figure 4b). An extensive necrotic area, corresponding to about 45% of the tumor area treated with NanoALA or ALA, was identified by histological analysis followed by semi-quantitative analysis, which explains the previous results (Figure 4c-f).



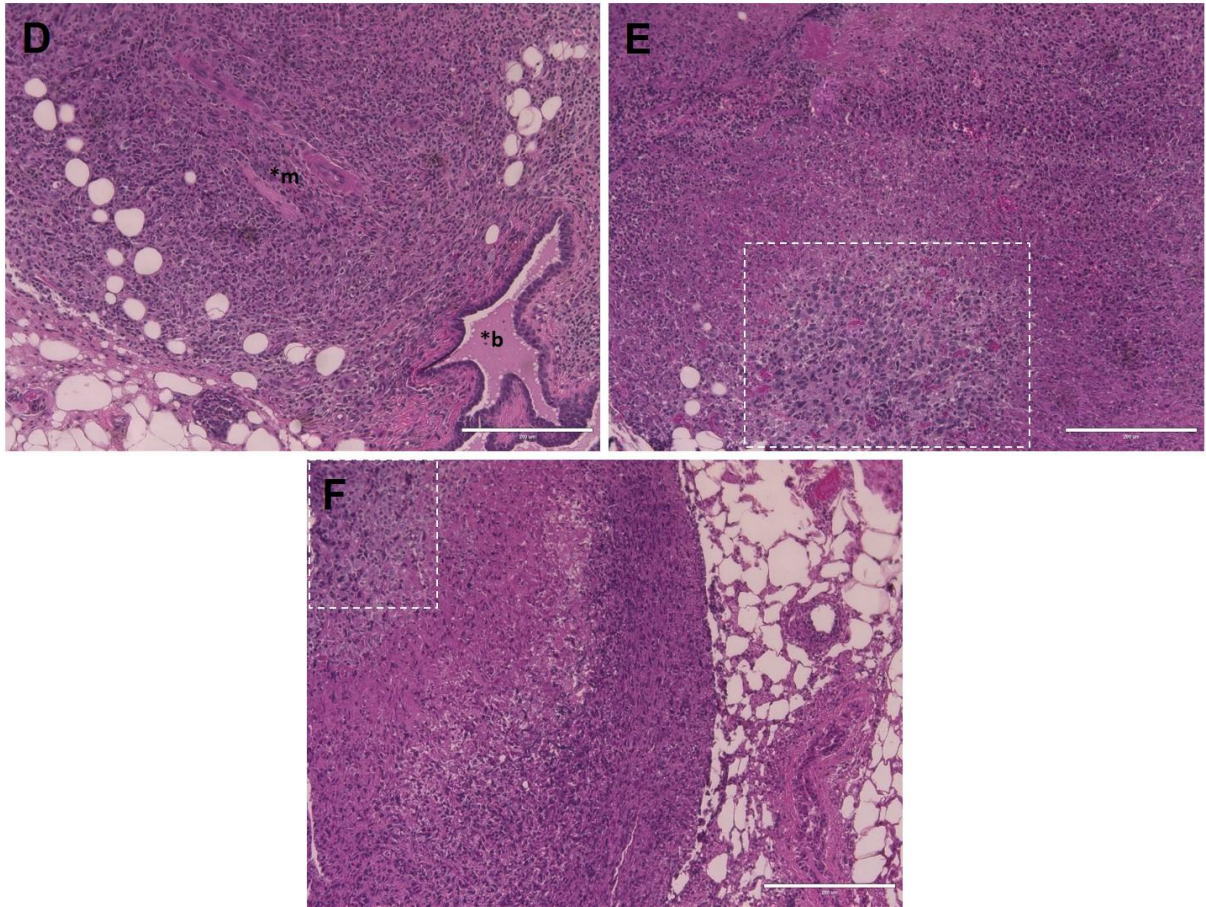


Figure 4: Evaluation of tumor tissue 24 after NanoALA or ALA administration. **(A)** Tumor volume (mm^3) determined by digital caliper ($n=6$). **(B)** Bioluminescence from 4T1-luci cells, expressed as radiance ($\text{p/s/cm}^2/\text{sr}$), at the primary tumor site detected by IVIS Lumina[®] imaging system ($n=3$). **(C)** Semi-quantitative analysis of necrotic areas (0-4: 0 for none, 4 for 100%) ($n=6$). **(D-F)** Histopathological analysis of the tumor **(D)** without treatment, indicating viable tumor cells invading muscle (**m*) and breast tissues (**b*); **(E)** treated with ALA; **(F)** treated with NanoALA. Dashed lines delimit viable tumor areas surrounded by necrotic cells. Values are mean \pm SEM. P-values were generated by Kruskal-Wallis. *Significant difference ($p= 0.0373$) compared to pre-treatment with NanoALA detected by Dunn's multiple comparison test adjusted by Bonferroni. Scale bars: 200 μm .

Ex vivo analysis confirmed the PpIX accumulation in the tumor following prodrugs administration (Figure 5). While the NanoALA induced 84% increase in fluorescence intensity in 1.5 h, ALA induced 40% increase compared to the tumor control. However, the PpIX accumulation was not selective for tumor tissue. The liver and the sentinel lymph node of the NanoALA group presented, respectively, 318% and 92% increase in fluorescence intensity compared to the tumor control. Even so, no significant signs of hepatic or lymph node toxicity were observed at the end of 24 h post-injection of NanoALA, as previously noted by the macroscopic and histopathological analysis.

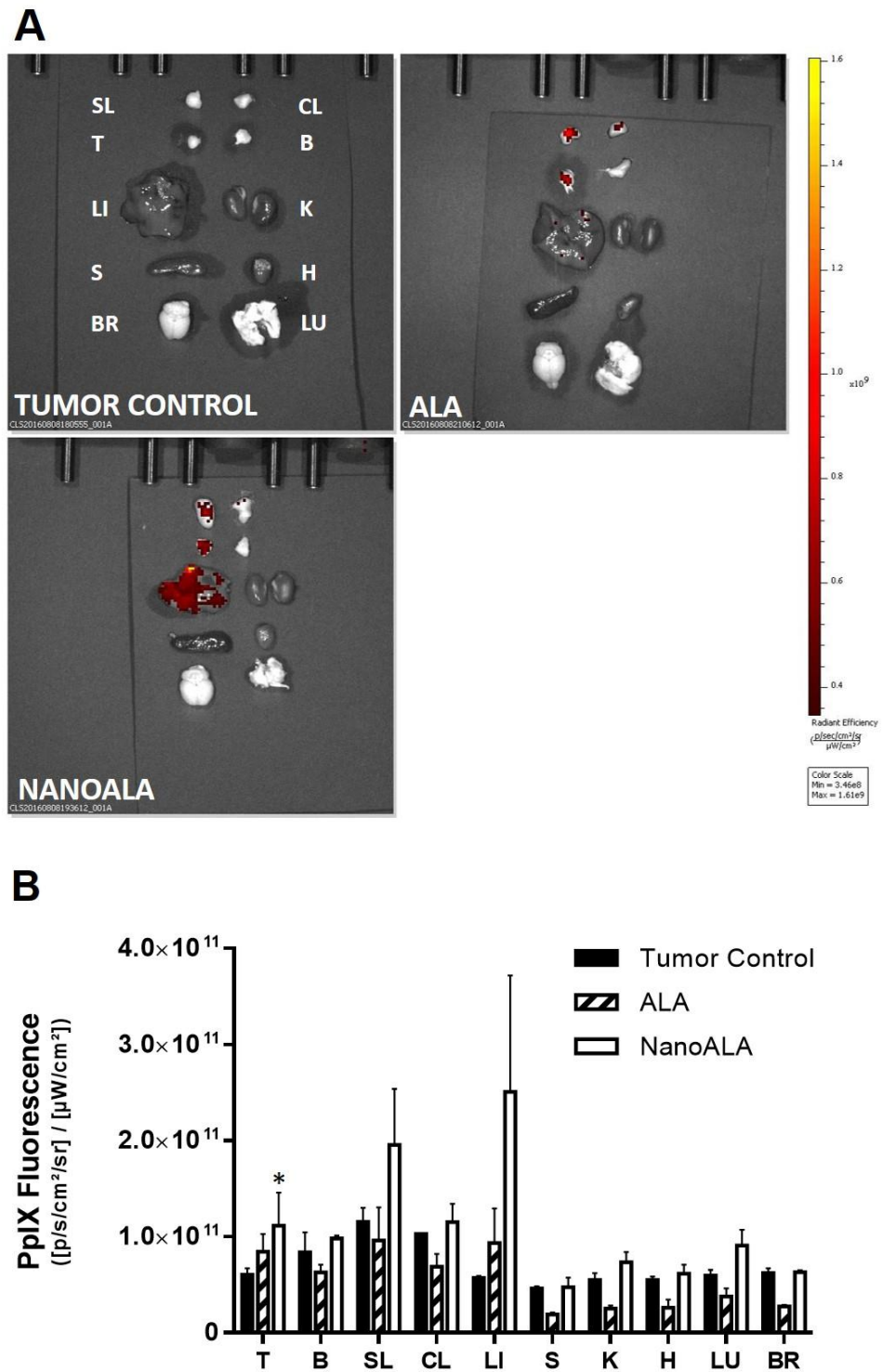


Figure 5: *Ex vivo* measurements of Protoporphyrin IX (PpIX) fluorescence produced intratumorally 1.5 h after injection of 50 μ L NanoALA or ALA. (A) Representative image of PpIX fluorescence intensity in different organs of the control, ALA and NanoALA groups determined by IVIS Lumina[®] imaging system (420-620 λ_{ex} - λ_{em}). (B) The fluorescence intensity was expressed in radiant efficiency [(photons/sec/cm²/sr)/ μ W/cm²] and presented as mean \pm SEM, (n=3 animals per group). P-values were generated by Kruskal-Wallis. *Significant difference (p= 0.0380) compared to tumor control group, detected by Dunn's multiple comparison test adjusted by Bonferroni. T- tumor, B- healthy contralateral breast, SL- sentinel lymph nodes, CL- contralateral lymph nodes, LI- liver, S- spleen, K- kidneys, H- heart, LU- lung, BR- brain.

Together, the results indicate a higher efficiency of NanoALA in promoting the intratumoral production of PpIX compared to free ALA without causing acute systemic toxicity. However, a considerable local toxicity was observed. It is desirable that the photosensitizer be nontoxic in the absence of light. So, in order to ensure safety during the application of PDT, the therapeutic efficacy experiments were conducted with incubation time of 1.5 h, but using a lower volume of NanoALA or ALA.

3.2 Evaluation of biocompatibility and efficacy of NanoALA-mediated PDT

In this experimental step, the biocompatibility and efficacy of NanoALA-mediated PDT were evaluated. During treatment the animals do not present reduction in body weight. However, seven days after the last treatment session (equivalent to 18th day after tumor transplantation), the NanoALA-PDT group (n = 5) showed a statistically significant reduction of approximately two grams in body weight compared to start of treatment (Figure 6a). Although not statistically significant, the ALA-PDT group (n = 4) showed similar results. All animals lost weight compared to start of treatment. For half of them, the mean weight loss was over three grams. Besides that, in both groups (NanoALA-PDT and ALA-PDT) it was observed intense wound healing process at the treatment site. ALA-mediated PDT also caused alopecia in the ventral region of some animals.

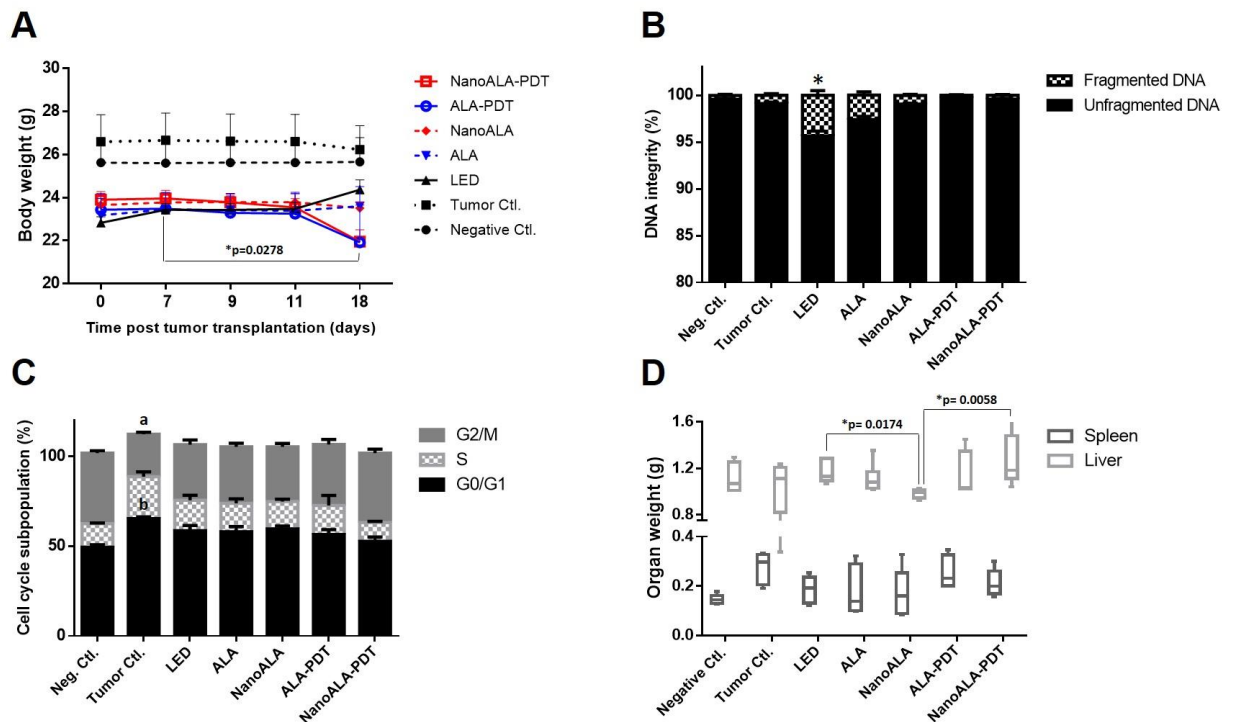


Figure 6: Biocompatibility of NanoALA or ALA-mediated PDT. **(A)** Body weight of mice measured before tumor transplantation (day 0), at the beginning of each treatment session (days 7, 9 and 11 post tumor transplantation) and 7 days after the last treatment session (18th day post tumor transplantation). **(B-C)** Bar graphs represent DNA integrity and distribution of cell cycle of bone marrow cells at 18th day, with **(B)** % of fragmented and unfragmented DNA and **(C)** % of cell population in G0/G1, S and G2/M phases of the cell cycle. **(D)** The interleaved boxes graph represents spleen and liver weight. Values are mean \pm SEM. P-values were generated by Kruskal-Wallis. ^{a,b}Significant differences compared to negative control detected by Dunn's multiple comparison test adjusted by Bonferroni. Negative control – n=5; tumor control, LED, ALA and NanoALA – n=6; ALA-PDT – n=4; NanoALA-PDT – n=5.

No statistically significant differences were found in serum level of ALT, AST, urea and iron of the treated animals compared to control groups. However, there was an evident tendency of reduction of serum iron levels in the NanoALA-PDT and ALA-PDT groups. In these groups, 80% and 50% of the animals, respectively, presented less than 50% of serum iron compared to the negative control (Table 4).

In the hematological evaluation (Table 5), the percentage of lymphocyte (W-SCR) from the NanoALA group was significantly lower than negative control (39.6 ± 18.3 and 72.1 ± 5.4 , respectively), while the percentage monocytes, basophils and eosinophils (W-MCR) was significantly higher (57.8 ± 18.8 and 23.6 ± 2.8 , respectively). The other treated groups showed no significant differences compared to negative and tumor control groups.

Table 4. Biochemical analysis after the last treatment session

	Negative Control	Tumor Control	LED	ALA	NanoALA	ALA-PDT	NanoALA-PDT	p-value
ALT (U/L)	24.6±4.8	32.8±47.4	19.7±13.9	24.2±4.0	23.3±6.9	36.0±22.1	27.0±10.6	0.5967
AST (U/L)	108.4±16.5	196.7±233.4	140.2±62.4	118.0±23.8	120.2±31.2	149.7±73.3	106.3±27.4	0.3323
Urea (mg/dL)	44.4±7.4	41±5.3*	42.0±4.8	48.5±6.8	52.5±7.1	47.7±2.4	45.8±1.6	0.03145
Serum iron (µg/dL)	155.6±35.1	103.0±51.9	108.8±35.5	116.5±65.7	92.0±36.7	86.0±46.2	79.0±48.6	0.7203

Samples were collected seven days after the last treatment session. ALT: alanine aminotransferase; AST: aspartate aminotransferase. The data correspond to the mean ± standard deviation (SD). P-values were determined by Kruskal-Wallis. *Significant difference compared to negative control, detected by Dunn's multiple comparison test adjusted by Bonferroni.

Table 5. Hemogram of tumor-bearing mice after the last treatment session

	Neg. Ctl	Tumor Ctl	LED	ALA	NanoALA	ALA-PDT	NanoALA-PDT	p-value
Erytrogram								
RBC ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	8.8 \pm 1.1	8.8 \pm 1.5	9.6 \pm 0.6	8.2 \pm 1.0	7.4 \pm 2.0	7.3 \pm 1.3	8.3 \pm 1.5	0.03847
HGB (g/dL)	12.8 \pm 1.6	12.7 \pm 2.2	14.3 \pm 0.6	12 \pm 1.4	10.8 \pm 2.9 ^b	10.3 \pm 1.8 ^b	11.7 \pm 2.1	0.01059
HCT (%)	31.5 \pm 3.7	31.5 \pm 5.5	34.4 \pm 2.2	29.8 \pm 3.8	26.8 \pm 7.3 ^b	25.9 \pm 4.6	29.6 \pm 5.5	0.04713
MCV (fL)	36 \pm 0.4	35.6 \pm 0.5	35.9 \pm 0.3	36.4 \pm 0.5	36.1 \pm 0.7	35.6 \pm 1.0	35.5 \pm 0.3	0.1584
MCH (pg)	14.7 \pm 0.2	14.4 \pm 0.3	14.9 \pm 0.4	14.7 \pm 0.3 ^c	14.6 \pm 0.3	14.2 \pm 0.3	14.1 \pm 0.1 ^b	0.001787
MCHC (g/dL)	40.8 \pm 0.6	40.3 \pm 0.4	41.6 \pm 1.1	40.4 \pm 0.6	40.5 \pm 0.5	39.9 \pm 1.6	39.6 \pm 0.3 ^b	0.01941
RDW (%)	15.2 \pm 0.4	16 \pm 0.9	15.3 \pm 0.5	13.9 \pm 1.1 ^c	14.7 \pm 1.1 ^c	18.5 \pm 3.4 ^d	18.4 \pm 1.3	0.000313
Leukogram								
WBC ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	5.1 \pm 3.2	14.5 \pm 6.5	14 \pm 6.2	15.5 \pm 12.6	11.4 \pm 10.9	4.9 \pm 1.7	4.5 \pm 1.9	0.00500
WSCR (%)	72.1 \pm 5.4	30.1 \pm 9.5 ^a	47.6 \pm 19.6	43.1 \pm 18.9	39.6 \pm 18.3 ^a	39.2 \pm 13.8	59.3 \pm 5.1	0.006619
WMCR (%)	23.6 \pm 2.8	67.3 \pm 9.3 ^a	51.9 \pm 19.2	54.8 \pm 18.2	57.8 \pm 18.8 ^a	56.3 \pm 12.5	37.4 \pm 4.3	0.003967
WLCR (%)	4.4 \pm 2.8	2.6 \pm 1.1	0.5 \pm 0.5	2.2 \pm 1.5	2.7 \pm 1.8	4.5 \pm 3.1	3.3 \pm 3.7	0.08063
Plateletgram								
PLT ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	555.6 \pm 465.1	789.3 \pm 284.7	954.3 \pm 167. 4	746.5 \pm 370.9	673.2 \pm 340.7	856.8 \pm 721.3	1213.6 \pm 732.8	0.6035

RBC - Red Blood Cells; HGB - Hemoglobin; HCT - Hematocrit; MCV - Mean Corpuscular Volume; MCH - Mean Corpuscular Hemoglobin; MCHC - Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration; RDW - Red Cell Distribution Width; WBC - Total White Blood Cells; W-SCR – Small Cell Ratio (lymphocytes); W-MCR – Middle Cell Ratio (monocytes, basophils and eosinophils); W-LCR – Large Cell Ratio (neutrophils); PLT - Platelet Count; g/Dl - grams per deciliter; fL - femtoliters; pg - picograms. Data correspond to mean \pm standard deviation (SD). P-values were determined by Kruskal-Wallis and significant differences were detected by Dunn's multiple comparison test adjusted by Bonferroni. ^aSignificant difference compared to negative control; ^bSignificant difference compared to LED group; ^cSignificant difference compared to NanoALA-PDT group; ^dSignificant difference compared to ALA group.

Most treatments maintained the DNA integrity and standard distribution of cell cycle subpopulation of bone marrow cells (Figure 6b-c). Only the LED group presented small but significant increase of fragmented DNA compared to the negative control group (not in relation to the tumor control). This increase, however, was not sufficient to promote changes in the cell cycle.

The liver and spleen of all treated animals presented standard macroscopic features, without significant weight change compared to controls (Figure 6d). However, the histopathological liver analysis of the ALA-PDT group evidenced necrotic areas, intralobular focal lymphocytic infiltrate, isolate megakaryocytes and clusters of primitive non-tumor cells suggestive of hematopoise extramedullary (Figure 7a-b). Subpleural pulmonary micrometastasis was also identified in this group (n=1/4) (Figure 7c-d).

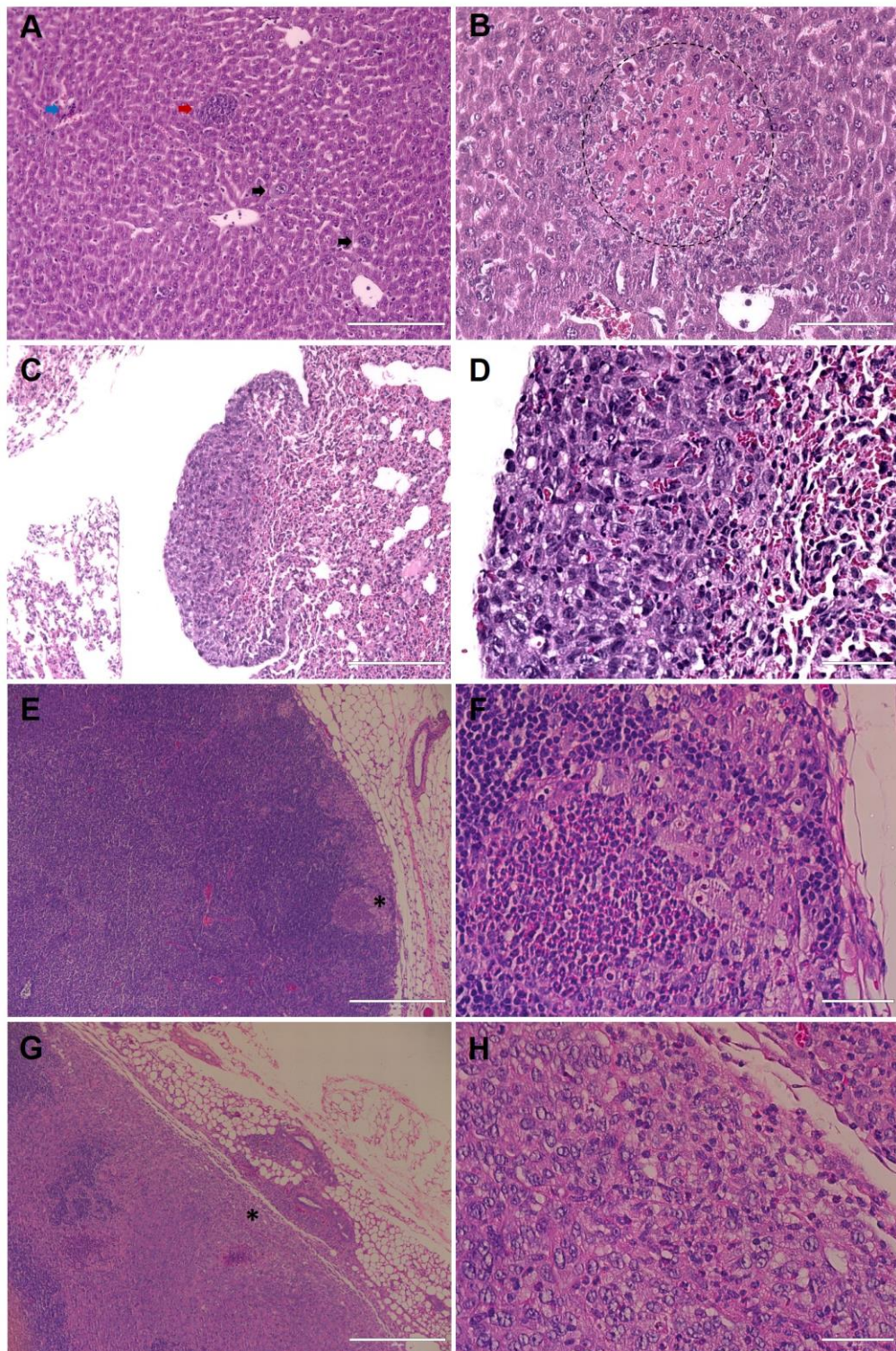


Figure 7: Liver, lung and sentinel lymph nodes histopathology. (A) Liver tissue from tumor-bearing mice treated with ALA-PDT presenting intralobular focal lymphocytic infiltrate (blue arrow), megakaryocytes (black arrow) and cluster of primitive cells (red arrow) (Scale bar: 200 μm) and (B) delimited liver area showing necrotic area (Scale bar: 100 μm). (C) Subpleural pulmonary micrometastasis from ALA-PDT group (Scale bar: 200 μm), (D) presenting polymorphonuclear and histiocytic infiltrates in the periphery (Scale bar: 50 μm). Sentinel lymph nodes tissue from (E) LED group (Scale bar: 400 μm) and (G) NanoALA-PDT group showing metastatic cells (*) (Scale bar: 400 μm). Details of metastatic 4T1 cells with increased nuclear/cytoplasmic ratio, a pleomorphic nucleus and multiple nucleoli from (F) LED group and (H) NanoALA-PDT group (Scale bars: 50 μm).

All tumor-bearing groups present reactive sentinel lymph nodes (SL) with sinus histiocytosis, but were more frequent in the control group. In addition, it was identified SL micrometastases in the LED and NanoALA-PDT groups (one mice each) (Figure 7e-h). Lymph node metastasis is one of the most important prognostic indicators in breast cancer and is related to increased risk of disease recurrence or dissemination to distant sites [5,54]. Despite this, until the 18th day after tumor transplantation no metastases were detected in the other organs analyzed (healthy breast, contralateral lymph nodes, spleen, liver, kidneys, heart and brain).

The evaluation of tumor tissue 7 days after the last treatment session is showed in Figure 8. The necrosis degree relative to total tumor surface (Figure 8a) was more intense in the NanoALA group but there was no significant difference compared to tumor control. It should be emphasized that the histopathological analysis (Figure 9) confirmed tumor remission in 60% of the mice of the NanoALA-PDT group and only one residual tumor was macroscopically detectable. In contrast, the ALA-PDT group showed no macroscopic tumor, but the microscopic analysis confirmed the presence of tumor tissue in 75% of the cases. As expected, there was a significant increase of the tumor volume in control, LED and ALA groups. Although not significant, the tumor volume of the NanoALA group also increased in the same analyzed period (Figure 8b). The measurement of bioluminescence from 4T1-luci cells by IVIS Lumina[®] suggests that PDT promotes a decrease in primary tumor progression compared to tumor control. While the control group showed a significant increase in bioluminescence between the pre (7th day) and post treatment (18th day), the PDT groups showed no statistical difference, but an evident decrease in bioluminescence intensity can be observed in these groups (Figure 8c). Furthermore, it was not possible to detect early metastasis in the thoracic region through the imaging system in the analyzed period (Figure 8d).

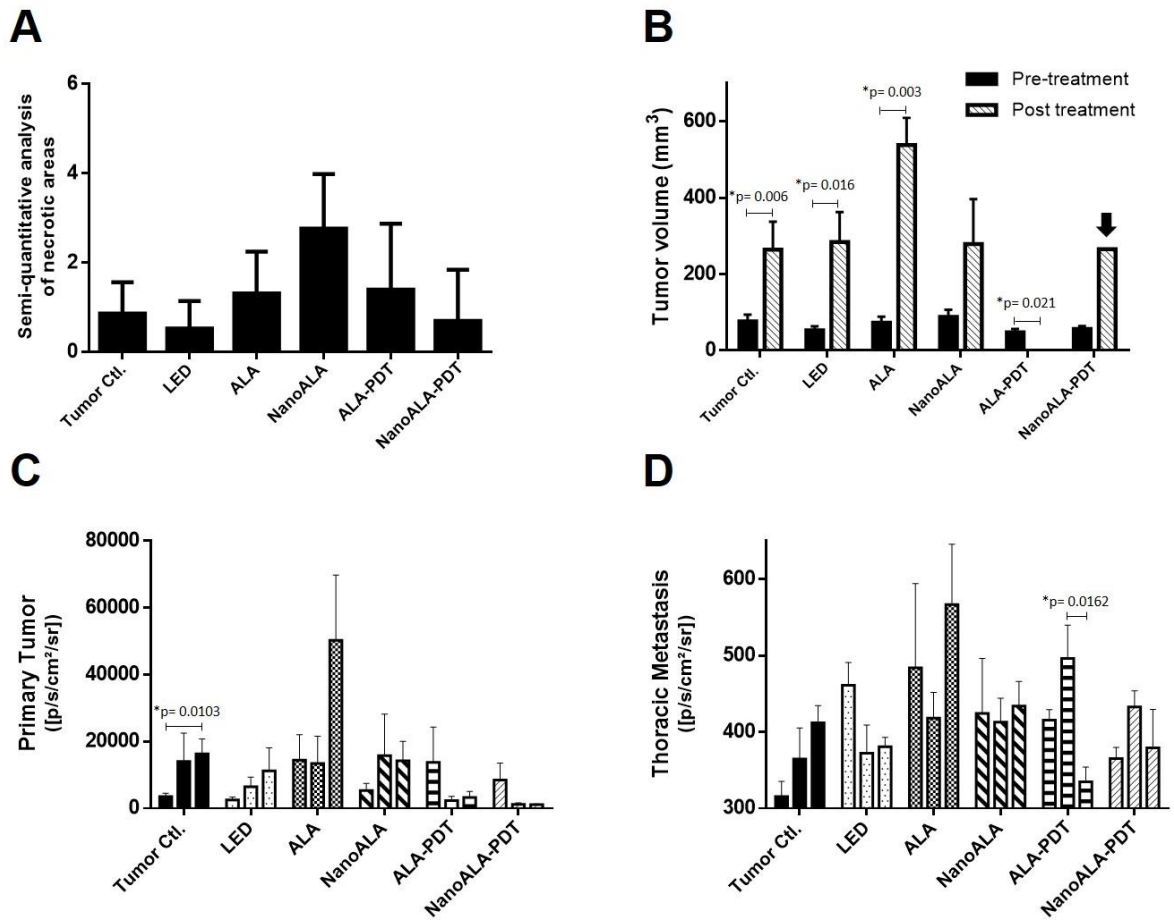


Figure 8: Evaluation of tumor tissue 7 days after the last treatment session. **(A)** Semi-quantitative analysis of necrotic areas (0-4: 0 for none, 4 for 100%). **(B)** Tumor volume (mm³) determined by digital caliper. The arrow indicates the tumor volume detected macroscopically in only one mice. Bioluminescence from 4T1-luci cells, expressed as radiance (p/s/cm²/sr), in the **(C)** primary tumor site and **(D)** thoracic site detected by The IVIS Lumina[®] imaging system on days 7, 13 and 18 (pre-treatment, 2 and 7 days after the last treatment session, respectively). Values are mean \pm SEM. P-values were generated by ANOVA (A) and Kruskal-Wallis (B-D). *Significant difference detected by Dunn's multiple comparison test adjusted by Bonferroni.

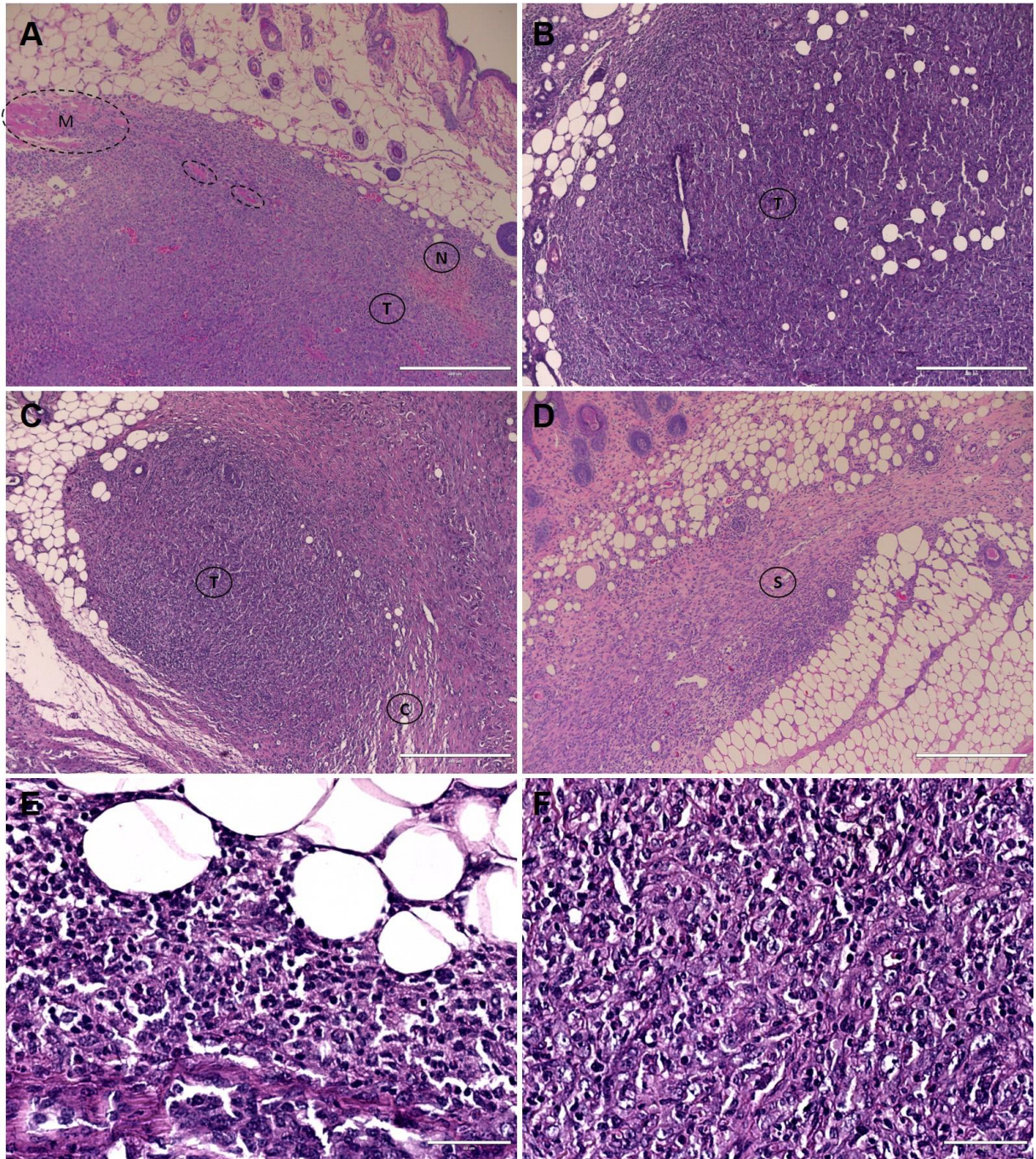


Figure 9: Histopathological analysis of the primary tumor site from mice (A) without treatment: primary tumor with small necrotic areas and progression to muscle invasion; (B) treated with ALA-PDT: extensive non-muscle-invasive viable tumor area; (C-D) treated with NanoALA-PDT: small area of encapsulated residual tumor without necrosis (C) and absence of tumor evidencing cicatricial process (D); (E-F) Detail of polymorphonuclear and histiocytic infiltrates in the periphery (E) and within the tumor mass (F) in ALA-PDT and NanoALA-PDT groups, respectively. T - viable tumor tissue; N – necrotic area; M – muscle; C – fibrous connective tissue capsule; S – scar. (A-D: scale bar - 400 μ m; E-F: scale bar - 50 μ m).

3.3 Long-term effect of PDT applied to breast cancer

The literature [5,51] reports an aggressive behavior of 4T1 cells. Therefore, in the last step of this work, the tumor control, ALA-PDT and NanoALA-PDT groups were monitored in the long-term to evaluate the effect of PDT on the prevention of distant metastasis and on survival rate of treated mice. Differently from the previous step, treated animals showed no significant change in body weight during the analyzed period (data no shown). However, up to the 35th day after tumor transplantation, the animals submitted to ALA-PDT (n = 4) presented lower survival rates than the tumor control (n = 5) and NanoALA-PDT (n = 5) groups, suggesting a poor tolerance to the treatment (Figure 10). The Figure 11 depicts the clinical evolution of the mice in response to PDT. All untreated mice presented a rapid primary tumor progression and metastatic outgrowth, while most PDT-treated mice showed no macroscopically visible tumor, only intensive wound healing process in the treatment site. It is also possible to observe alopecia and a gradual recovery of the lost hair in animals submitted to ALA-PDT.

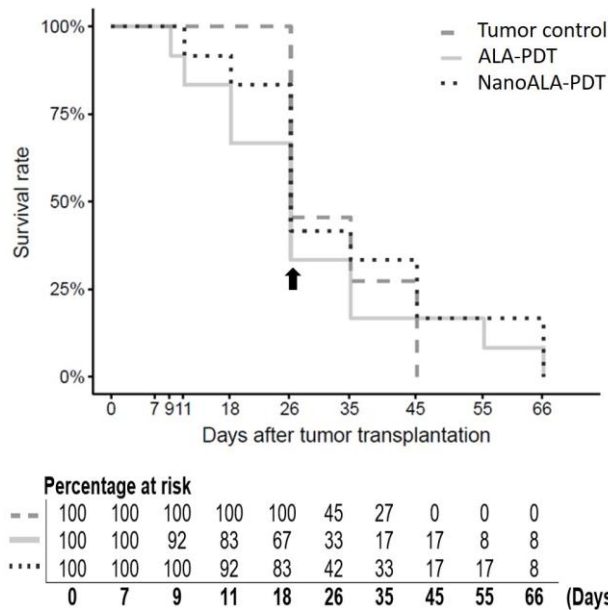


Figure 10: Kaplan Meier curves of survival time of PDT-treated tumor-bearing mice with numbers at risk table (p = 0.72). Note that half of the surviving animals until 18th day after tumor transplantation were euthanized (arrow) for analysis of biocompatibility and treatment efficacy.

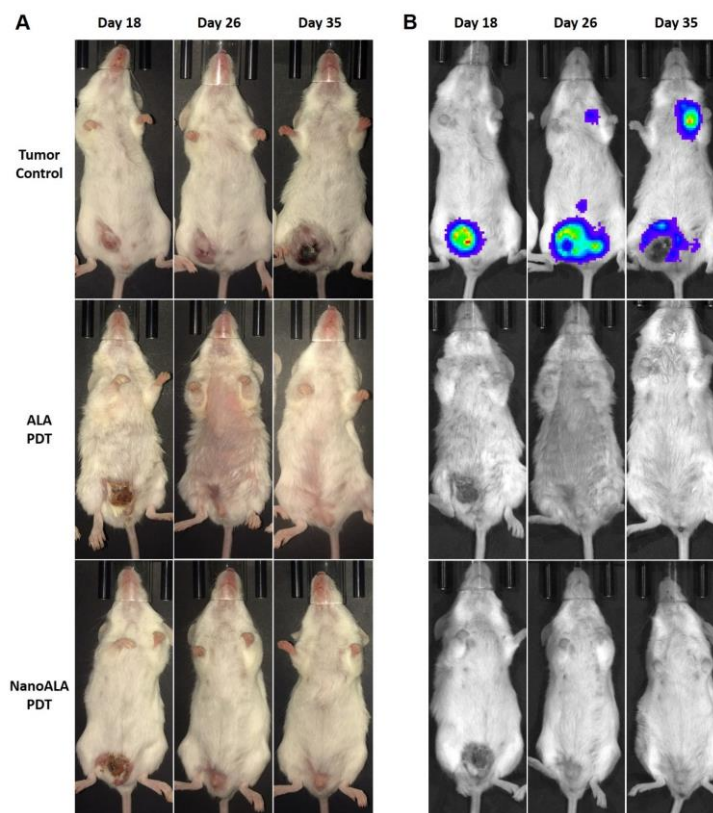


Figure 11: Clinical evolution of tumor-bearing mice in response to PDT. The images were obtained 18, 26 and 35 days after tumor transplantation (equivalent to 7, 15 and 24 days after the last treatment session). **(A)** Tumor control group with progressive increase of tumor mass and extensive necrotic area on day 35 and PDT-treated mice showing wound healing process in the treatment site and absence of macroscopic tumor mass. ALA-PDT-treated mice presenting alopecia followed by partial recovery of the lost hair. **(B)** Bioluminescence from 4T1-luci cells, expressed as radiance (p/s/cm²/sr) by IVIS Lumina[®] imaging system, evidencing tumor growth and distant metastases in the control group.

Distant metastases were detected 26 days after tumor transplantation in all groups (Figure 12). But they progressed faster in the tumor-bearing mice untreated, so that there were no more survivors on the 45th. So, the PDT attenuated not only the progression of the primary tumor but also the metastatic evolution, increasing the survival rate of the mice (Figure 10). These results were more evident for NanoALA-PDT which ensured a significantly lower tumor site bioluminescence intensity than the untreated control until 26th day, whereas in the animals submitted to ALA-PDT there was no significant difference compared to control (Figure 13). It is important to note that although the ALA-PDT group exhibited lower bioluminescence intensity in the primary tumor and thoracic region at 35th and 55th days compared to NanoALA-PDT group, there were half surviving animals compared to NanoALA-PDT on the same days. As shown in Figures 12, tumor cells spread was milder in the NanoALA group compared to the ALA group, which probably contributed to a higher

survival rate. The more relevant findings of NanoALA- and ALA-mediated photodynamic therapy are summarized in Table 6.

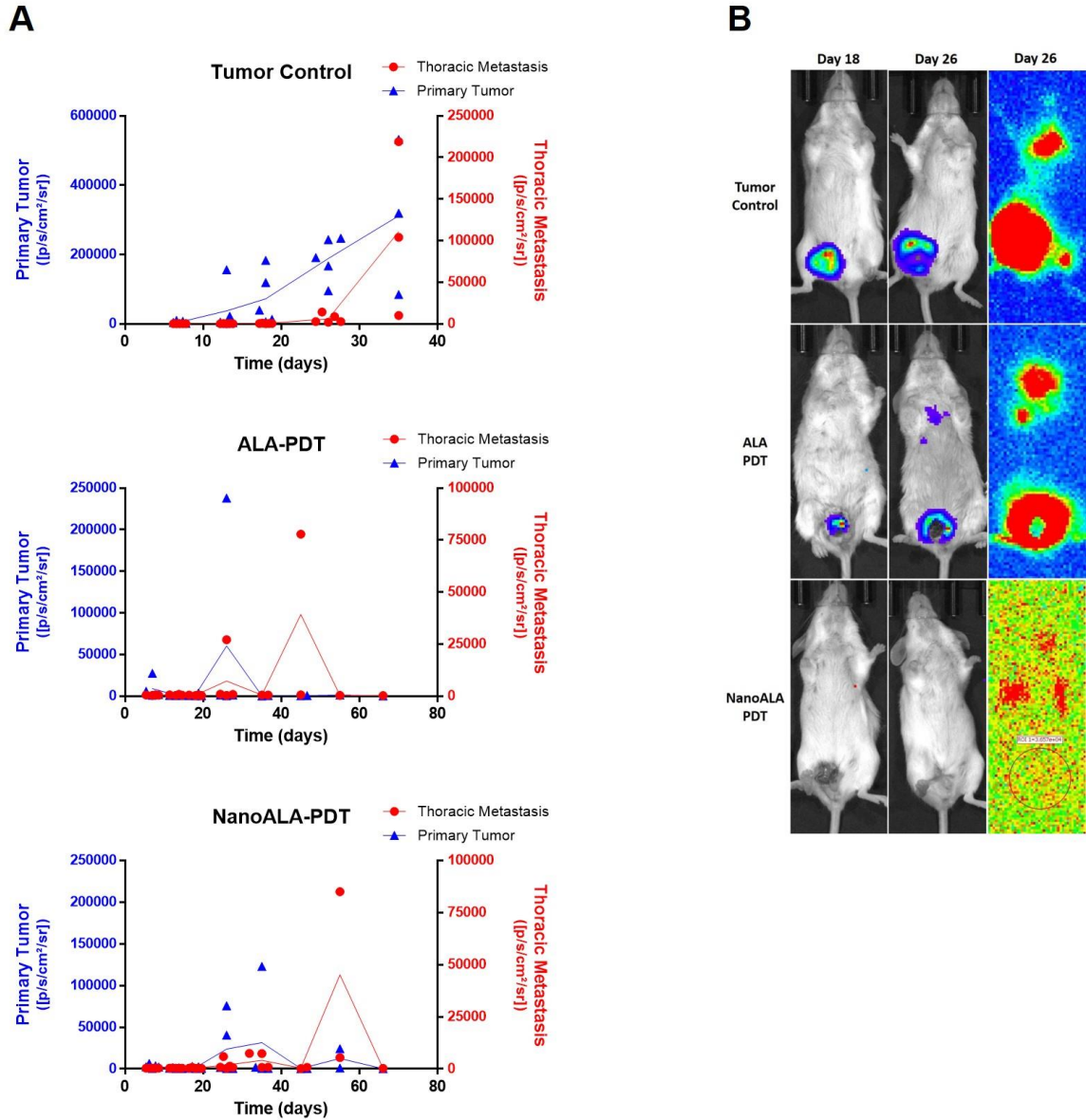


Figure 12: Long-term analysis of bioluminescence from 4T1-luci cells at primary tumor site and thoracic region of the tumor control, ALA-PDT and NanoALA-PDT groups. **(A)** Individual replicates of bioluminescence intensity with means connected. **(B)** Representative image of tumor growth and dissemination in the ALA and NanoALA groups on days 18 and 26 after tumor transplantation. Bioluminescence was expressed as radiance (p/s/cm²/sr) by IVIS Lumina® imaging system.

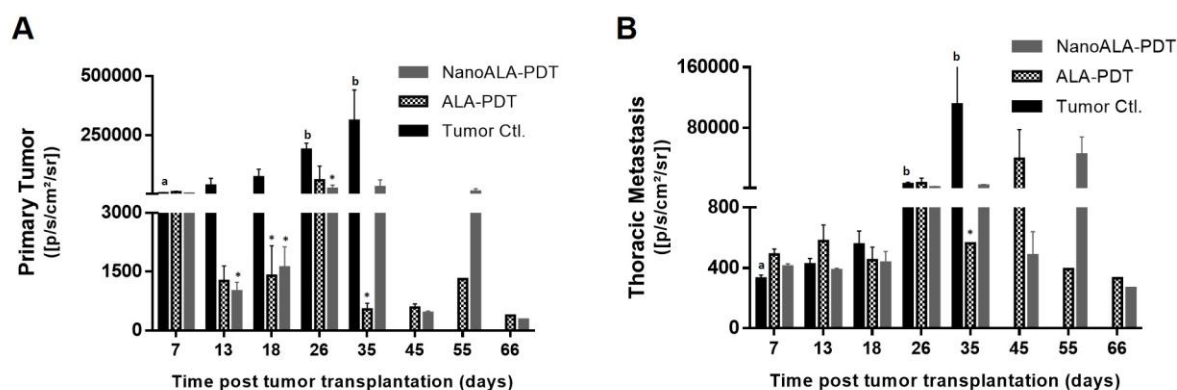


Figure 13: Summary data (mean \pm SEM) of bioluminescence intensity from 4T1-luci cells at (A) primary tumor site and (B) thoracic region of the tumor control, ALA-PDT and NanoALA-PDT groups. No survivors of the control group from day 35. The ALA-PDT and NanoALA-PDT bars on days 55 and 66, respectively, represent the bioluminescence intensity of single mice. Bioluminescence was expressed as radiance (p/s/cm²/sr) by IVIS Lumina[®] imaging system. P-values were generated by Kruskal-Wallis followed by Dunn's multiple comparison test adjusted by Bonferroni. *Comparisons between treated groups and control group in the same time. Letters: comparison of bioluminescence over time within the same group.

Table 6. Relevant findings of NanoALA- and ALA-mediated photodynamic therapy

Parameters evaluated	ALA-PDT	NanoALA-PDT
Intratumorally PpIX production	Higher production at 2 hours (2-fold greater than basal production)	Higher production at 1.5 hour (5-fold greater than basal production)
Biocompatibility		
<i>Clinical exams</i>	Alopecia	
<i>Histopathology</i>	Hepatic alterations	
Efficacy of treatment		
<i>Primary tumor</i>	25% tumor remission (1/4)	60% tumor remission (3/5)
<i>Metastasis</i>	Pulmonary metastasis (1/4)	Lymph node metastasis (1/5)
Tumor progression	No difference compared to untreated control on 26th day	Lower than the untreated control until 26th day
Distant metastasis	Detected on day 26	Detected on day 26, with milder progression.
Survival rate	67% on day 18	83% on day 18

4. DISCUSSION

In this work, an oil-in-water (o/w) polymeric nanoemulsion prepared by spontaneous emulsification is proposed to improve the photodynamic activity of ALA against mammary carcinoma. Consistent with our previous *in vitro* results [49], the nanoemulsion NanoALA promoted, in a shorter time (1.5 hour), greater PpIX accumulation by the tumor tissue compared to free ALA, as measured by tumour-selective red fluorescence relative to the autofluorescence of the normal mammary gland. González-Aguero et al. [26] report maximum accumulation of PpIX in murine model of breast cancer at 8 hours by intratumoral injection of 40 mg ALA/kg. Oral ALA administration also resulted in later accumulation of PpIX in mammary tumor [27,28]. We hypothesized that the PLGA nanocapsules prevent cyclic dimerization of ALA under physiological conditions and enhance its transport rate through the plasma membrane via endocytosis instead of slow and saturable active transport of free ALA [55–57]. Importantly, the photosensitive potential in the tumor tissue was low or negligible 24 hours after prodrug administration.

It is known that overproduced ALA/PpIX by the liver or bone marrow is related to the clinical manifestations of porphyrias, such as photosensitivity, skin lesions, nausea, abdominal pain, tachycardia without fever and seizures [53]. Although NanoALA increased liver PpIX levels, no signs of acute and chronic systemic toxicity were identified. In general, the animals were well tolerant to NanoALA-PDT. In contrast, the exposure to ALA-PDT resulted in higher mortality rate during treatment, liver abnormalities and alopecia, which suggests that the prodrug or its dimerization products (dihydropyrazine derivatives) were more diffusely distributed. According to Onuki et al. [58], micromolar concentrations of DHPY (3,6-dihydropyrazine-2,5-dipropionic acid) are sufficient to induce DNA damage (nuclear or mitochondrial) and cellular disorders by the generation of oxygen- and carbon-centered radicals. Preclinical and clinical studies also report a non-selective accumulation of ALA-induced PpIX in the liver, kidney, spleen, skin tissue (epidermis, hair follicles and associated sebaceous glands) [25,26,48] and nonmetastatic lymph node [27] from mammary carcinoma-bearing mice/patients, but there are no toxicity assessment records.

Some mice showed weight loss after chronic exposure to PDT, which can be explained, at least in part, by increased glycolytic metabolism associated with oxidative damage to mitochondria. We demonstrated previously that PpIX-loaded mitochondria are the initial targets of NanoALA-photoinduced damage [49]. This can result in impairment of aerobic

metabolism and induction of the anaerobic glycolytic pathway (with high glucose consumption) to supply the demand for adenosine triphosphate (ATP). Pereira et al. [59] demonstrated that chronically ALA-treated rats exhibited mitochondrial injuries concomitant to increased serum levels of lactate and fatty acid and decreased glycogen in liver and muscle fibers, supporting our hypothesis.

PDT-induced inflammatory response is an important priming event for the development of adaptive antitumor immunity [5,6,60,61]. NanoALA and ALA exposure resulted in acute systemic inflammation characterized by leukocytosis and/or increased middle cell ratio (monocytes, basophils and eosinophils) and initiated a local inflammatory response in the early phase post-PDT. An influx of leukocytes with major fraction of macrophages and polymorphonuclear cells into the primary tumor treated was observed, which significantly delayed their outgrowth and progression to distant metastases, according our hypothesis. As observed by others [62], the PDT can destroy resident M2 macrophages in tumor microenvironment - with high capacity for the uptake of administered PS -, and the newly recruited M1 macrophages can contribute to tumor destruction mediated by the production of nitric oxide (NO), interleukin-6 (IL-6) and tumor necrosis factor alpha (TNF- α). However, a homeostatic regulatory mechanism triggered by the tumor inflammatory microenvironment can, in turn, induce the polarization for a M2 phenotypic profile in the later phase post-PDT. These M2 macrophages are associated with production of anti-inflammatory cytokine, angiogenic factors, metalloproteinases and other mediators that promotes proliferation and survival of remaining tumor cells. Pansa et al. [63] demonstrated using *in vitro* 3D model that methyl-ALA-mediated PDT results both recurrence and remission of colorectal tumor depending, respectively, on the presence of resident (M2) or nonresident (M1) macrophages in tumor.

Although areas with leaky vasculature are an access points for therapeutic nanoparticles [64,65], the gains of selectivity and efficacy due to EPR-related phenomena are not universal. It depends on both the tumor progression stage (primary vs metastatic tumor, early vs late metastasis) and physical-chemical properties of drug delivery system (size, surface coverage) [66–68]. Fukuda et al. [48] report that peak of PpIX accumulation in mammary tumor was obtained only 10 hours after intratumoral injection of liposome encapsulated ALA (200 mg/kg wt), when the liver, spleen and kidney also showed significant amounts of PpIX. CuInS₂/ZnS quantum dots-ALA conjugates presented photocytotoxicity in MCF-7 cells 4 hours after incubation, but there is still no record *in vivo* [19]. Many other photodynamic

systems designed against breast cancer models are in early stage of test (*in vitro* assessments) or have practical drawbacks, such as non-approval of input pharmaceutical by regulatory agencies, high production cost, laborious production process, poor stability and undesirable systemic effects.

In a preliminary clinical trial [69], NanoALA overcame the effectiveness of MAL (Metvix[®]), its derivative methyl aminolevulinate, in targeting and treating skin field cancerization associated to actinic keratosis and/or photodamage. The orthotopic breast cancer model used in this work represents a deeper and more aggressive lesion. Even so improvements were found: (i) short exposure time, (ii) increased tumor selectivity, (iii) negligible adverse reactions, (iv) good long-term local tumor control, and (v) metastasis attenuation.

Most solid tumors spread to new sites via the lymphatic route before hematogenous dissemination [54,68,70]. However, most systemically administered chemotherapeutics are reabsorbed from the interstitium into blood capillaries and only a small fraction reaches metastatic lymph node due to their high intranodal pressure, which reduces the treatment efficacy [68]. In this way, the NanoALA/PpIX accumulation in the SL also could be exploited to prevent or eradicate early metastases. Taken together, the findings this study provide further robust advancement in the use of NanoALA-PDT as potential adjuvant/neoadjuvant intervention strategy in breast cancer treatments.

5. CONCLUSION

In summary, the response of breast cancer bearing-mice to NanoALA-mediated PDT, a third-generation ALA photosensitizer based on PLGA nanocapsules, was evaluated in three steps: (i) PpIX production and acute toxicity, (ii) biocompatibility and treatment efficacy, and (iii) long-term effect on tumor progression. A relevant aspect of our findings is the higher and more selective uptake of the prodrug by tumor cells when associated with a nanoveicle. While the literature reports prolonged periods of prodrug exposure in breast cancer models (over 3 hours), NanoALA overproduced PpIX in just 1.5 hours. As consequences, the therapy was well tolerated with high response rates for long-term primary mammary tumor control and prevention of distant metastasis.

REFERENCES

1. WHO | Breast Cancer Awareness Month in October. WHO [Internet]. World Health Organization; 2012 [cited 2017 Apr 29]; Available from: http://www.who.int/cancer/events/breast_cancer_month/en/
2. Pareja F, Marchiò C, Geyer FC, Weigelt B, Reis-Filho JS. Breast Cancer Heterogeneity: Roles in Tumorigenesis and Therapeutic Implications. *Curr. Breast Cancer Rep. Current Breast Cancer Reports*; 2017;9:34–44.
3. Allison R, Mang T, Hewson G, Snider W, Dougherty D. Photodynamic therapy for chest wall progression from breast carcinoma is an underutilized treatment modality. *Cancer*. 2001;91:1–8.
4. Fan H, Wang L, Zhang P, Liu S. Photodynamic therapy in spinal metastases: a qualitative analysis of published results. *Int. Surg.* 2015;100:712–9.
5. Longo JPF, Muehlmann LA, Miranda-Vilela AL, Portilho FA, de Souza LR, Silva JR, et al. Prevention of Distant Lung Metastasis After Photodynamic Therapy Application in a Breast Cancer Tumor Model. *J. Biomed. Nanotechnol.* [Internet]. 2016;12:689–99. Available from: <http://openurl.ingenta.com/content/xref?genre=article&issn=1550-7033&volume=12&issue=4&spage=689>
6. Castano AP, Mroz P, Hamblin MR. Photodynamic therapy and anti-tumour immunity. *Nat. Rev. Cancer* [Internet]. 2006;6:535–45. Available from: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nrc1894>
7. Banerjee SM, MacRobert AJ, Mosse CA, Periera B, Bown SG, Keshtgar MRS. Photodynamic therapy: Inception to application in breast cancer. *The Breast* [Internet]. 2017 [cited 2017 Apr 29];31:105–13. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960977616301771>
8. Chilakamarthi U, Giribabu L. Photodynamic Therapy: Past, Present and Future. *Chem. Rec.* [Internet]. 2017 [cited 2017 Apr 29]; Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/tcr.201600121>
9. Momma T, Hamblin MR, Wu HC, Hasan T. Photodynamic Therapy of Orthotopic Prostate Cancer with Benzoporphyrin Derivative : Local Control and Distant Metastasis Photodynamic Therapy of Orthotopic Prostate Cancer with Benzoporphyrin Derivative : Local Control and Distant Metastasis1. 1998;5425–31.
10. Chitgupi U, Qin Y, Lovell JF. Targeted Nanomaterials for Phototherapy. *Nanotheranostics* [Internet]. 2017 [cited 2017 Apr 29];1:38–58. Available from: <http://www.ntno.org>
11. Dennis E.J.G.J. Dolmans DF and RKJ. Photodynamic therapy for cancer. *Nat. Rev. Cancer* [Internet]. 2003;3:380–7. Available from: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nrc1070>
12. Castano AP, Demidova TN, Hamblin MR. Mechanisms in photodynamic therapy: Part two - Cellular signaling, cell metabolism and modes of cell death. *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* 2005;2:1–23.
13. Castano AP, Demidova TN, Hamblin MR. Mechanisms in photodynamic therapy: Part three - Photosensitizer pharmacokinetics, biodistribution, tumor localization and modes of tumor destruction. *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* 2005;2:91–106.

14. O'Connor AE, Gallagher WM, Byrne AT. Porphyrin and nonporphyrin photosensitizers in oncology: Preclinical and clinical advances in photodynamic therapy. *Photochem. Photobiol.* 2009;85:1053–74.
15. Navone NM, Polo CF, Frisardi AL, Andrade NE, alcira alcira M. Heme biosynthesis in human breast cancer-mimetic “in vitro” studies and some heme enzymic activity levels. *Int. J. Biochem.* 1990;22:1407–11.
16. Castano AP, Demidova TN, Hamblin MR. Mechanisms in photodynamic therapy: Part one - Photosensitizers, photochemistry and cellular localization. *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* 2004;1:279–93.
17. Dorward AM, Fancher KS, Duffy TM, Beamer WG, Walt H. Early neoplastic and metastatic mammary tumours of transgenic mice detected by 5-aminolevulinic acid-stimulated protoporphyrin IX accumulation. *Br. J. Cancer [Internet]*. 2005;93:1137–43. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2361508&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
18. Millon SR, Ostrander JH, Yazdanfar S, Brown JQ, Bender JE, Rajeha A, et al. Preferential accumulation of 5-aminolevulinic acid-induced protoporphyrin IX in breast cancer: a comprehensive study on six breast cell lines with varying phenotypes. *J. Biomed. Opt. [Internet]*. 2010;15:18002–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1117/1.3302811>
19. Feng Y, Liu L, Hu S, Liu Y, Ren Y, Zhang X. Forster resonance energy transfer properties of a new type of near-infrared excitation PDT photosensitizer: CuInS₂/ZnS quantum dots-5-aminolevulinic acid conjugates. *RSC Adv. [Internet]*. The Royal Society of Chemistry; 2016;6:55568–76. Available from: <http://dx.doi.org/10.1039/C6RA06937A>
20. Gibbs SL, Chen B, O'Hara JA, Hoopes PJ, Hasan T, Pogue BW. Protoporphyrin IX Level Correlates with Number of Mitochondria, But Increase in Production Correlates with Tumor Cell Size. *Photochem. Photobiol. [Internet]*. 2006;82:1334. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1562/2006-03-11-RA-843>
21. Sailer R, Strauss WSL, Wagner M, Emmert H, Schneckenburger H. Relation between intracellular location and photodynamic efficacy of 5-aminolevulinic acid-induced protoporphyrin IX in vitro. Comparison between human glioblastoma cells and other cancer cell lines. *Photochem. Photobiol. Sci. [Internet]*. 2007;6:145–51. Available from: <http://xlink.rsc.org/?DOI=B611715E>
22. Rodriguez L, DiVenosa G, Batlle A, MacRobert A, Casas A. Response to ALA-based PDT in an immortalised normal breast cell line and its counterpart transformed with the Ras oncogene. *Photochem. Photobiol. Sci. [Internet]*. The Royal Society of Chemistry; 2007;6:1306–10. Available from: <http://dx.doi.org/10.1039/B704235C>
23. Tsai T, Ji HT, Chiang PC, Chou RH, Chang WSW, Chen CT. ALA-PDT results in phenotypic changes and decreased cellular invasion in surviving cancer cells. *Lasers Surg. Med.* 2009;41:305–15.
24. Palasuberniam P, Yang X, Kraus D, Jones P, Myers KA, Chen B. ABCG2 transporter inhibitor restores the sensitivity of triple negative breast cancer cells to aminolevulinic acid-mediated photodynamic therapy. *Sci. Rep. [Internet]*. Nature Publishing Group; 2015;5:13298. Available from: <http://www.nature.com/articles/srep13298>
25. Peng Q, Moan J, Warloe T, Nesland JM, Rimington C. Distribution and photosensitizing efficiency of porphyrins induced by application of exogenous 5-aminolevulinic acid in mice bearing mammary carcinoma. *Int. J. Cancer.* 1992;52:433–43.

26. González-Agüero G, Ramón-Gallegos E. Comparative study of two routes of administration of 5-aminolevulinic acid (oral and intratumoral via) and their effect on the accumulation of PpIX in tissues in murine model of breast cancer. 2012 [cited 2017 Aug 27]. p. 158–60. Available from: <http://aip.scitation.org/doi/abs/10.1063/1.4764630>
27. Ladner DP, Steiner RA, Allemann J, Haller U, Walt H. Photodynamic diagnosis of breast tumours after oral application of aminolevulinic acid. *Br. J. Cancer* [Internet]. 2001;84:33–7. Available from: <http://www.nature.com/doi/abs/10.1054/bjoc.2000.1532>
28. Frei K a, Bonel HM, Frick H, Walt H, Steiner R a. Photodynamic detection of diseased axillary sentinel lymph node after oral application of aminolevulinic acid in patients with breast cancer. *Br. J. Cancer* [Internet]. 2004;90:805–9. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2410184&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
29. Josefsen LB, Boyle RW. Photodynamic therapy: novel third-generation photosensitizers one step closer? *Br. J. Pharmacol.* [Internet]. 2008;154:1–3. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1038/bjp.2008.98>
30. Kataoka H, Nishie H, Hayashi N, Tanaka M, Nomoto A, Yano S, et al. New photodynamic therapy with next-generation photosensitizers. *Ann. Transl. Med.* [Internet]. 2017;5:183–183. Available from: <http://atm.amegroups.com/article/view/14467/14770>
31. Zhang J, Jiang C, Paulo J, Longo F, Bentes R, Zhang H, et al. An updated overview on the development of new photosensitizers for anticancer photodynamic therapy. *Acta Pharm. Sin. B* [Internet]. Elsevier B.V.; 2017;0–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.apsb.2017.09.003>
32. Calavia PG, Chambrier I, Cook MJ, Haines AH, Field RA, Russell DA. Targeted photodynamic therapy of breast cancer cells using lactose-phthalocyanine functionalized gold nanoparticles Targeted photodynamic therapy of breast cancer cells using lactose-phthalocyanine functionalized gold nanoparticles. *J. Colloid Interface Sci.* [Internet]. 2017; Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2017.10.030>
33. Pais-Silva C, de Melo-Diogo D, Correia IJ. IR780-loaded TPGS-TOS micelles for breast cancer photodynamic therapy. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* [Internet]. Elsevier B.V.; 2017;113:108–17. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejpb.2017.01.002>
34. Nam G, Rangasamy S, Ju H, Samson AAS, Song JM. Cell death mechanistic study of photodynamic therapy against breast cancer cells utilizing liposomal delivery of 5,10,15,20-tetrakis(benzo[b]thiophene) porphyrin. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* [Internet]. Elsevier B.V.; 2017;166:116–25. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2016.11.006>
35. Muehlmann LA, Rodrigues MC, Longo JPF, Garcia MP, Py-Daniel KR, Veloso AB, et al. Aluminium-phthalocyanine chloride nanoemulsions for anticancer photodynamic therapy: Development and in vitro activity against monolayers and spheroids of human mammary adenocarcinoma MCF-7 cells. *J. Nanobiotechnology* [Internet]. ???; 2015;13:36. Available from: <http://www.jnanobiotechnology.com/content/13/1/36>
36. Muehlmann LA, Ma BC, Longo JPF, Almeida Santos MF de M, Azevedo RB. Aluminum-phthalocyanine chloride associated to poly(methyl vinyl ether-co-maleic anhydride) nanoparticles as a new third-generation photosensitizer for anticancer photodynamic therapy. *Int. J. Nanomedicine.* 2014;9:1199–213.
37. Shemesh CS, Hardy CW, Yu DS, Fernandez B, Zhang H. Indocyanine green loaded liposome nanocarriers for photodynamic therapy using human triple negative breast cancer cells. *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* [Internet]. Elsevier B.V.; 2014;11:193–203. Available

from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pdpdt.2014.02.001>

38. Yan F, Wu H, Liu H, Deng Z, Liu H, Duan W, et al. Molecular imaging-guided photothermal/photodynamic therapy against tumor by iRGD-modified indocyanine green nanoparticles. *J. Control. Release* [Internet]. Elsevier B.V.; 2016;224:217–28. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2015.12.050>
39. Konan YN, Berton M, Gurny R, Allémann E. Enhanced photodynamic activity of meso-tetra(4-hydroxyphenyl)porphyrin by incorporation into sub-200 nm nanoparticles. *Eur. J. Pharm. Sci.* 2003;18:241–9.
40. Lee Y-H, Chang D-S. Fabrication, characterization, and biological evaluation of anti-HER2 indocyanine green-doxorubicin-encapsulated PEG-b-PLGA copolymeric nanoparticles for targeted photochemotherapy of breast cancer cells. *Sci. Rep.* [Internet]. Nature Publishing Group; 2017;7:46688. Available from: <http://www.nature.com/articles/srep46688>
41. Wang B-Y, Liao M-L, Hong G-C, Chang W-W, Chu C-C. Near-Infrared-Triggered Photodynamic Therapy toward Breast Cancer Cells Using Dendrimer-Functionalized Upconversion Nanoparticles. *Nanomaterials* [Internet]. 2017;7:269. Available from: <http://www.mdpi.com/2079-4991/7/9/269>
42. Wan G, Chen B, Li L, Wang D, Shi S, Zhang T, et al. Nanoscaled red blood cells facilitate breast cancer treatment by combining photothermal/photodynamic therapy and chemotherapy. *Biomaterials* [Internet]. Elsevier Ltd; 2018;155:25–40. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0142961217307238>
43. Cheng S-H, Lee C-H, Yang C-S, Tseng F-G, Mou C-Y, Lo L-W. Mesoporous silica nanoparticles functionalized with an oxygen-sensing probe for cell photodynamic therapy: potential cancer theranostics. *J. Mater. Chem.* [Internet]. 2009;19:1252. Available from: <http://xlink.rsc.org/?DOI=b816636f>
44. Zhao N, Wu B, Hu X, Xing D. NIR-triggered high-efficient photodynamic and chemocascade therapy using caspase-3 responsive functionalized upconversion nanoparticles. *Biomaterials* [Internet]. Elsevier Ltd; 2017;141:40–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2017.06.031>
45. Yurt F, Ocakoglu K, Ince M, Colak SG, Er O, Soylu HM, et al. Photodynamic Therapy and Nuclear Imaging Activities of Zinc Phthalocyanine Integrated TiO₂ Nanoparticles in Breast and Cervical Tumors. *Chem. Biol. Drug Des.* [Internet]. 2017 [cited 2017 Nov 25]; Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/cbdd.13144>
46. Hosseinzadeh R, Khorsandi K. Methylene blue, curcumin and ion pairing nanoparticles effects on photodynamic therapy of MDA-MB-231 breast cancer cell. *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* [Internet]. Elsevier B.V.; 2017;18:284–94. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pdpdt.2017.03.005>
47. Penon O, Marín MJ, Russell DA, Pérez-García L. Water soluble, multifunctional antibody-porphyrin gold nanoparticles for targeted photodynamic therapy. *J. Colloid Interface Sci.* [Internet]. 2017;496:100–10. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcis.2017.02.006>
48. Fukuda H, Paredes S, del C. Battle AM. Tumour-localizing properties of porphyrins in vivo studies using free and liposome encapsulated aminolevulinic acid. *Comp. Biochem. Physiol. Part B Comp. Biochem.* [Internet]. 1992;102:433–6. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/030504919290147J>
49. de Andrade LR, Primo FL, da Silva JR, Tedesco AC, Lacava ZGM. In vitro assessment of anti-tumorigenic mechanisms and efficacy of NanoALA, a nanoformulation of aminolevulinic acid designed for photodynamic therapy of cancer. *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* [Internet].

Elsevier; 2017;20:62–70. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pdpdt.2017.08.011>

50. Makadia HK, Siegel SJ. Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) as Biodegradable Controlled Drug Delivery Carrier. *Polymers (Basel)*. [Internet]. 2011;3:1377–97. Available from: <http://www.mdpi.com/2073-4360/3/3/1377>

51. 4T1 ATCC ® CRL-2539™ Mus musculus mammary gland This tumor i [Internet]. [cited 2017 Apr 29]. Available from: <https://www.atcc.org/Products/All/CRL-2539.aspx>

52. Dos Santos Câmara AL, Nagel G, Tschiche HR, Cardador CM, Muehlmann LA, De Oliveira DM, et al. Acid-sensitive lipidated doxorubicin prodrug entrapped in nanoemulsion impairs lung tumor metastasis in a breast cancer model. *Nanomedicine*. 2017;12.

53. Bissell DM, Anderson KE, Bonkovsky HL. Porphyrin. *N. Engl. J. Med.* [Internet]. 2017;377:862–72. Available from: <http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMra1608634>

54. de Boniface J, Frisell J, Andersson Y, Bergkvist L, Ahlgren J, Rydén L, et al. Survival and axillary recurrence following sentinel node-positive breast cancer without completion axillary lymph node dissection: the randomized controlled SENOMAC trial. *BMC Cancer* [Internet]. *BMC Cancer*; 2017;17:379. Available from: <http://bmccancer.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12885-017-3361-y>

55. Bermúdez Moretti M, Correa García S, Perotti C, Batlle a, Casas a. Delta-Aminolevulinic acid transport in murine mammary adenocarcinoma cells is mediated by beta transporters. *Br. J. Cancer*. 2002;87:471–4.

56. Issa MCA, Manela-Azulay M. Terapia fotodinâmica: revisão da literatura e documentação iconográfica. *An. Bras. Dermatol.* [Internet]. Sociedade Brasileira de Dermatologia; 2010 [cited 2017 Nov 15];85:501–11. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0365-05962010000400011&lng=pt&tlng=pt

57. Shi L, Wang X, Zhao F, Luan H, Tu Q, Huang Z, et al. In vitro evaluation of 5-aminolevulinic acid (ALA) loaded PLGA nanoparticles. *Int. J. Nanomedicine* [Internet]. 2013 [cited 2017 Apr 29];8:2669–76. Available from: <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.779.4583&rep=rep1&type=pdf>

58. Onuki J, Teixeira PC, Medeiros MHG, Di Mascio P. Danos ao DNA promovidos por ácido 5-aminolevulinico: possível associação com o desenvolvimento de carcinoma hepatocelular em portadores de porfiria aguda intermitente. *Quim. Nova* [Internet]. SBQ; 2002 [cited 2017 Nov 16];25:594–608. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422002000400015&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt

59. Pereira B, Curi R, Kokubun E, Bechara EJ. 5-aminolevulinic acid-induced alterations of oxidative metabolism in sedentary and exercise-trained rats. *J. Appl. Physiol.* [Internet]. American Physiological Society; 1992 [cited 2017 Nov 20];72:226–30. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1537718>

60. Gollnick SO, Evans SS, Baumann H, Owczarczak B, Maier P, Vaughan L, et al. Role of cytokines in photodynamic therapy-induced local and systemic inflammation. *Br. J. Cancer* [Internet]. 2003 [cited 2017 Nov 20];88:1772–9. Available from: <http://www.nature.com/articles/6600864>

61. Yeung H-Y, Lo P-C, Ng DKP, Fong W-P. Anti-tumor immunity of BAM-SiPc-mediated vascular photodynamic therapy in a BALB/c mouse model [Internet]. *Cell Mol Immunol. Chinese Society of Immunology and The University of Science and Technology*; 2017. p. 223–34. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/cmi.2015.84>

62. Korbelik M, Hamblin MR. The impact of macrophage-cancer cell interaction on the efficacy of photodynamic therapy. *Photochem. Photobiol. Sci.* [Internet]. 2015 [cited 2017 Nov 23];14:1403–9. Available from: <http://xlink.rsc.org/?DOI=C4PP00451E>
63. Pansa MF, Lamberti MJ, Cogno IS, Correa SG, Rumie Vittar NB, Rivarola VA. Contribution of resident and recruited macrophages to the photodynamic intervention of colorectal tumor microenvironment. *Tumor Biol.* [Internet]. 2016 [cited 2017 Nov 23];37:541–52. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s13277-015-3768-5>
64. Torchilin V. Tumor delivery of macromolecular drugs based on the EPR effect. *Adv. Drug Deliv. Rev.* [Internet]. Elsevier B.V.; 2011;63:131–5. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2010.03.011>
65. Goldman E, Zinger A, Silva D, Yaari Z. Nanoparticles target early-stage breast cancer metastasis in vivo. IOP Publishing; 2017;
66. Meng H, Xue M, Xia T, Ji Z, Tarn DY, Zink JJ, et al. Use of size and a copolymer design feature to improve the biodistribution and the enhanced permeability and retention effect of doxorubicin-loaded mesoporous silica nanoparticles in a murine xenograft tumor model. *ACS Nano.* 2011;5:4131–44.
67. Kiseliovas V, Milosevic M, Kojic M, Mazutis L, Kai M, Liu YT, et al. Tumor progression effects on drug vector access to tumor-associated capillary bed. *J. Control. Release* [Internet]. Elsevier B.V; 2017;261:216–22. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2017.05.031>
68. Mikada M, Sukhbaatar A, Miura Y, Horie S, Sakamoto M, Mori S, et al. Evaluation of the enhanced permeability and retention effect in the early stages of lymph node metastasis. *Cancer Sci.* 2017;108:846–52.
69. Passos SK, de Souza PE, Soares PK, Eid DR, Primo FL, Cláudio Tedesco A, et al. Quantitative approach to skin field cancerization using a nanoencapsulated photodynamic therapy agent: a pilot study. *Clin. Cosmet. Investig. Dermatol.* [Internet]. 2013 [cited 2017 Apr 29];6:51–9. Available from: http://s3.amazonaws.com/academia.edu.documents/45636061/Quantitative_approach_to_skin_field_canc20160514-19397-56uhxm.pdf?AWSAccessKeyId=AKIAIWOWYYGZ2Y53UL3A&Expires=1493494339&Signature=6JXWtaHfXUPNjY5fGgC%2BoQg3pDg%3D&response-content-disposition=inline
70. Marinho VFZ, Zagury MS, Caldeira LG, Gobbi H. Micrometástases de carcinoma da mama em linfonodos axilares: detecção por imunoistoquímica versus hematoxilina e eosina. *J. Bras. Patol. e Med. Lab.* [Internet]. SBPC, SBP, SBC; 2004 [cited 2017 Nov 26];40:127–32. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1676-24442004000200012&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt

5. CONSIDERAÇÕES GERAIS

A associação entre FS, luz e oxigênio é amplamente empregado na dermatologia para tratamento de lesões cutâneas e fotorrejuvenescimento. Esse processo foi impulsionado no final da década de 1990 com a aprovação do ALA, precursor do FS fluorescente PpIX, pelo órgão regulatório americano para tratamento de queratose actínica (ISSA, 2010). Um pouco mais tarde, também foi aprovado para a detecção e visualização de tecidos malignos durante a cirurgia de glioma (FDA, 2017). Esse potencial diagnóstico do ALA tem sido investigado em outros tipos de lesões oncológicas, como metástase de câncer de ovário (HILLEMANN et al., 2017), metástase peritoneal (YONEMURA et al., 2017), neoplasia intraepitelial cervical (HILLEMANN et al., 2000), tumor mamário (LADNER et al., 2001), bem como metástase linfonodal de câncer de mama (FREI et al., 2004). No entanto, estudos exploratórios do potencial terapêutico do ALA em neoplasias não-cutâneas são muito limitados (PENG et al., 1992; CANBAY et al., 2017; INOUE, 2017), o que está relacionado a sua baixa capacidade de penetração pelas barreiras biológicas.

Considerando as propriedades vantajosas do ALA em relação a outros FS - acumulação preferencial em tecidos neoplásicos ou displásicos e baixos riscos de fotossensibilidade prolongada (ISSA, 2010; PASSOS et al., 2013) -, nosso grupo de pesquisa se propôs a melhorar a performance do pró-fármaco associando-o a nanocápsulas de PLGA, um polímero biocompatível (MAKADIA & SIEGEL, 2011; PASSOS et al., 2013). Neste trabalho, avaliamos a sua biocompatibilidade e eficácia na TFD aplicada a modelos experimentais de câncer de mama (representativos de lesão oncológica profunda e invasiva), bem como a capacidade de permeação e retenção cutânea em pele suína, altamente semelhante a pele humana em termos estruturais e de composição.

Sabe-se o sucesso da TFD depende, dentre outros fatores, de uma ótima absorção e distribuição do FS (O'CONNOR et al., 2009). Observamos, tanto nos modelos *in vitro* quanto *in vivo*, que o NanoALA promoveu maior captação de pró-fármaco pelas células tumorais, o que aprimorou o processo fotodinâmico comparado ao ALA livre. Enquanto a literatura reporta tempos de exposição superiores a 4 horas para sistemas nanoestruturados de ALA designados para tratamento de tumor mamário (FUKUDA et al., 1992; FENG et al., 2016), nós demonstramos, pela primeira vez, um significativo efeito terapêutico com apenas 1,5 horas de exposição. O acúmulo mais seletivo de pró-fármaco no tumor, aliado ao curto

período de exposição e à degradação de PpIX após a irradiação, contribuíram para a eficácia e biocompatibilidade da formulação. Apesar da dose recomendada de ALA ser de 20 mg/Kg de peso corporal (FDA, 2017), não foram observados efeitos adversos consideráveis com a administração intratumoral de NanoALA em dose até 20× superior.

Conforme demonstrado em trabalhos prévios, a via de administração influencia diretamente no acúmulo de PpIX no tecido tumoral, sendo que níveis mais elevados de FS são obtidos após injeção intratumoral de ALA quando comparada às vias oral (GONZÁLEZ-AGUERO & RÁMON-GALLEGOS, 2012), intraperitoneal ou subcutânea (FUKUDA et al., 1992). Além disso, existem evidências de que os sistemas nanoestruturados têm o potencial de aumentar a estabilidade do ALA em condições fisiológicas e promover maior captação pelas células-alvo por meio de endocitose ou descontinuidades da membrana (SHI et al., 2013).

Nos ensaios de liberação *in vitro*, observamos que o nanossistema restringiu a liberação de pró-fármaco em condições biológicas tumorais. A liberação sustentada reforça a hipótese de que as nanocápsulas de PLGA aumentam a estabilidade do ALA, garantindo que uma menor quantidade de pró-fármaco permaneça sob a forma livre no ambiente extracelular susceptível às reações de dimerização/degradação. Esses resultados somados aos perfis de permeação cutânea similares entre o ALA livre e o NanoALA sugerem também que as nanocápsulas atuam nas membranas biológicas permeabilizando-as e facilitando a sua incorporação. Nesse contexto, conjecturamos que o elevado nível de PpIX nas células tumorais de mama foi um fenômeno multifatorial favorecido pela via de administração, pela estabilidade físicoquímica da formulação e pelo transporte passivo pelas membranas celulares.

É inédita a atenuação do crescimento de tumores mamários e de metástases distantes com ALA nanoveiculado. As massas tumorais foram substancialmente reduzidas com apenas três sessões de tratamento, sendo que alguns animais não apresentaram células remanescentes no sítio primário. Os estudos *in vitro* sugerem que o mecanismo fotocitotóxico da TFD-NanoALA está associado aos danos oxidativos às mitocôndrias e às desordens no metabolismo energético, culminando em morte celular por apoptose. Com base nessa evidência e outras relatadas na literatura (PEREIRA et al., 1992), hipotetizamos que a perda de peso de alguns animais tratados pode estar relacionada à indução do metabolismo glicolítico anaeróbico em resposta ao comprometimento da via aeróbica mitocondrial.

É bem documentado o potencial anti-tumoral da TFD, que provavelmente está associado a maior taxa de sobrevivência livre de tumor dos animais submetidos à TFD-NanoALA. O grande influxo observado de polimorfonucleares e macrófagos em resposta aos efeitos fototóxicos suportam a teoria do desenvolvimento de imunidade adaptativa por meio do processamento de peptídeos tumor-específicos e sensibilização de células T-citotóxicas CD8⁺ (CASTANO et al., 2006).

É importante ressaltar que os animais apresentaram uma menor tolerância à TFD-ALA. A mortalidade após as sessões de tratamento, bem como alopecia e alterações hepáticas observadas provavelmente estão associadas à distribuição sistêmica de ALA e/ou de seus produtos de degradação com potencial pró-oxidativo (ONUKEI et al., 2002). O efeito EPR associado à arquitetura anormal dos vasos tumorais tem papel desprezível para pequenas moléculas como o ALA livre, mas pode ser vantajoso para a retenção sítio-específica de nanossistemas (OLIVEIRA et al., 2012).

Nesse trabalho, também foi investigada outra via de aplicação de NanoALA, a aplicação tópica. Embora não tenham sido realizados testes de eficácia de tratamento a partir dessa via, observou-se que o NanoALA é capaz de permear e ficar retido em estruturas dérmicas mais profundas, o que amplia o potencial de emprego da TFD-NanoALA para o tratamento de lesões cutâneas em que a eficácia do ALA livre é muito limitada, como carcinoma basocelular nodular ou mesmo metástases cutâneas de tumores internos.

Os resultados compilados apontam o NanoALA como um promissor agente fotodinâmico contra o câncer. Apesar de não ter alcançado a remissão completa dos tumores mamários, a acentuada redução da massa tumoral dos animais tratados amplia as perspectivas de emprego da TFD-NanoALA como estratégia de terapia adjuvante/neoadjuvante para tumores internos, como o câncer de mama, bem como tratamento primário de lesões cutâneas, apresentando eficácia terapêutica superior ao ALA livre ou outras formulações de ALA descritas na literatura até o momento.

6. CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos, pode-se concluir:

- O método analítico proposto para a quantificação de ALA, a cromatografia líquida de alta eficiência, bem como o processo de extração do pró-fármaco a partir de pele suína foram validados conforme as exigências do ICH *guidelines*, garantindo a confiabilidade dos experimentos quantitativos;

- A nanoemulsão polimérica sustentou em, aproximadamente, duas vezes o fluxo de liberação de pró-fármaco;

- O perfil de permeação do NanoALA foi similar ao do ALA;

- O NanoALA diminuiu a retenção de pró-fármaco no estrato córneo e aumentou seu acúmulo nos folículos pilosos;

- A produção de PpIX endógena variou de acordo com concentração de pró-fármaco e o tempo de exposição. Em apenas 1 hora de incubação, o NanoALA promoveu um aumento significativo de PpIX comparado ao ALA livre em células 4T1;

- NanoALA apresentou citotoxicidade na ausência de luz após 24 horas de incubação com elevadas concentrações ($\geq 50 \mu\text{g.mL}^{-1}$);

- NanoALA foi fotocitotóxico nos tempos de incubação de 1, 6 e 24 horas em concentrações superiores a $6,25 \mu\text{g.mL}^{-1}$, enquanto ALA apresentou fototoxicidade somente após 24 horas. O efeito tóxico variou de acordo com a concentração testada;

- Quando irradiado, o NanoALA induziu alterações no potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$), aumento da produção de ROS e fragmentação de DNA, culminando em morte celular por apoptose;

- Células 4T1-*luci* foram transplantadas ortotopicamente em camundongos Balb/c e os tumores gerados foram detectados clinicamente após sete dias, apresentando bioluminescência típica;

- A maior produção de PpIX intratumoral ocorreu 1,5 horas após a administração de NanoALA e a fluorescência detectada foi cerca de 5× mais intensa do que nos animais tratados com ALA;

- A análise *ex vivo* confirmou o acúmulo preferencial de PpIX no sítio tumoral em 1,5 horas após administração de NanoALA;

- Não foram observadas alterações clínicas, bioquímicas, genotóxicas e alterações histopatológicas em órgãos não-alvo 24 horas após injeção de elevada dose de NanoALA e ALA;
- Elevada dose de NanoALA (415 mg.kg⁻¹ de peso corporal) induziu, após 24 horas, aumento significativo dos valores de RBC, WBC e W-MCR, e redução de MCH e MCHC; enquanto ALA induziu aumento de W-MCR e redução de MCH e MCHC;
- Elevada dose de NanoALA e ALA induziu necrose significativa no tecido tumoral 24 horas após injeção, mesmo na ausência de luz;
- Sete dias após a última sessão de tratamento com TFD-NanoALA e TFD-ALA, observou-se intenso processo cicatrização de feridas no sítio irradiado, além de alopecia no grupo TFD-ALA;
- Os grupos TFD-NanoALA e TFD-ALA não apresentaram alterações hematológicas, bioquímicas e genotóxicas sete dias após a última sessão de tratamento;
- O grupo TFD-ALA apresentou alterações hepáticas (necrose, infiltrado linfocitário e aglomerados de células primitivas não-tumorais) sete dias após a última sessão de tratamento;
- Foram detectadas metástases pulmonar no grupo TFD-ALA (n=1/4) e linfonodal nos grupos LED e TFD-NanoALA (n=1/5) sete dias após a última sessão de tratamento;
- Houve uma redução significativa do volume tumoral nos grupos tratados com TFD, sendo que NanoALA foi mais eficaz no controle do crescimento tumoral e da progressão metastática comparado ao ALA e ao grupo controle;
- A taxa de mortalidade durante as sessões de tratamento foi mais pronunciada no grupo TFD-ALA (33% no 18º dia);
- A TFD aumentou a sobrevida dos animais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDRADE L.R.; PRIMO F.L.; DA SILVA J.R.; TEDESCO A.C.; LACAVALA Z.G.M. In vitro assessment of anti-tumorigenic mechanisms and efficacy of NanoALA, a nanoformulation of aminolevulinic acid designed for photodynamic therapy of cancer. *Photodiagnosis Photodyn.* p.62–70, 2017.
- ATCC. American Type Culture Collection. 4T1 – General information. Disponível em:< <https://www.atcc.org/Products/All/CRL-2539.aspx>> [Acessado 23/01/2017].
- BABILAS, P.; SZEIMIES, R.M. The use of photodynamic therapy in dermatology. *Giornale Italiano di Dermatologia e Venereologia*, v.145, p.613-630, 2010.
- BAKHTIARY Z.; BARAR J.; AGHANEJAD A.; SAEI A.A.; NEMATI E.; DOLATABADI J.E.N.; et al. Microparticles containing erlotinib-loaded solid lipid nanoparticles for treatment of non-small cell lung cancer. *Drug Dev. Ind. Pharm.*, p.1244–53, 2017.
- BANERJEE, S.M.; MACROBERT, A.J.; MOSSE, C.A.; PERIERA, B.; BOWN, S.G.; KESHTGAR, M.R.S. Photodynamic therapy: inception to application in breast cancer. *The Breast*, v.31, p.105-113, 2017.
- BARNES, L.D.; GIULIANO, E.A.; OTA, J.; COHN, L.A.; MOORE, C.P. The effect of photodynamic therapy on squamous cell carcinoma in a murine model: evaluation of time between intralesional injection to laser irradiation. *Veterinary Journal*, v.180, p.60-65, 2009.
- BENITO, M.; MARTÍN, V.; BLANCO, M.D.; TEJÓN, J.M.; GÓMEZ, C. Cooperative Effect of 5-aminolevulinic acid and gold nanoparticles for photodynamic therapy of cancer. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.102, p.2760-2769, 2013.
- BWATANGLANG I.; MOHAMMAD F.; AZAH YUSOF N.; HUSSEIN M.; ABDULLAH J.; ALITHEEN N.; et al. Folic acid targeted Mn : ZnS quantum dots for theranostic applications of cancer cell imaging and therapy. *International Journal of Nanomedicine*, p.413–28, 2016.
- CALAVIA, P. G. *et al.* Targeted photodynamic therapy of breast cancer cells using lactose-phthalocyanine functionalized gold nanoparticles. *J. Colloid Interface Sci.*, 2017.
- CANBAY, E., TORUN, E., CANBAY TORUN, B., WAKAMA, S. & YONEMURA, Y. Photodynamic Therapy with Aminolevulinic Acid: a novel therapeutic Target in the Management of Gastrointestinal Malignancies. *J Cancer Prev Curr Res* v.8, 2017.
- CASTANO, A.P.; DEMIDOVA, T.N.; HAMBLIN, M.R. Mechanisms in photodynamic therapy: part one - photosensitizers, photochemistry and cellular localization. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, v.01, p.279-293, 2004.
- CASTANO, A.P.; DEMIDOVA, T.N.; HAMBLIN, M.R. Mechanisms in photodynamic therapy: part three - photosensitizer pharmacokinetics, biodistribution, tumor localization and modes of tumor destruction. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, v.02, p.91-106, 2005a.
- CASTANO, A.P.; DEMIDOVA, T.N.; HAMBLIN, M.R. Mechanisms in photodynamic therapy: part two - cellular signaling, cell metabolism and modes of cell death. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, v.02, p.1-23, 2005b.
- CASTANO, A.P.; MROZ, P.; HAMBLIN, M.R. Photodynamic Therapy and anti-tumour immunity. *Nature Reviews Cancer*, v.06, p.535-45, 2006.
- CECIC, I.; KORBELIK, M. Mediators of peripheral blood neutrophilia induced by photodynamic therapy of solid tumors. *Cancer Letters*, v.183, p.43-51, 2002.

- CHILAKAMARTHI, U.; GIRIBABU, L. Photodynamic therapy: past, present and future. *The Chemical Record*, v.17, p.01-29, 2017.
- CHITGUPI, U.; QIN, Y.; LOVELL, J.F. Targeted Nanomaterials for Phototherapy. *Nanotheranostics*, v.01, p.38-58, 2017.
- DE OLIVEIRA, K.T.; DE SOUZA, J.M.; GOBO, N.R.S.; ASSIS, F.F.; BROCKSOM, T.J. Conceitos fundamentais e aplicações de fotossensibilizadores do tipo porfirinas, clorinas e ftalocianinas em Terapias Fotônicas. *Revista Virtual de Química*, v.07, p.310-335, 2015.
- DE ROSA, F.S.; MARCHETTI, J.M.; THOMAZINI, A.; TEDESCO, A.C.; BENTLEY, M.V.L.B. A vehicle for photodynamic therapy of skin cancer: influence of dimethylsulphoxide on 5-aminolevulinic acid in vitro cutaneous permeation and in vivo protoporphyrin IX accumulation determined by confocal microscopy. *Journal of Controlled Release*, v.65, p.359–366, 2000.
- DE ROSA, F.S.; TEDESCO, A.C.; LOPEZ, R.F.V.; PIERRE, M.B.R.; LANGE, N.; MARCHETTI, J.M.; ROTTA, J, C.G.; BENTLEY, M.V.L.B. *In vitro* skin permeation and retention of 5-aminolevulinic acid ester derivatives for photodynamic therapy. *Journal of Controlled Release*, v.89, p. 261–269, 2003.
- DENIS, T.G.; AZIZ, K.; WAHEED, A.A.; HUANG, Y.Y.; SHARMA, S.K.; MROZ, P.; HAMBLIN, M.R. Combination approaches to potentiate immune response after photodynamic therapy for cancer. *Photochemical & Photobiological Sciences*, v.10, p. 792-801, 2011.
- DOS SANTOS CÂMARA A.L.; NAGEL G.; TSCHICHE H.R.; CARDADOR C.M.; MUEHLMANN L.A.; DE OLIVEIRA D.M. et al. Acid-sensitive lipidated doxorubicin prodrug entrapped in nanoemulsion impairs lung tumor metastasis in a breast cancer model. *Nanomedicine*. 2017;12.
- FDA. FDA MIDAC Briefing Document (24 pages). (2017).
- FENG, Y. *et al.* Forster resonance energy transfer properties of a new type of near-infrared excitation PDT photosensitizer: CuInS₂/ZnS quantum dots-5-aminolevulinic acid conjugates. *RSC Adv*. v.6, p.55568–55576, 2016.
- FERREIRA, H.S.; RANGEL, M.C. Nanotecnologia: aspectos gerais e potencial de aplicação em catálise. *Química Nova*, v.32, p.1860-1870, 2009.
- FREI, K. A, BONEL, H. M., FRICK, H., WALT, H. & STEINER, R. a. Photodynamic detection of diseased axillary sentinel lymph node after oral application of aminolevulinic acid in patients with breast cancer. *Br. J. Cancer* v.90, p.805–9, 2004.
- FUKUDA, H., PAREDES, S. & DEL C. BATTLE, A. M. Tumour-localizing properties of porphyrins in vivo studies using free and liposome encapsulated aminolevulinic acid. *Comp. Biochem. Physiol. Part B Comp. Biochem.*, v.102, p.433–436, 1992.
- GOLLNICK, S.O.; BRACKETT, C.M. Enhancement of anti-tumor immunity by photodynamic therapy. *Immunologic Research*. v.46, p.216-226, 2010.
- GÓMEZ, C.; BENITO, M.; KATIME, I.; TEIJÓN, J.M.; BLANCO, M.D. In vitro transdermal and biological evaluation of ALA-loaded poly(N-isopropylacrylamide) and poly(N-isopropylacrylamide-co-acrylic acid) microgels for photodynamic therapy. *Journal of Microencapsulation*, v.29, p.626–635, 2012.
- GONZÁLEZ-AGÜERO, G. & RAMÓN-GALLEGOS, E. Comparative study of two routes of administration of 5-aminolevulinic acid (oral and intratumoral via) and their effect on the accumulation of PpIX in tissues in murine model of breast cancer. *Medical Physics* p.158–160, 2012.
- HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, v.144, p.646-674, 2011.
- HILLEMANN, P. *et al.* Photodetection of cervical intraepithelial neoplasia using 5-

- aminolevulinic acid-induced porphyrin fluorescence. *Cancer* v.88, p.2275–2282, 2000.
- HILLEMANN, P., WIMBERGER, P., REIF, J., STEPP, H. & KLAPDOR, R. Photodynamic diagnosis with 5-aminolevulinic acid for intraoperative detection of peritoneal metastases of ovarian cancer: A feasibility and dose finding study. *Lasers Surg. Med.* v.49, p.169–176, 2017.
- HONG, E.J.; CHOI, D.G.; SHIM, M.S. Targeted and effective photodynamic therapy for cancer using functionalized nanomaterials. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, v.06, p. 297-307, 2016.
- INCA. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Tipos de câncer: mama. Disponível em:
<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/mama/cancer_mama+> [Acessado 23/01/2017].
- INOUE, K. 5-Aminolevulinic acid-mediated photodynamic therapy for bladder cancer. *Int. J. Urol.* v.24, p.97–101, 2017.
- ISSA, M. C. A. & MANELA-AZULAY, M. Terapia fotodinâmica: revisão da literatura e documentação iconográfica. *An. Bras. Dermatol.* v.85, p.501–511, 2010.
- JUNG, S.Y.; SEREIK, S.M.; LINKOV, F.; BRUFISKY, A.; WEISSFELD, J.L.; ROSENZWEIG, M. The effect of delays in treatment for breast cancer metastasis on survival. *Breast Cancer Research and Treatment*, v.130, p.953–964, 2011.
- KENNEDY, J.C.; POTTIER, R.H.; PROSS, D.C. Photodynamic therapy with endogenous protoporphyrin IX: basic principles and present clinical experience. *Journal of Photochemistry and Photobiology B.*, v.06, p.143-8, 1990.
- KHAN, S.A.; DOUGHERTY, T.J.; MANG TS. An evaluation of photodynamic therapy in the management of cutaneous metastases of breast cancer. *European Journal of Cancer*, v.29, p.1686-1690, 1993.
- KORBELIK, M.; KROSL, G.; KROSL, J.; DOUGHERTY, G.J. The role of host lymphoid populations in the response of mouse EMT6 tumor to photodynamic therapy. *Cancer Research*, v.56, p.5647-5652, 1996.
- KOZAK, R. Terapia fotodinâmica para tratamento de carcinoma basocelular do tipo nodular: estudo comparativo entre o ácido 5-aminolevulinico (ALA) em nanoemulsão e o metil-ALA. 2014. 92 f. Dissertação de mestrado do Programa de Pós-Graduação em Nanociência e Nanobiotecnologia - UnB, 2014.
- LADNER, D. P., STEINER, R. A., ALLEMANN, J., HALLER, U. & WALT, H. Photodynamic diagnosis of breast tumours after oral application of aminolevulinic acid. *Br. J. Cancer* v.84, p.33–37, 2001.
- LONGO, J. P. F. *et al.* Prevention of Distant Lung Metastasis After Photodynamic Therapy Application in a Breast Cancer Tumor Model. *J. Biomed. Nanotechnol.* v.12, p.689–699, 2016.
- LOPEZ, R.F.; BENTLEY, M.V.; DELGADO-CHARRO, M.B.; GUY, R.H. Iontophoretic delivery of 5-aminolevulinic acid (ALA): effect of pH. *Pharmaceutical Research*, v.18, p.311-315, 2001.
- LOPEZ, R.F.V.; LANGE, N.; GUY, R.; BENTLEY, M.V.L.B. Photodynamic therapy of skin cancer: controlled drug delivery of 5-ALA and its esters. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v.56, p.77–94, 2004.
- MAKADIA, H. K. & SIEGEL, S. J. Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) as Biodegradable Controlled Drug Delivery Carrier. *Polymers (Basel)*. v.3, p.1377–1397, 2011.
- MROZ, P.; YAROSLAVSKY, A.; KHARKWAL, G.B.; HAMBLIN, M.R. Cell Death Pathways in Photodynamic Therapy of Cancer. *Cancers*, v.03, p.2516-2539, 2011.
- NANOWERK. Databases: Nanotechnology products. Disponível em:
<<http://www.nanowerk.com/products/products.php>> [Acessado 18/02/2015].

- NASCIMENTO, F.C. Adjuvant hormonal therapy in premenopausal breast cancer. *Revista Brasileira de Oncologia Clínica*, v.02, p9-14, 2005.
- NEVES W.P.; ROMERO C.; SOUSA S.; MIRANDA-VILELA A.L.; LORRANNA G.; SANTOS S, et al. Cancer Science & Therapy Comparative Efficacy of a Biocompatible Citrate-Functionalized Magnetic Fluid Mediating Radiofrequency Hyperthermia and Magnetohyperthermia to Treat Ectopic Ehrlich-Solid-Tumor-Bearing Elderly Mice. *J Cancer Sci Ther*, p.393–400, 2017.
- NIH (National Cancer Institute). Breast Cancer – Treatment Option Overview. Updated: October 12, 2016. Disponível em: <https://www.cancer.gov/types/breast/patient/breast-treatment-pdq#section/_185> [Acessado 22/01.2017b].
- NIH (National Cancer Institute). General Information About Breast Cancer. Updated: October 12, 2016. Disponível em: <<https://www.cancer.gov/types/breast/patient/breast-treatment-pdq>> [Acessado 22/01.2017a]
- O'CONNOR, A. E., GALLAGHER, W. M. & BYRNE, A. T. Porphyrin and nonporphyrin photosensitizers in oncology: Preclinical and clinical advances in photodynamic therapy. *Photochem. Photobiol.* v.85, p.1053–1074, 2009.
- OH, E.K.; JIN, S.E.; KIM, J.K.; PARK, J.S.; PARK, Y.; KIM, C.K. Retained topical delivery of 5-aminolevulinic acid using cationic ultradeformable liposomes for photodynamic therapy. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.44, p.149–157, 2011.
- OLIVEIRA, L. C. de et al. Aplicações das Nanopartículas Lipídicas no Tratamento de Tumores Sólidos,: Revisão de Literatura. *Rev. Bras. Cancerol.* v.58, p.695–701, 2012.
- ONUKI, J., TEIXEIRA, P. C., MEDEIROS, M. H. G. & DI MASCIO, P. Danos ao DNA promovidos por ácido 5-aminolevulínico: possível associação com o desenvolvimento de carcinoma hepatocelular em portadores de porfiria aguda intermitente. *Quim. Nova* v. 25, p.594–608, 2002.
- ORENSTEIN, A.; KOSTENICH, G.; ROITMAN, L.; TSUR, H.; KATANICK, D.; KOPOLOVIC, J.; et al. Photodynamic therapy of malignant lesions of the skin mediated by topical application of 5- ALA in combination with DMSO and EDTA. *Lasers Life Science*, v.07, p.49-57, 1996.
- PASSOS, S.K. Terapia fotodinâmica com ácido 5-amino-levulínico em nanoemulsão no tratamento de queratoses actínicas e câncer de pele não melanoma: estudo clínico. Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Patologia Molecular, FS, UnB, 2013.
- PASSOS, S.K.; DE SOUZA, P.E.N.; SOARES, P.K.P.; EID, D.R.M.; PRIMO, F.L.; TEDESCO, A.C.; LACAVAL, Z.G.M.; MORAIS, P.C. Quantitative approach to skin field cancerization using a nanoencapsulated photodynamic therapy agent: a pilot study. *Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology*, v.06, p. 51–59, 2013.
- PASSOS, S.K; TEDESCO, A.C.; LACAVAL, Z.G.M. Bowen disease treated with PDT using ALA in in nanostructured vehicle and two light deliveries: A case report. *Journal of the American Academy of Dermatology*, v.64, p.AB141-AB141, 2011.
- PENG, Q., MOAN, J., WARLOE, T., NESLAND, J. M. & RIMINGTON, C. Distribution and photosensitizing efficiency of porphyrins induced by application of exogenous 5-aminolevulinic acid in mice bearing mammary carcinoma. *Int. J. Cancer* v.52, p.433–443, 1992.
- PENG, Q.; WARLOE, T.; BERG, K.; MOAN, J.; KONGSHAUG, M.; GIERCKSKY, K.E.; NESLAND, J.M. 5-Aminolevulinic acid-based photodynamic therapy. Clinical Research and Future Challenges. *Cancer*, v.79, p.2282-2308, 1997.
- PEREIRA, B., CURI, R., KOKUBUN, E. & BECHARA, E. J. 5-aminolevulinic acid-induced alterations of oxidative metabolism in sedentary and exercise-trained rats. *J. Appl.*

- Physiol.* v.72, p.226–30, 1992.
- RAMACHANDRAN R.; KRISHNARAJ C.; SIVAKUMAR A.S.; PRASANNAKUMAR P.; KUMAR V.K.A.; SHIM K.S.; et al. Anticancer activity of biologically synthesized silver and gold nanoparticles on mouse myoblast cancer cells and their toxicity against embryonic zebrafish. *Mater. Sci. Eng. C*, p.674–83, 2017.
- ROCHA, M.S.T.; LONGO, J. P. F.; SIMIONI, A. R.; TEDESCO A.C, et al. Aluminum-Chloride-Phthalocyanine Encapsulated in Liposomes: Activity Against Naturally Occurring Dog Breast Cancer Cells. *Journal of Biomedical Nanotechnology* p. 251-257, 2012.
- RODRIGUEZ, L.; VALLECORSIA, P.; BATTAH, S.; VENOSA, G.D.; CALVOA, G.; L. MAMONE, L.; SÁENZ, D.; GONZALEZ, M.; BATLLE, A.; MACROBERT, A.J.; CASAS, A. Aminolevulinic acid dendrimers in photodynamic treatment of cancer and atheromatous disease. *Photochemical & Photobiological Sciences*, v.14, p.1617-1627, 2015.
- RUD, E.; GEDERAAS, O.; HØGSET, A.; BERG, K. 5-Aminolevulinic acid, but not 5-aminolevulinic acid esters, is transported into adenocarcinoma cells by system BETA transporters. *Photochemistry and Photobiology*, v.75, p.640–647, 2000.
- SHARMA A.; JYOTI K.; BANSAL V.; JAIN U.K.; BHUSHAN B.; MADAN J. Soluble telmisartan bearing poly (ethylene glycol) conjugated chitosan nanoparticles augmented drug delivery, cytotoxicity, apoptosis and cellular uptake in human cervical cancer cells. *Mater. Sci. Eng. C*, p.69–76, 2017.
- SHEMESH, C. S., HARDY, C. W., YU, D. S., FERNANDEZ, B. & ZHANG, H. Indocyanine green loaded liposome nanocarriers for photodynamic therapy using human triple negative breast cancer cells. *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* v.11, p.193–203, 2014.
- SHI, L.; WANG, X.; ZHAO, F.; LUAN, H.; TU, Q.; HUANG, Z.; WANG-HAO; WANG-HONGWEI. In vitro evaluation of 5-aminolevulinic acid (ALA) loaded PLGA nanoparticles. *International Journal of Nanomedicine*, v.08, p.2669–2676, 2013.
- SIDDIQUI M.A.; WAHAB R.; AHMAD J.; FARSHORI N.N.; MUSARRAT J.; AL-KHEDHAIRY A.A. Evaluation of cytotoxic responses of raw and functionalized multi-walled carbon nanotubes in human breast cancer (MCF-7) cells. *Vacuum*, p. 146:578–85, 2017.
- SILVA, E.R.; SANTOS, E.P.; RICCI-JÚNIOR, E. Photodynamic therapy in the skin cancer treatment: concepts, utilizations and limitations. *Revista Brasileira de Farmácia*, v.90, p. 211-217, 2009.
- SMITH, P. J. *et al.* Cellular entry of nanoparticles via serum sensitive clathrin-mediated endocytosis, and plasma membrane permeabilization. *Int. J. Nanomedicine* v.7, p.2045–2055, 2012.
- SZEIMIES RM, RADNY P, SEBASTIAN M, BORROSCH F, DIRSCHKA T, KRAHN-SENFTLEBEN G, et al. Photodynamic therapy with BF- 200 ALA for the treatment of actinic keratosis: results of a prospective , randomized , double-blind , placebo-controlled phase III study, *British Journal of Dermatology*, p.386–94, 2010.
- TOREZAN, L.; NIWA, A.B.M.; NETO, C.F. Photodynamic therapy in dermatology: basic principles and clinical use. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, v. 84, p. 445-459, 2009.
- VALENTINE, R.M.; IBBOTSON, S.H.; BROWN, C.T.A.; WOOD, K.; MOSELEY, H. A quantitative comparison of 5-aminolaevulinic acid- and methyl aminolevulinate-induced fluorescence, photobleaching and pain during photodynamic therapy. *Photochemistry and Photobiology*, v.87, p.242–249, 2011.

- WHO. World Health Organization. Cancer. Disponível em: <<http://www.who.int/uv/faq/skincancer/en/index1.html>> [Acessado 27/01/2017b].
- WHO. World Health Organization. Cancer. Disponível em: <http://www.who.int/cancer/events/breast_cancer_month/en/> [Acessado 27/01/2017c].
- WHO. World Health Organization. Cancer. Disponível em: <<http://www.who.int/cancer/en/>> [Acessado 23/01/2017a].
- WU, J.; LIN, Y.; LI, H.; JIN, Q.; JI, J. Zwitterionic stealth peptide-capped 5-aminolevulinic acid prodrug nanoparticles for targeted photodynamic therapy. *Journal of Colloid and Interface Science*, v.485, p.251-259, 2016.
- YANG, J.; XIA, Y.; LIU, X.; JIANG, S.; XIONG, L. Desferrioxamine shows different potentials for enhancing 5-aminolaevulinic acid-based photodynamic therapy in several cutaneous cell lines. *Lasers in Medical Science*, v.25, p.251-257, 2010.
- YONEMURA, Y. *et al.* Photodynamic detection of peritoneal metastases using 5-aminolevulinic acid (ALA). *Cancers (Basel)*. v.9, p.1–13, 2017.
- ZHANG J.; LIU D.; ZHANG M.; SUN Y.; ZHANG X.; GUAN G, et al. The cellular uptake mechanism , intracellular transportation , and exocytosis of polyamidoamine dendrimers in multidrug-resistant breast cancer cells. *International Journal of Nanomedicine*, p.3677–90, 2016.

ANEXO 1
Declaração do Comitê de Ética no uso Animal (CEUA)



Universidade de Brasília

Instituto de Ciências Biológicas
Comissão de Ética no Uso Animal

Brasília, 27 de outubro de 2016.

DECLARAÇÃO

Declaramos que o projeto intitulado "AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DAS TERAPIAS FOTODINÂMICA E MAGNETOHIPERTEMIÁ MEDIADAS POR NANOSSISTEMAS PARA TRATAMENTO DE CARCINOMA MAMÁRIO MURINO ORTOTÓPICO.", UnBDoC n.º 66707/2016, sob responsabilidade da Professora Zulmira Guerrero Marques Lacava foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) da Universidade de Brasília. Este projeto foi aprovado para utilização de: *Mus musculus* (310 fêmeas). A presente aprovação é válida pelo período de 15/08/2016 a 15/08/2018.



Paula Diniz Galera

Profa. Dra. Paula Diniz Galera
Coordenadora da CEUA – UnB



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

ANEXO 2

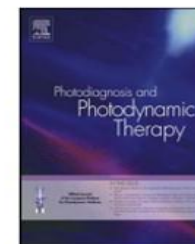
Artigo publicado



Contents lists available at [ScienceDirect](#)

Photodiagnosis and Photodynamic Therapy

journal homepage: www.elsevier.com/locate/pdpdt



In vitro assessment of anti-tumorigenic mechanisms and efficacy of NanoALA, a nanoformulation of aminolevulinic acid designed for photodynamic therapy of cancer



Laise Rodrigues de Andrade^a, Fernando Lucas Primo^b, Jaqueline Rodrigues da Silva^a, Antonio Claudio Tedesco^c, Zulmira Guerrero Marques Lacava^{a,*}

^a University of Brasília, Institute of Biological Sciences, Center of Nanoscience and Nanobiotechnology, 70910-900, Brasilia, DF, Brazil

^b São Paulo State University (UNESP), School of Pharmaceutical Sciences, 14801-903, Araraquara, SP, Brazil

^c Department of Chemistry, Center of Nanotechnology and Tissue Engineering – Photobiology and Photomedicine Research Group, Faculty of Philosophy, Sciences and Letters of Ribeirão Preto, University of São Paulo, 14010-100, Ribeirão Preto, Brazil