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

MELISSA SILVA MONTEIRO

Avaliação *in vitro* e *in vivo* de terapia antitumoral com radiofrequência e nanoestruturas de ouro e grafeno em modelo de tumor *Walker* 256

Brasília/DF, 2023

Melissa Silva Monteiro

AVALIAÇÃO IN VITRO E IN VIVO DE TERAPIA ANTITUMORAL COM RADIOFREQUÊNCIA E NANOESTRUTURAS DE OURO E GRAFENO EM MODELO DE TUMOR WALKER 256

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

Orientadora: Profª Drª Sônia Nair Báo

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

Brasília/DF, 2023

Melissa Silva Monteiro

AVALIAÇÃO *IN VITRO* E *IN VIVO* DE TERAPIA ANTITUMORAL COM RADIOFREQUÊNCIA E NANOESTRUTURAS DE OURO E GRAFENO EM MODELO DE TUMOR WALKER 256

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

Aprovada em 21/12/2023

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Sônia Nair Báo (Presidente)

Profa. Dra. Márcia Cristina Oliveira da Rocha (Membro Titular)

Prof. Dra. Bruna Cândido Guido (Membro Titular)

Profa. Dr. Cristiano Jacques Miosso Rodrigues Mendes (Membro Titular)

Dra. Marcella Lemos Brettas Carneiro (Membro Suplente)

Melissa Silva Monteiro

AVALIAÇÃO *IN VITRO* E *IN VIVO* DE TERAPIA ANTITUMORAL COM RADIOFREQUÊNCIA E NANOESTRUTURAS DE OURO E GRAFENO EM MODELO DE TUMOR WALKER 256

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

Orientadora: Profª Drª Sônia Nair Báo

Brasília/DF, 2023

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus pela oportunidade de fazer ciência novamente, abrindo portas, criando laços e parcerias, tornando esse retorno possível.

Agradeço a minha família por me apoiar em cada momento difícil durante esse percurso sem pestanejar, vocês são meu reduto e meu esteio.

Agradeço à Dra. Sônia Nair Báo por ter confiado no meu trabalho e aberto seu laboratório para construirmos essa tese juntas e estar sempre ao meu lado me apoiando e conduzindo.

Agradeço ao apoio incondicional de grandes mestres que se tornaram parceiros imprescindíveis para construir esse trabalho:

Dr. Leonardo Paterno (IQ/UnB) que foi meu norte, meu ponto de equilíbrio, durante todo esse percurso, gratidão imensa;

Dra. Suélia Fleury Rosa (FGA/UnB) que confiou os equipamentos SOFIA para executar essa tese e por todo seu apoio constante em toda minha caminhada, o meu muito obrigada;

Dra. Fabíola Iagher (UFPR) que sem seu apoio e orientações não conseguiria executar os ensaios *in vivo*, gratidão imensa pela porta aberta e carinho;

Dr. Paulo César de Morais (IF/UnB) que com seu conhecimento magistral e paciência norteou minhas aventuras pelos modelos matemáticos;

Dra. Marcella Brettas Carneiro (FUP/UnB) que foi a ponte para construir esse trabalho e apoio constante;

Dr. Bergmann Ribeiro (IB/UnB) e sua equipe maravilhosa (Raquel, Leonardo, Brenda, Bruno, Patrícia, Hillary, Andrews) que abriu seu laboratório para auxiliar em tantas etapas dessa jornada, minha gratidão.

Ao time SOFIA (Ronei, Paulo, Luciana, Diana, Marina, Guilherme, Pitti, Murilo) que me ensinou e auxiliou em tantos momentos, éramos colegas e agora somos amigos, irmãos;

Ao time LMM de antes e de agora (Bruna, Fabíola Nihi, Nabyla, Eloísio, Diogo, Bárbara Jovito, Bárbara Yasmin, Ana Luísa Gôuveia, Laís, Thamis, Karine Brenda, Ariane), vocês de várias formas me auxiliaram quando eu nada sabia sobre biologia celular, muito obrigada! E em especial, à mola-mestra desse laboratório, Ingrid Gracielle, muito obrigada pelos conhecimentos, amizade e parceria sempre pronta a nos auxiliar!

E como toda casa que precisa de uma fundação para poder ser construída, os alunos de Iniciação Científica que me acompanharam em toda a jornada e sem eles, essa “casa” desmoronaria. Hoje, são parte da minha vida como amigos e se tornaram mestres, doutores, minha gratidão mais especial: Marina Mesquita, Victor Rocha, Henry Thomas e Ana Beatriz, gratidão sem fim. E em especial, aquela que me acompanhou em tantos momentos e se tornou parte essencial da minha vida, Giovanna Lôbo.

Às agências de fomento CNPq, FAPDF, FINEP e FINATEC pelo financiamento que viabilizaram a realização deste trabalho. E especialmente à CAPES pela bolsa de estudos durante o doutorado.

Enfim, todos aqueles que colaboraram durante essa jornada, muito obrigada!

DEDICATÓRIA

A você, meu filho, Gabriel, engenheiro eletrônico que Deus enviou como parceiro para avançar as fronteiras da Ciência, você será sempre a minha melhor produção!

RESUMO

As estimativas do GLOBOCAN 2020 produzido pela International Agency for Research on Cancer (IARC) para 36 tipos de cânceres em 185 países foi de 9,9 milhões de mortes em uma proporção de 1 a cada 6 mortes tendo como causa o câncer e uma incidência prevista de 19,3 milhões de casos de câncer para o mesmo ano (exceto câncer não-melanoma de pele). Diante desse panorama, os tratamentos acessórios minimamente invasivos como a ablação por radiofrequência para tumores iniciais apresentam-se como opções elegíveis para a redução dessa estatística. A Ablação por Radiofrequência (ARF) consiste em recurso terapêutico destinado a provocar lesão tecidual programada por meio do aquecimento resistivo de forma segura e eficiente. Entretanto, apesar de ser considerada uma técnica segura e efetiva a ARF apresenta limitações como uma área de ablação restrita a 3 cm e recidiva em tumores de 3 a 5 cm. O objetivo desse estudo envolve a promoção de uma terapia combinada de RF obtida por equipamento de ablação denominado SOFIA® produzido pelo Laboratório de Engenharia Biomédica (LaB) com aplicação conjugada de nanoestrutura de ouro e grafeno na forma do compósito de óxido de grafeno com polietilenoimina e ouro, denominado GO-PEI-Au e produzidas pelo Laboratório de Pesquisa em Polímeros e Nanomateriais (LabPoln), ambos da Universidade de Brasília. Para esse estudo foram realizados ensaios *in vitro* com a linhagem de LLC WRC 256 (*Walker* 256), *ex vivo* com fígado de suínos com *post mortem* de até 2h e *in vivo* com ratos *Wistar* portando o modelo tumoral *Walker* 256. A avaliação da eficácia terapêutica ocorreu por análises *in vitro* de viabilidade celular, ultraestrutura e tumorigênese; *ex vivo* para avaliação da formação macroscópica da área de ablação, aumento de temperatura e variação de impedância e *in vivo* com análise clínica, histopatológica e imuno-histoquímica. Como resultado dos ensaios *in vitro* observou-se uma remissão promissora da linhagem *in vitro* LLC WRC 256 (*Walker* 256) com a terapia combinada do nanocompósito com a aplicação de RF, observação da presença do GO-PEI-Au em até 6h pós tratamento no núcleo celular e a terapia combinada mostrou-se eficiente em reduzir a adesão para a formação de novas colônias. Com o modelo de Hill aplicado aos ensaios de viabilidade observou-se um aumento significativo na citotoxicidade, com uma redução de cerca de 99,6% na dose necessária para fornecer o mesmo nível de toxicidade celular (BMD e DL50). No ensaio *ex vivo*, foi observada a importância da conjugação do óxido de grafeno com a polietilenoimina (PEI) para redução em 10 Ω quando comparado ao nanomaterial (AuNP-PEI) e em 7 Ω quando comparado à aplicação da RF somente. No ensaio de sobrevida *in vivo*, observou-se uma antecipação da redução tumoral em 10 dias, aumento da taxa de sobrevivência de 80% com os grupos de tratamento de RF ou GO-PEI-Au isoladamente para 100% com a terapia combinada e melhor captação do nanocompósito pelo tumor em presença de radiofrequência. No ensaio de eficácia, ficou evidente a necrose por coagulação nos grupos de tratamento com RF.

Palavras-chave: Ouro, óxido de grafeno, polietilenoimina, antitumoral, radiofrequência, Walker 256.

ABSTRACT

The estimates from GLOBOCAN 2020, produced by the International Agency for Research on Cancer (IARC), for 36 types of cancers in 185 countries, reported 9.9 million deaths, accounting for 1 in 6 deaths caused by cancer, and a predicted incidence of 19.3 million cancer cases for the same year (excluding non-melanoma skin cancer). Given this scenario, minimally invasive adjunct treatments such as radiofrequency ablation for early tumors emerge as eligible options to reduce this statistic. Radiofrequency Ablation (RFA) is a therapeutic approach designed to induce programmed tissue injury through resistive heating in a safe and efficient manner. However, despite being considered a safe and effective technique, RFA has limitations, such as a restricted ablation area of 3 cm and recurrence in tumors ranging from 3 to 5 cm. The objective of this study involves promoting a combined RF therapy obtained through an ablation device called SOFIA®, produced by the Laboratory of Biomedical Engineering (LaB), with the concomitant application of a gold and graphene nanostructure in the form of the composite graphene oxide with polyethyleneimine and gold, named GO-PEI-Au, produced by the Laboratory of Research in Polymers and Nanomaterials (LabPoln), both from the University of Brasília. For this study, in vitro assays were conducted with the LLC WRC 256 (Walker 256) cell line, ex vivo assays with pig liver post-mortem for up to 2 hours, and in vivo assays with Wistar rats carrying the Walker 256 tumor model. The assessment of therapeutic efficacy occurred through in vitro analyses of cell viability, ultrastructure, and tumorigenesis; ex vivo assessment of macroscopic ablation area formation, temperature increase, and impedance variation; and in vivo analysis with clinical, histopathological, and immunohistochemical evaluations. Results from in vitro assays showed a promising remission of the LLC WRC 256 (Walker 256) cell line with the combined therapy of the nanocomposite and RF application. The presence of GO-PEI-Au was observed up to 6 hours post-treatment in the cell nucleus, and the combined therapy proved efficient in reducing adhesion for new colony formation. The Hill model applied to viability assays revealed a significant increase in cytotoxicity, with a reduction of approximately 99.6% in the dose required to achieve the same level of cell toxicity (BMD and DL50). In the ex vivo assay, the importance of conjugating graphene oxide with polyethyleneimine (PEI) was observed, resulting in a 10 Ω reduction compared to the nanomaterial (AuNP-PEI) and a 7 Ω reduction compared to RF application alone. In the in vivo survival assay, an acceleration of tumor reduction by 10 days was observed, coupled with an increase in the survival rate from 80% in the RF or GO-PEI-Au treatment groups individually to 100% with the combined therapy, and enhanced uptake of the nanocomposite by the tumor in the presence of radiofrequency. In the efficacy assay, coagulation necrosis became evident in the RF treatment groups.

Keywords: Gold, graphene oxide, polyethyleneimine, antitumoral, radiofrequency, Walker 256.

SUMÁRIO

1 Sumário x
1 INTRODUÇÃO 18
1.1 Câncer 18
1.2 A terapêutica para o câncer e o uso da ablação por radiofrequência (ARF) 24
1.3 A Ablação por radiofrequência (ARF) e suas limitações 28
1.4 O Projeto SOFIA® 32
1.5 O conceito de bioimpedância e sua importância na Ablação por radiofrequência (ARF) 34
1.6 A relação entre os processos de morte celular e a temperatura durante a Ablação por radiofrequência (ARF) 36
1.7 Uso de nanobiotecnologia como terapia combinada com a Ablação por radiofrequência (ARF) 37
1.7.1 As nanoestruturas de ouro e óxido de grafeno (GO) utilizadas com Ablação por radiofrequência (ARF) 41
2 JUSTIFICATIVA 43
3 OBJETIVOS 44
3.1 Objetivo geral 44
3.2 Objetivos específicos 44
4 METODOLOGIA 45
4.1 Fase *in vitro* 46
4.1.1 Manutenção das células 46
4.1.2 Curvas de calibração 47
4.1.3 Ensaio de viabilidade celular 49
4.1.4 Observação da morfologia celular por microscopia de luz 50
4.1.5 Análise da morfologia celular por microscopia eletrônica de varredura 50
4.1.6 Análise da internalização celular por microscopia eletrônica de transmissão 50
4.1.7 Ensaio de formação de colônia e recuperação celular 51
4.2 Fase *ex vivo* 51
4.3 Fase *in vivo* 55
4.3.1 Análise histopatológica e imunoenzimática 59
4.3.2 Análise bioquímica e hematológica 60
4.3.3 Análise clínica 61
4.4 Análise estatística 62
5 RESULTADOS 62

5.1 Resultados com a Fase *in vitro* 62
5.2 Resultados com a Fase *ex vivo* 79
5.3 Resultados com a Fase *in vivo* 84
5.3.1 Resultados clínicos, bioquímicos e hematológicos. 86
5.3.2 Resultados histológicos. 87
5.3.3 Análise histológica dos tumores. 92
6 DISCUSSÃO 96
7 CONCLUSÃO 100
8 PERSPECTIVAS 101
9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 103
10 ANEXOS 111

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-1 Esquema indicando o processo de formação de células cancerosas a partir de tecidos normais (A); No detalhe (B), é possível verificar a complexidade do microambiente tumoral e a interferência do sistema imunológico. Em (C), observam-se alterações que podem ocorrer no tecido saudável, mas que se não tratadas podem se tornar um câncer. Adaptado de <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer>, acesso em nov/23). 19
Figura 1-2 Características fundamentais para desenvolvimento do fenótipo do câncer atualizado recentemente por Hanahan e Weinberg (HANAHAN, 2022)..... 20
Figura 1-3 Gráficos com indicadores de casos mundiais de câncer. Em (A) tem-se o número estimado de mortes dos tipos de câncer mais frequentes e em (B) a estimativa de novos casos dos tipos de câncer mais frequentes para o ano de 2020 (OMS, 2020). 22
Figura 1-4 Taxas de incidência das 10 localizações primárias mais frequentes em 2023, ajustadas por idade, pela população mundial, por 100.000 homens ou por 100.000 mulheres, no Brasil, em 2023 (INCA, 2020). 23
Figura 1-5 Taxas de incidência de casos por Unidade Federativa brasileira considerando os anos de 2020, 2021 e 2022, ajustadas por gênero pelo Observatório de Oncologia, em 2023 (Disponível em: <https://observatoriodeoncologia.com.br>, acesso em nov/23). 24
Figura 1-6 Esquema da produção do circuito fechado no procedimento de ablação no fígado com uso de equipamento gerador de radiofrequência e eletrodo expansível e a teoria da agitação dos íons no mecanismo de ablação proposta por Haemmerich (2010) conjugada ao sistema montado no paciente para a ARF (MONTEIRO, 2018). 25
Figura 1-7 Na figura, três geradores de radiofrequência de marcas diferentes já consolidadas no mercado de ARF atual. (a) 1500X da AngioDynamics, (b) RF 3000 da Boston Scientific, (c) Covidien Cool-Tip RF Ablation System. 27
Figura 1-8 Eletrodos presentes no mercado com formatos diferentes e funções adicionais. (a) Expansível de 8 hastes seco, (b) Expansível de 3 hastes seco, (c) Agulha molhado e (d) Agulha seca, internamente resfriado (MELOROSE; PERROY; CAREAS, 2015; MARQUES, 2016;)..... 28
Figura 1-9 Esquema com indicação das três áreas típicas que ocorrem na região da ablação com detalhamento dos eventos celulares em cada uma delas (adaptada de ZHANG et al, 2016)..... 30
Figura 1.10 O esquema ilustra os possíveis mecanismos de recorrência para um carcinoma hepatocelular após a ARF. (a) Semeadura direta a partir da agulha de ablação por radiofrequência. (b) Recorrência após ablação incompleta. (c) Metástase do vaso por causa da ablação incompleta através da derivação arterio-portal formada pela inserção da agulha. (d) Progressão de transporte após ablação ao redor do ramo principal do portal ou ramos secundários do portal. (e) Microrruptura do tumor durante a ablação devido ao aumento da pressão intratumoral (IKEMOTO; SHIMADA; YAMADA, 2017). 31
Figura 1-11 Etapas desde o início do procedimento de ablação por radiofrequência até o retorno do paciente ao clínico com identificação dos momentos em que uma intervenção é possível e permite reduzir a recorrência tumoral (MONTEIRO, 2018). 32
Figura 1-12 Na letra (a) observamos o caminho de baixa frequência pela linha em roxo, ou seja, a corrente percorre o ambiente extracelular e a linha em verde, mostra o caminho da alta frequência que ultrapassa a membrana celular. O circuito elétrico equivalente está representado na letra (b). LEGENDA: C_{cell}: Capacitância equivalente da membrana celular, que é responsável pela reatância capacitiva; R_{ic}: Resistência intracelular e R_{ec}: Resistência extracelular (adaptado de GROSSI, RICCÒ, 2017). 35
Figura 1-13 Esquema comparativo do processo de necrose e apoptose a partir de uma célula normal com as alterações mais representativas de cada tipo de morte celular (Adaptado de PARK *et. al*, 2023). 36
Figura 1-14 Alguns exemplos de nanoestruturas que podem ser utilizadas nas áreas biomédicas como terapêutica para vários tipos de enfermidades. NP – nanopartícula (WANI et al., 2016). 39
Figura 1-15 Principais mecanismos seguidos pelos AuNPs para exercer suas propriedades anticâncer: os AuNPs são absorvidos pela célula por endocitose, as vesículas são distribuídas no citoplasma e no

núcleo, produzindo efeitos tóxicos que levam à apoptose ou morte celular programada. ERO – espécies reativas de oxigênio, TNF - fator de necrose tumoral, VEGF - fator de crescimento endotelial vascular, VEGFR - receptor de fator de crescimento endotelial vascular e IL-6 - interleucina-6, (adaptado de CHUGH, et al, 2018). 40
Figura 1-16 Esquema ilustrativo indicando a estrutura do nanocompósito GO-PE-Au contendo a nanopartícula de ouro por método químico com fotoexcitação com UV (autoria própria). 42
Figura 1-17 Processo de síntese dos nanocompósitos de Au. Observa-se o uso de fotoexcitação à temperatura ambiente da solução aquosa de $HAuCl_4$ a diferentes frações molares. No detalhe, observa-se a estrutura molecular do PEI (Autoria própria). 43
Figura 4-1 Fluxograma do delineamento experimental geral do estudo dessa tese. 46
Figura 4-2 Sistema de ablação por RF com o equipamento SOFIA *in vitro*. Na letra (a) podem-se observar as agulhas atuando como os eletrodos ativos, na letra (b), tem-se uma imagem lateral para verificar que a agulha está mergulhada no meio de cultivo e na letra (c) tem-se o *set* experimental completo com a resistência, o valor total da impedância inicial do sistema e a câmera térmica. 49
Figura 4-3. Observa-se nas imagens (a) e (b) os itens a serem utilizados durante os experimentos *ex vivo* com fígado suíno. 54
Figura 4-4 Em (a) observa-se o equipamento projetado para controle do gotejamento das nanopartículas e em (b) observam-se as agulhas liberando água destilada e que foram inseridas na fôrma de PVC. 54
Figura 4-5 Na imagem observa-se um fragmento de fígado suíno pós-ablação, cortado ao meio para expor a região ablada de cor acastanhada mais clara que o fígado normal. Os eixos X, Y estão indicados por setas de cores preta preenchidas e Z (altura) está indicado por uma seta de cor preta pontilhada. 55
Figura 4-6 Esquema da sequência de passagens de células ascíticas entre matrizes de ratos *Wistar*. 57
Figura 4-7. Linha do tempo com as etapas do ensaio de sobrevida. 58
Figura 4-8. Linha do tempo com as etapas do ensaio de eficácia. 59
Figura 5-1 Imagem de um poço produzido pela câmera térmica. Da extremidade de cor azul até o centro de cor branca tem-se um aumento crescente de temperatura. O valor registrado com um sinal de cruz identifica o ponto mais quente em Farenheit (sempre convertido para Celsius pelo próprio equipamento). 62
Figura 5-2 Os gráficos mostram a variação da temperatura em °C do meio RPMI (A) e DMEM (B). Observa-se que o meio DMEM apresenta mais oscilação na temperatura além de alcançar mais rapidamente os 50°C necessários para garantir uma ablação indicada no tempo x temperatura para que ocorra o dano térmico. A análise foi realizada em triplicata. 64
Figura 5-3 Apresentação dos gráficos de (A) Impedância em Ohms (Ω); (B) Corrente em Ampére (A) ;(C) Tensão em Volts (V); (D) Potência em Watts (W) conforme a variação dos segundos ao longo do procedimento. Os quatro gráficos foram submetidos à regressão linear simples, reta pontilhada em vermelho. 66
Figura 5-4 Curvas de calibração do meio de cultivo RPMI conforme a variação de concentração de cada uma das nanoestruturas (Aucit; GO; GO-PEI; Au-GO-PEI). O ensaio foi realizado em triplicata e aplicada uma regressão linear simples. Os dados são expressos com média ± erro padrão da média (*p<0,01 e ns = não significativo). 67
Figura 5-5 Curvas de calibração do meio de cultivo DMEM conforme a variação de concentração de cada uma das nanoestruturas (Aucit; GO; GO-PEI; Au-GO-PEI). O ensaio foi realizado em triplicata e aplicada uma regressão linear simples. Os dados são expressos com média ± erro padrão da média (*p<0,01 e ns = não significativo). 68
Figura 5-6 Viabilidade da linhagem tumoral LLC WRC 256 (*Walker* 256) com o nanocompósito GO-PEI-Au e as nanoestruturas de referência Aucit, GO e GO-PEI nas concentrações: 1,875; 3,75; 7,5; 15; 30 e 60 $\mu g.mL^{-1}$. No caso da nanoestrutura Aucit, a concentração da solução-mãe é 30 $\mu g.mL^{-1}$ limitando sua concentração máxima a 15 $\mu g.mL^{-1}$. Os dados são expressos com média ± erro padrão da média (*p<0,01 e *** p <0,001). 69
Figura 5-7 Viabilidade da linhagem normal NIH-3T3 com o nanocompósito GO-PEI-Au e as nanoestruturas de referência Aucit, GO e GOPEI nas concentrações: 1,875; 3,75; 7,5; 15; 30 e 60 $\mu g.\ mL^{-1}$. No caso da nanoestrutura Aucit, a concentração da solução-mãe é 30 $\mu g.mL^{-1}$ limitando sua concentração

máxima a 15 µg.mL^{-1}. Os dados são expressos com média ± erro padrão da média (* p<0,01 e **** p <0,0001). 70
Figura 5-8 Curvas de temperatura com variação do tempo de aplicação da RF de 1 a 6 minutos. A curva (A) se refere ao meio de cultivo DMEM com a linhagem celular NIH-3T3 e a curva (B) se refere ao meio de cultivo RPMI com a linhagem celular LLC-WRC-256. Observa-se a característica assíntótica da curva. 71
Figura 5-9 Viabilidade da linhagem tumoral LLC WRC 256 (*Walker* 256) com o nanocompósito GO-PEI-Au e as nanoestruturas de referência Aucit, GO e GO-PEI na concentração 3,75 µg.mL^{-1} com aplicação de 1, 2 e 3 minutos de RF (1x, 2x, 3x). Os dados são expressos com média ± erro padrão da média (ns – não significativo, **** p <0,0001)..... 72
Figura 5-10. Viabilidade da linhagem normal NIH-3T3 com o nanocompósito GO-PEI-Au e as nanoestruturas de referência Aucit, GO e GO-PEI na concentração 3,75 µg.mL^{-1} com aplicação de 1, 2 e 3 minutos de RF. Os dados são expressos com média ± erro padrão da média (ns – não significativo, **** p <0,0001)..... 73
Figura 5-11 Avaliação morfológica por microscopia de luz em *timelapse* da linhagem LLC-WRC 256 (*Walker* 256) após 24h. O tempo 0h se refere ao momento imediato após a ARF e o tempo de 24h é referente a um dia após a ARF. A) Controle negativo; B) Tratamento com GO-PEI-Au; C) Tratamento com ARF; D) Terapia combinada RF + GO-PEI-Au. 75
Figura 5-12 Avaliação morfológica da linhagem tumoral LLC WRC 256 (*Walker* 256) e da linhagem normal NIH-3T3, sem tratamento (NT) e com a terapia combinada (RF + GO-PEI-Au). As setas laranjas indicam a quantidade de adesões presentes nas linhagens celulares sem tratamento. As setas brancas indicam fragmentos celulares e debris resultantes da degradação celular causada pelo dano térmico..... 76
Figura 5-13 A) Célula sem tratamento. Escala 1 µm; B) Célula após 4 horas de tratamento com presença de GO-PEI-Au em vesículas, detalhe da área com GO-PEI-Au em pontilhado. Escala 1 µm; C) Detalhe de vesícula com presença de GO-PEI-Au em célula após 4h de tratamento. Escala 500 nm; D) Célula após 6 horas de tratamento com presença de GO-PEI-Au no núcleo celular no detalhe em pontilhado. Escala de 1µm. 78
Figura 5-14 Avaliação das colônias formadas após 15 dias de replaqueamento. A) Controle; B) Tratamento com GO-PEI-Au; C) Tratamento com ARF; D) Terapia combinada de RF + GO-PEI-Au..... 79
Figura 5-15 A análise em boxplot da variação do volume de ablação permitiu comparar a interferência das nanopartículas sobre a produção da ablação. Entre as nanoestruturas, o melhor volume obtido é o da nanoestrutura GO, mas em comparação ao resultado obtido pela RF pura e a solução salina, verifica-se que a diminuição do volume obtido foi significativo. GO; AuNP-PEI – 10x; GO-PEI-Au. RF: Radiofrequência somente; ns: não significativo; ** p< 0,05; ***: p <0,005. 80
Figura 5-16 Avaliação da variação de temperaturas médias (A) e mínimas (B) para cada grupo experimental em comparação a cada grupo controle – RF e SALINA. Observa-se que a temperatura inicial da nanoestrutura GO é maior que o grupo controle RF, mas a temperatura média é reduzida. Já o comportamento da nanoestrutura AuNP- PEI – 10x é bastante prejudicado com uma baixa elevação da temperatura mínima e média. GO; AuNP-PEI – 10x; GO-PEI-Au. RF: somente RF; SALINA: RF + soro fisiológico; ns: não significativo; * p< 0,5; ** p< 0,05. 81
Figura 5-17 Na figura (A) observa-se a interferência das nanoestruturas na impedância e na figura (B), o efeito no *roll-off*. AuNP-PEI – 10x; GO-PEI-Au; GO; RF; SALINA: RF + soro fisiológico; ns: não significativo; ***: p <0,005. 83
Figura 5-18 Em (A) observa-se a variação do peso da ração dos animais. Observou-se os grupos tratados com a RF tiveram maior consumo de ração. Em (B) pode-se verificar que não houve alterações significativas entre os grupos experimentais. 85
Figura 5-19 Observação da remissão tumoral relativa com a linhagem *Walker* 256 no estudo de Sobrevida ao longo de 38 dias. Em (A) é apresentado o gráfico do volume tumoral relativo em até 38 dias de ensaio, a eutanásia dos animais ocorreu conforme a sintomatologia e crescimento tumoral. Os animais do grupo PBS foram todos eutanasiados em até 22 dias devido ao tamanho tumoral. Na letra (B) é apresentada a curva de sobrevida indicando a taxa de 100% de sobrevivência do grupo RF NANO. Na letra (C) pode-se observar a remissão tumoral do grupo RF + NANO em um dos animais representantes ao longo de 15 dias após o tratamento. Diferença significativa: **** p<0,0001. 85

Figura 5-20 Fotomicrografias de pulmão do ensaio sobrevida. (A) Animais sadios; (B) Grupo PBS; (C) Grupo RF; (D) Grupo NANO; (E) Grupo RF+NANO. As letras A em laranja indicam alguns alvéolos representativos, e em (D) estão ressaltadas as áreas com a presença do nanocompósito GO-PEI-Au circuladas com pontilhado preto circular e é apresentado um detalhe de uma das áreas com o nanocompósito em uma caixa de pontilhado preto e as duas setas pretas dentro do detalhe indicam o acúmulo de GO-PEI-Au. Escala 100 µm. Coloração H&E (40x). 89
Figura 5-21 Fotomicrografias de fígado do ensaio sobrevida. (A) Animais sadios; (B) Grupo PBS; (C) Grupo RF; (D) Grupo NANO; (E) Grupo RF+NANO. Os núcleos azulados indicam os hepatócitos organizados em cordões. Escala 100 µm. Coloração H&E (40x). 90
Figura 5-22 Fotomicrografias de rim do ensaio sobrevida. (A) Animais sadios; (B) Grupo PBS; (C) Grupo RF; (D) Grupo NANO; (E) Grupo RF+NANO. A letra G indica um glomérulo. Escala 100µm. Coloração H&E (40x). 91
Figura 5-23 Fotomicrografias de baço do ensaio sobrevida. (A) Animais sadios; (B) Grupo PBS; (C) Grupo RF; (D) Grupo NANO; (E) Grupo RF+NANO. Escala 100 µm. Coloração H&E (40x). 92
Figura 5-24 Fotomicrografias dos tumores do ensaio de eficácia com e sem tratamento. Observa-se a redução de células tumorais no grupo NANO, também se observa um padrão típico de necrose com a presença de massas amorfas eosinofílicas nos grupos RF e RF+NANO indicadas pela letra N em preto como representativa desse padrão. (A) Grupo PBS; (B) Grupo NANO; (C) Grupo RF; (D) Grupo RF+NANO. Escala 100 µm. Coloração H&E (40x). 93
Figura 5-25 Análise imuno-histoquímica do tumor do ensaio de estudo de eficácia com marcação Ki67, BCL-2 e p-53. As células marcadas de marrom indicam células positivas. (A,E,I) Grupo PBS; (B,F,J) Grupo RF; (C,G,K) Grupo NANO; (D,H,L) Grupo RF + NANO (aumento de 40x). 96

LISTA DE TABELAS

Tabela 5.1 Parâmetros hematológicos (leucograma e eritograma) e análise bioquímica das enzimas renais e hepáticas dos grupos experimentais do ensaio de sobrevida. _____ 87

LISTA DE SIGLAS

ARF – Ablação por radiofrequência

Aucit – Nanopartícula de ouro com citrato

INCA - Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva

RF – Radiofrequência

SOFIA® – Software of intense ablation

DH – Diâmetro hidrodinâmico

DMEM – Meio de cultivo - *Eagle Modificado por Dulbecco*

DMSO – Dimetilsulfóxido

GO – Óxido de grafeno

GO-PEI - Óxido de grafeno com polietilenoimina

GO-PEI-Au - Óxido de grafeno com polietilenoimina e nanopartículas de ouro

LLC-WRC-256 – Linhagem de câncer de mama de ratas Wistar prenhas

MET – Microscopia eletrônica de transmissão

MEV – Microscopia eletrônica de varredura

MTT - Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio

NIH-3T3 - Linhagem de fibroblasto murino

PBS - P*hosphate Buffered Saline* /Tampão fosfato-salino

PDI – Índice de polidispersão

PEI – Polietilenoimina

1 INTRODUÇÃO

1.1 Câncer

Conforme os dados do INCA, o câncer é a nomeação de um conjunto de mais de 100 doenças que possuem em comum o crescimento desordenado de células (INCA, 2020). Weinberg (2014), em seu livro sobre a Biologia do Câncer, discute que os tumores que formam os cânceres, originam-se de células normais do corpo do próprio indivíduo e que sua proliferação gera massas de células de perfil tecidual menos organizado e menos estruturado. Os tumores surgem a partir de vários tipos celulares especializados ao longo do corpo, quando são células epiteliais, como pele ou mucosas, serão denominados carcinomas; quando são células de tecido conjuntivo, como osso ou músculo, serão denominados sarcomas (WEINBERG, 2014).

A velocidade de propagação dessas células é alta e conforme o grau de agressividade de seu crescimento, criaram-se duas categorias de tipos de tumores: benignos e malignos. Os benignos não invadem tecidos adjacentes, quando isso ocorre e há além da invasão a tecidos adjacentes, órgãos mais distantes, criando novos assentamentos celulares denominados metástases, são tumores malignos (WEINGBERG, 2014). Na Figura 1-1, um esquema simplificado da formação do câncer, nos permite compreender esse processo. O câncer é uma doença multifatorial e por isso bastante complexa quanto às oportunidades de tratamento, portanto, novas perspectivas de terapias são cada vez mais requeridas (FIOR, 2019).

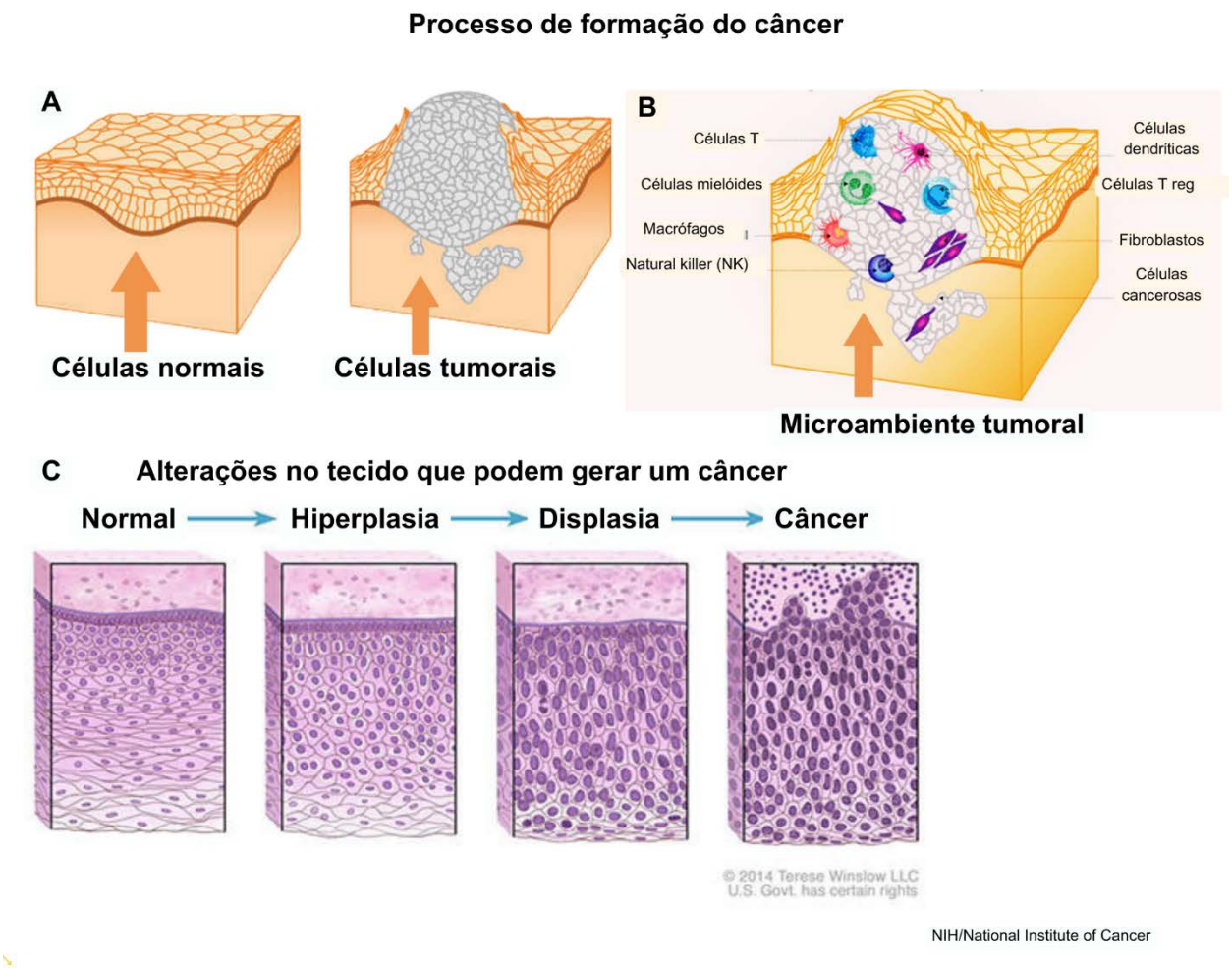


Figura 1-1 Esquema indicando o processo de formação de células cancerosas a partir de tecidos normais (A); No detalhe (B), é possível verificar a complexidade do microambiente tumoral e a interferência do sistema imunológico. Em (C), observam-se alterações que podem ocorrer no tecido saudável, mas que se não tratadas podem se tornar um câncer. Adaptado de <**https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer**>, acesso em nov/23).

Há um conjunto de capacidades funcionais adquiridas pelas células humanas que permitem que ocorra uma transição entre o caminho de crescimento normal para estágios de crescimento neoplásicos. Os "*Hallmarks of cancer*" definidos e atualizados por Hanahan (2022), permitem racionalizar os parâmetros celulares que provavelmente são compartilhados pelos fenótipos complexos de diversos tipos e variantes de tumores como indicados na figura 1-2 (HANAHAN, 2022).

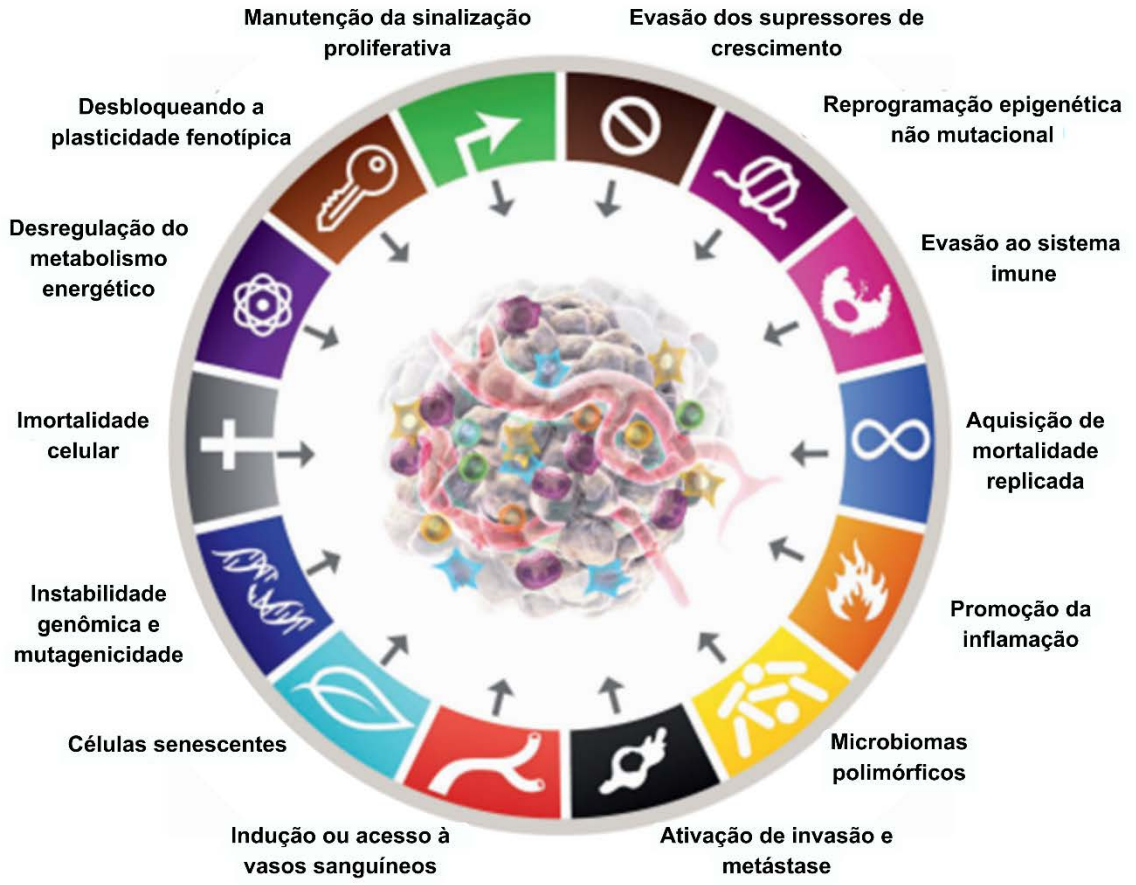


Figura 1-2 Características fundamentais para desenvolvimento do fenótipo do câncer atualizado recentemente por Hanahan e Weinberg (HANAHAN, 2022).

Uma breve análise das figuras 1-1 (B) e figura 1-2, é possível avaliar que o microambiente tumoral é dinâmico e está sujeito a inúmeras interferências. Considerando a terapia de ablação por radiofrequência, o microambiente tumoral desempenha um papel crucial no desenvolvimento e progressão do câncer, influenciando a resposta do organismo ao tumor. A ablação por radiofrequência (RF) emerge como uma estratégia promissora no tratamento de alguns tipos de câncer, notadamente aqueles localizados em regiões acessíveis a esse procedimento. Essa metodologia, interage com o microambiente circundante.

A elevação localizada da temperatura durante a ablação por RF pode modular a resposta inflamatória, afetar a vascularização e influenciar a resposta imunológica no microambiente tumoral. Compreender essas interações é essencial para otimizar os resultados terapêuticos, pois a abordagem não se limita apenas à destruição direta das células cancerosas, mas também busca modular o contexto em que o tumor se desenvolve, potencialmente melhorando a eficácia do tratamento e reduzindo as chances de recidiva, foco da terapia combinada proposta nessa

tese, especialmente nos tipos de câncer mais incidentes e com alta mortalidade como o de pulmão, fígado e mama e que são elegíveis para a ablação por radiofrequência (ARF).

De acordo com as estimativas do GLOBAL CANCER OBSERVATORY produzidas pela Agência Internacional para Pesquisa em Câncer (IARC) da Organização Mundial da Saúde (OMS), para 36 tipos de cânceres em 185 países, foi de 9,9 milhões de mortes ocorridas em 2020 e uma incidência prevista de 19,3 milhões de casos de câncer para o mesmo ano (exceto câncer não-melanoma de pele) (OMS, 2020). Observa-se que o câncer foi a primeira ou a segunda causa primária de morte antes dos 70 anos em 112 de 183 países registrados em 2019. Verifica-se também que o desenvolvimento e envelhecimento da população e mudanças na prevalência e fatores de risco para o câncer, em parte pela diversidade no desenvolvimento econômico dos países, modificou o quadro de incidência de casos da doença. Mundialmente, as maiores quedas nas mortes entre 2000 e 2019 foram relacionadas com doenças respiratórias crônicas (uma queda de 37% nas taxas padronizadas por idade para todas as idades combinadas), seguidas por doenças cardiovasculares (27%) e cancro (16%) (FIOR, 2019; SIEGEL; MILLER; JEMAL, 2019; SUNG et al., 2021)

Utilizando-se as ferramentas do site da GLOBOCAN 2020 pode-se obter diversas análises com os dados globais. Na figura 1-3, observa-se os dados relativos à mortalidade (A) e incidência (B). No gráfico (A) em relação à mortalidade, os três tipos de cânceres mais expressivos em sequência, são o de pulmão, colorretal e fígado, mostrando a relevância de reduzir o uso do cigarro nos países considerado como a epidemia do tabaco (SUNG et al., 2021). No gráfico (B), se verificam três tipos de câncer com quantidade de diagnósticos expressivos (mama, pulmão e colorretal) mostrando que o diagnóstico desses tipos de câncer que já possuem uma rotina de exames preventivos está progredindo de maneira ágil graças aos constantes avanços em nossa compreensão da doença e às melhorias tecnológicas que aprimoram a eficácia de abordagens diagnósticas confiáveis (PULUMATI et al., 2023). Considerando a estimativa global de incidência do câncer para 2040 os números alcançam 28,4 milhões em comparação a 2020, um aumento de 47% (SUNG et al., 2021).

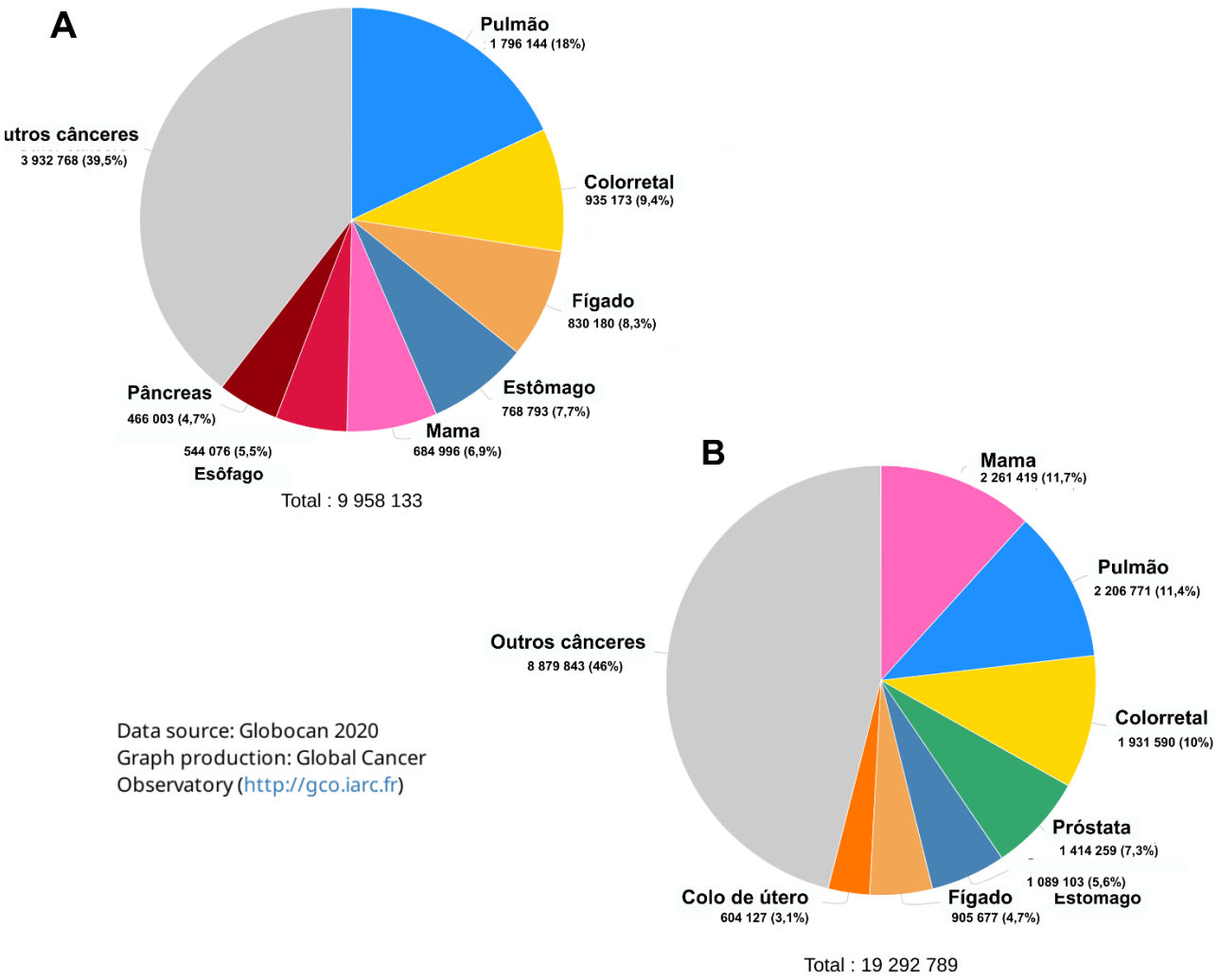


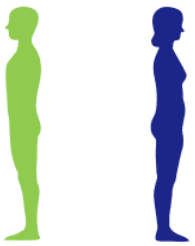
Figura 1-3 Gráficos com indicadores de casos mundiais de câncer. Em (A) tem-se o número estimado de mortes dos tipos de câncer mais frequentes e em (B) a estimativa de novos casos dos tipos de câncer mais frequentes para o ano de 2020 (OMS, 2020).

No Brasil, o Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA), órgão auxiliar do Ministério da Saúde (MS), é o responsável por desenvolver e coordenar ações que permitam a prevenção e o controle do câncer no país (INCA, 2020). Outra função de importância é informar e orientar acerca da doença, além de fornecer estimativas atualizadas da doença. Na Figura 1-4, podem-se observar os dados estatísticos das taxas de incidência atualizadas relacionadas às 10 localizações primárias mais frequentes em 2023, ajustadas por idade, pela população mundial, por 100.000 homens/mulheres no Brasil. Conforme a Estimativa 2023: Incidência de câncer no Brasil, publicada pelo INCA, observa-se uma diferença entre os dois tipos de câncer primário mais incidentes para cada gênero no país: no caso dos homens é o câncer próstata em primeiro, seguido do câncer de cólon e reto e no caso das mulheres, é bem

evidenciado o câncer de mama, seguido também do câncer de cólon e reto. Importante ressaltar que os tipos de câncer associados ao gênero que aparecem na primeira posição possuem uma incidência três vezes maior em porcentagem (INCA, 2023).

Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2023 por sexo, exceto pele não melanoma*

Localização Primária	Casos	%
Próstata	71.730	30,0%
Cólon e reto	21.970	9,2%
Traqueia, brônquio e pulmão	18.020	7,5%
Estômago	13.340	5,6%
Cavidade oral	10.900	4,6%
Esôfago	8.200	3,4%
Bexiga	7.870	3,3%
Laringe	6.570	2,7%
Linfoma não Hodgkin	6.420	2,7%
Fígado	6.390	2,7%



Localização Primária	Casos	%
Mama feminina	73.610	30,1%
Cólon e reto	23.660	9,7%
Colo do útero	17.010	7,0%
Traqueia, brônquio e pulmão	14.540	6,0%
Glândula tireoide	14.160	5,8%
Estômago	8.140	3,3%
Corpo do útero	7.840	3,2%
Ovário	7.310	3,0%
Pâncreas	5.690	2,3%
Linfoma não Hodgkin	5.620	2,3%

*Números arredondados para múltiplos de 10.

Figura 1-4 Taxas de incidência das 10 localizações primárias mais frequentes em 2023, ajustadas por idade, pela população mundial, por 100.000 homens ou por 100.000 mulheres, no Brasil, em 2023 (INCA, 2020).

Na figura 1-5, observam-se as incidências conforme os Estados brasileiros obtidos pela plataforma do Observatório de Oncologia, criado em 2015, que utiliza Big Data para monitoramento de dados abertos e compartilhamento de informações relevantes na área de oncologia no Brasil. As principais bases de dados utilizadas são o Ministério da Saúde (DataSus), o INCA e o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). Observa-se as grandes capitais, com número populacional mais expressivo no país, nos cinco primeiros lugares (SP, MG, RJ, RS, PR). O Distrito Federal ocupa a 17ª posição, apesar de possuir uma população quatro vezes menor que o estado de São Paulo. Essa diferença populacional poderia sugerir uma expectativa de um número maior de casos. Entretanto, a incidência estimada no Distrito Federal é dezoito vezes menor em comparação com São Paulo.

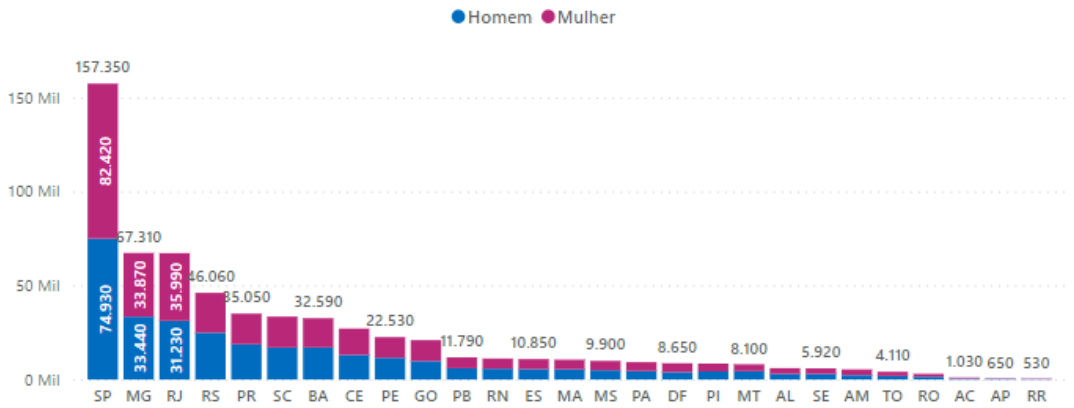


Figura 1-5 Taxas de incidência de casos por Unidade Federativa brasileira considerando os anos de 2020, 2021 e 2022, ajustadas por gênero pelo Observatório de Oncologia, em 2023 (Disponível em: <**https://observatoriodeoncologia.com.br**>, acesso em nov/23).

1.2 A terapêutica para o câncer e o uso da ablação por radiofrequência (ARF)

O panorama de possibilidades para o tratamento do câncer ainda está centrado na cirurgia ou ressecção, quimioterapia, radioterapia, hormonioterapia, imunoterapia ou transplante de medula óssea – em casos de leucemia (INCA, 2020). Diante dessa perspectiva diversos estudos com novas opções terapêuticas denominadas tratamentos acessórios, com baixa invasividade e como opção para casos clínicos em estágios iniciais com grande perspectiva de cura, surgiram ao longo desses últimos 50 anos (GIOVANNINI; MARX, 2023). Neste contexto, a ablação por radiofrequência (ARF), inclui-se como uma terapia acessória para tumores de pequenas dimensões e quadros iniciais de diagnósticos de câncer de fígado, pulmão, rim e outros (CONITEC, 2022). Essa opção surge como alternativa por consistir em um procedimento minimamente invasivo, realizado em poucos minutos, sem internação ou pós-operatório, permitindo a retirada do paciente de uma fila de transplante ou reduzindo seu estadiamento (NAULT et al., 2018; HABIBI; BERGER; CALKINS, 2021).

A aplicação de ondas elétricas de radiofrequência para aquecimento de tecidos foi inicialmente descrita em 1891 por D'Arsonval. Essa descoberta culminou, em 1928, no desenvolvimento de um bisturi eletrocautério intraoperatório conhecido como Bovie. A utilização da ablação por radiofrequência (RFA) para a remoção percutânea de tumores foi primeiramente mencionada em 1990, utilizando uma agulha isolada associada a um bisturi Bovie modificado. Em 1992, McGahan conduziu o pioneiro estudo de RFA para a ablação percutânea de tumores no fígado em humanos, seguido por Goldberg et al. em 1995, que realizaram um estudo sobre a ablação de tecido por RFA no pulmão de coelhos (GOLDBERG et al., 1995). Avanços na engenharia resultaram em geradores de radiofrequência capazes de produzir correntes elétricas com frequências de vários quilohertz (kHz) e até vários megahertz (MHz), os quais podiam ser conduzidos por meio de agulhas isoladas (REIF-ACHERMAN, 2017).

A Ablação por Radiofrequência de um tumor é um tratamento guiado por imagem, minimamente invasivo, usado para destruir as células cancerosas pelo aumento de temperatura local. O procedimento da ablação do tumor ocorre com a introdução de um eletrodo especialmente equipado (sonda), denominado eletrodo ativo, guiado por tomografia

computadorizada (TC) ou ressonância magnética (RM), dependendo do ambiente clínico e das condições pré-existentes (Figura 1.6) (GERMANI et al., 2010; PATEL et al., 2019b).

No caso da ablação por radiofrequência, uma corrente elétrica é transmitida pelo eletrodo ocasionando um aumento de temperatura para causar a morte das células tumorais. De forma mais detalhada, o funcionamento da ARF se dá pela indução de dano térmico ao tecido por meio da energia eletromagnética. Para tanto, o paciente torna-se parte de um circuito fechado que inclui o gerador de radiofrequência, a agulha presente no eletrodo e um outro grande eletrodo dispersivo (*ground pad*), resultando na geração de corrente elétrica alternada que atravessa o tecido do paciente (REIF-ACHERMAN, 2017). A ablação por radiofrequência (RFA) utiliza frequências entre 450 kHz e 500 kHz para eliminar tecidos nas imediações do eletrodo, gerando atrito que resulta em aquecimento. O controle preciso mantém a temperatura entre 50°C e 100°C, impedindo a carbonização do tecido e preservando sua condutividade elétrica (GLASSBERG et al., 2019; HABIBI; BERGER; CALKINS, 2021).

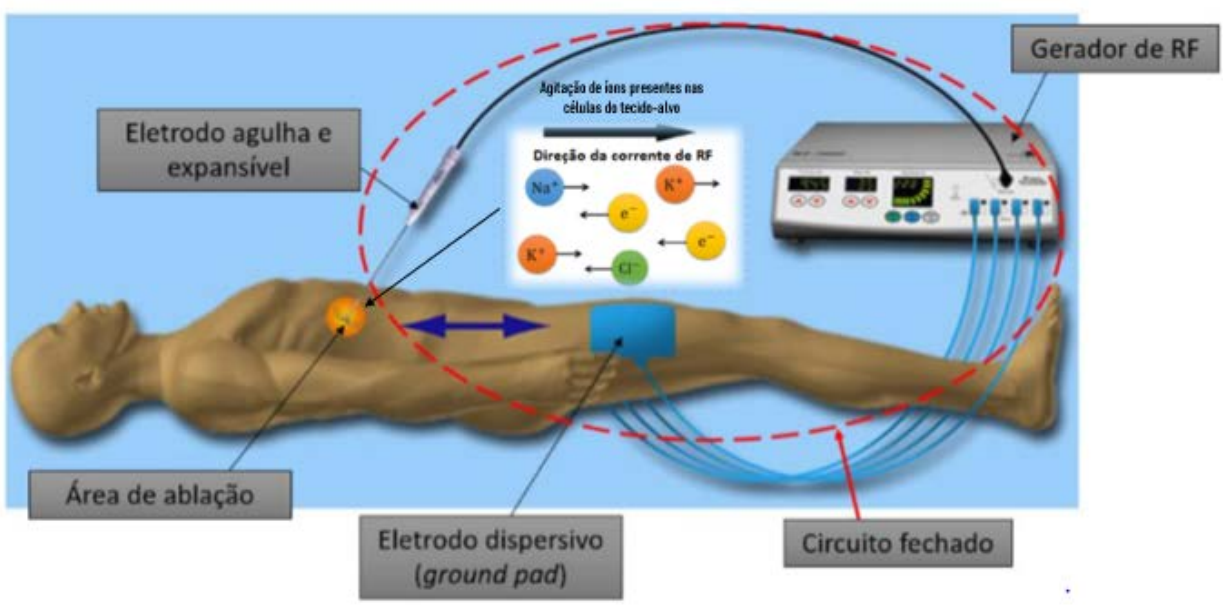


Figura 1-6 Esquema da produção do circuito fechado no procedimento de ablação no fígado com uso de equipamento gerador de radiofrequência e eletrodo expansível e a teoria da agitação dos íons no mecanismo de ablação proposta por Haemmerich (2010) conjugada ao sistema montado no paciente para a ARF (MONTEIRO, 2018)**.**

A passagem da corrente no tecido faz com que os íons presentes nas células do tecido-alvo no local da ablação se agitem gerando calor friccional ao redor do eletrodo. O gerador de radiofrequência do equipamento transfere para o eletrodo introduzido no tecido-alvo uma corrente alternada e os elétrons livres de Na^+, K^+ e Cl^- presentes nas células conduzirão essa

corrente elétrica pela sua movimentação resultando em calor devido a fricção desses íons (Figura 1-6) (HAEMMERICH, 2010; MARQUES, 2016; ZHANG et al., 2016).

Em sequência, há a propagação do calor no sentido do tecido no ponto local do eletrodo para as áreas mais distante. Tal agitação resulta em calor friccional ao redor do eletrodo, sendo que a discrepância entre a pequena área da agulha do eletrodo e a grande área do eletrodo dispersivo (*ground pad*) provoca a geração do calor a ser concentrado e focado ao redor da agulha (HAEMMERICH, 2010).

Conforme Patel (2019) e Habibi (2021), há três geradores de RFA aprovados pela Food and Drug Administration (FDA) para tumores viscerais: o dispositivo Rita (*Rita Medical Systems,* Inc., Freemont, CA), o *LeVeen* sistema de ablação por RF (*Boston Scientific*, Natick, MA) e o Eletrodo de “ponta fria” (*Covidien*, Boulder, CO) (Figura 1-7) que se diferenciam pela faixa de potência e de frequência de operação, bem como o tipo de eletrodo que possa ser utilizado. O controle de ajuste de potência dos equipamentos é realizado tendo em vista o valor da impedância do tecido, sendo o limite no aumento da impedância, a estratégia para a segurança do equipamento (HABIBI; BERGER; CALKINS, 2021).

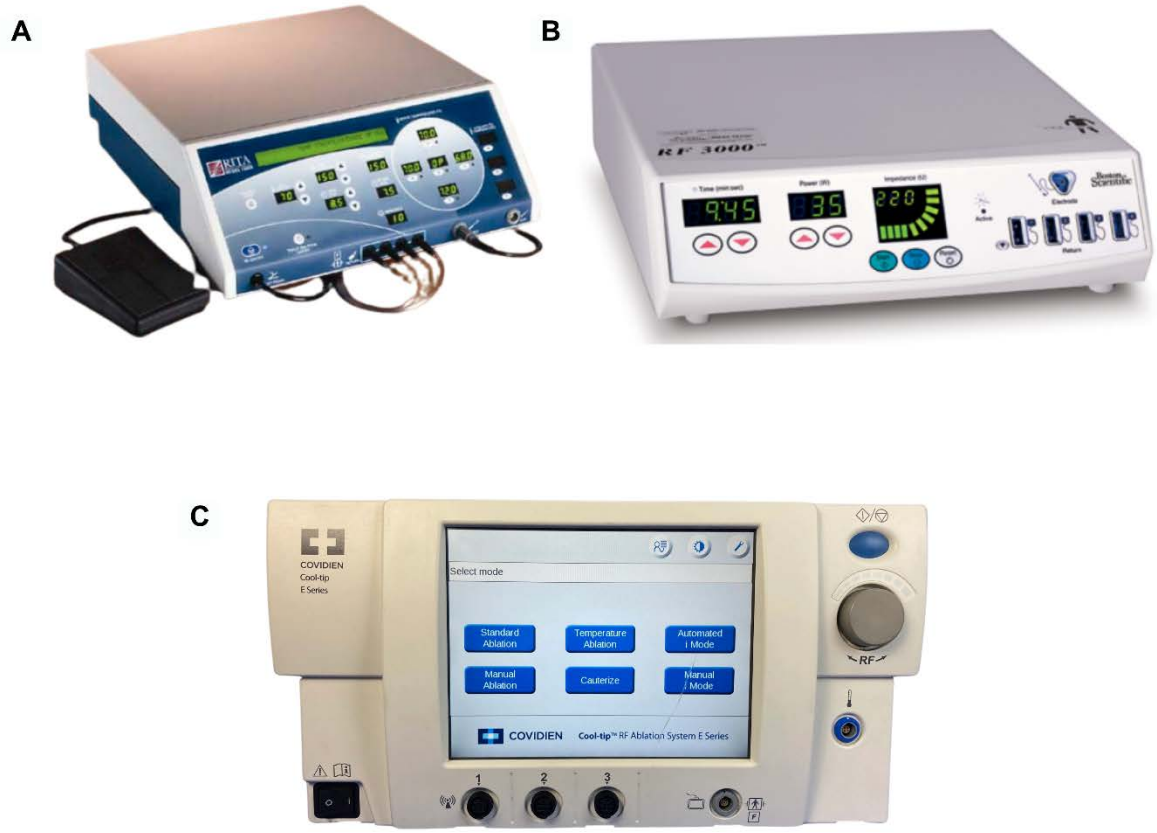


Figura 1-7 Na figura, três geradores de radiofrequência de marcas diferentes já consolidadas no mercado de ARF atual. (a) 1500X da AngioDynamics, (b) RF 3000 da Boston Scientific, (c) Covidien Cool-Tip RF Ablation System.

No caso dos eletrodos, eles são específicos para cada linha de equipamento do fabricante (Figura 1-8) e, portanto, não são reutilizáveis e podem variar o diâmetro de sua cânula e formato (expansível no formato guarda-chuva ou agulha). Alguns fabricantes fornecem funções adicionais como a liberação de substâncias químicas como o etanol ou ácido acético no processo de ablação, sendo denominados eletrodos molhados, eletrodos que não liberam substâncias líquidas são denominados eletrodos secos (KOGA et al., 2023). Ou ainda, podem possuir um sistema de resfriamento como o *Cool-tip* que permite controle do aumento de temperatura garantindo maior volume de ablação final (CHANG et al., 2017).

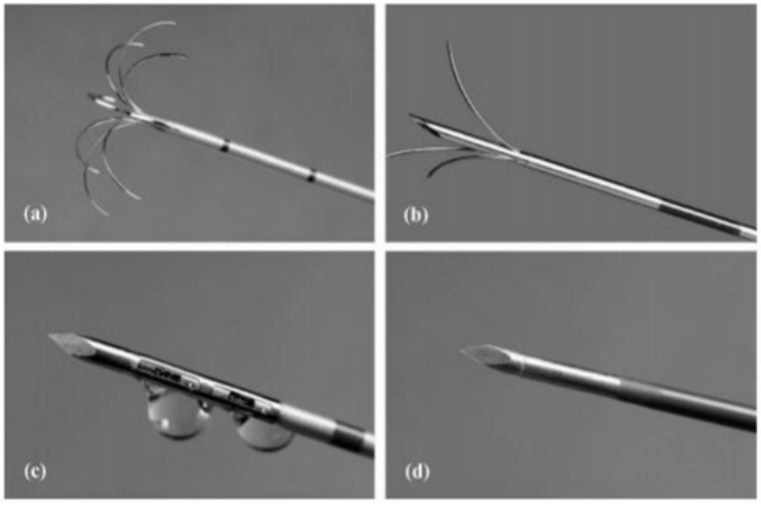


Figura 1-8 Eletrodos presentes no mercado com formatos diferentes e funções adicionais. (a) Expansível de 8 hastes seco, (b) Expansível de 3 hastes seco, (c) Agulha molhado e (d) Agulha seca, internamente resfriado (MELOROSE; PERROY; CAREAS, 2015; MARQUES, 2016;)**.**

1.3 A Ablação por radiofrequência (ARF) e suas limitações

Atualmente dentre as estratégias de tratamentos acessórios consolidadas para tratamento de vários tipos de tumores, podem-se citar além da ablação por radiofrequência (ARF), outras formas de ablação como a ablação por micro-ondas (MWA), eletroporação irreversível (IRE) e crioablação (CA) (PATEL et al., 2019). A ablação por micro-ondas e por crioablação utilizam o mesmo sistema de invasividade percutânea como a laparotomia ou laparoscopia com a inserção de uma sonda, mas no caso da primeira forma de ablação, o tumor é eliminado pela emissão das micro-ondas no local gerando um campo eletromagnético que movimenta as moléculas de água e a ablação ocorre pelo aumento de temperatura (BESLER et al., 2019).

Apesar de serem promissoras essas opções de ablação na área da Radiologia Intervencionista e os clínicos estarem aos poucos migrando para essas inovações, ainda há pouco estudo clínico randomizado sobre a segurança e efetividade dessas novas técnicas e cada vez mais, o horizonte da ablação térmica por radiofrequência tem se expandido para terapias combinadas que possam reunir as vantagens da ARF ser uma técnica já consolidada e amplamente conhecida com terapias que possam reduzir suas limitações (GIOVANNINI; MARX, 2023).

As duas principais limitações da técnica de ARF são a recidiva pós-ablação em 3 a 5 anos e o alcance limitado para volumes tumorais de até 3 cm (ZHANG et al., 2016). Patel *et al*.

(2019), observaram que a ARF quando monopolar requer os eletrodos dispersivos (*ground pads*) para aterramento e eletrodos com hastes mais longas ou em maior quantidade para alcançar um bom volume de ablação, além das limitações quanto à carbonização e dissipação do calor devido à presença de vasos sanguíneos adjacentes (IZZO et al., 2019).

Percebe-se que há mais de um tipo de recidiva e esses tipos podem estar relacionados ao procedimento terapêutico usado, no caso de ressecção cirúrgica, geralmente a recidiva ocorre em outro local diferente do tumor inicial e já na ablação, o índice maior é a recidiva que ocorre na mesma região ablada e é conhecida como Local Tumor Progression (LTP) (LIAO et al., 2017). Os riscos geralmente associados ao LTP são o tamanho do tumor, a presença de vasos adjacentes ao tumor devido ao efeito de perda de calor denominado *heat sink* (LIN et al., 2018), ausência de margem ablativa (margem de segurança), nível elevado de marcadores tumorais e um alto grau de realce arterial (HAO et al., 2017).

O ponto chave para uma análise da eficiência da ablação em seu processo de execução e momento pós-procedimento é a não recorrência do tumor permitindo uma sobrevida maior àquele paciente. Para que isso ocorra, a necrose deve alcançar toda a região tumoral e avançar para uma margem de segurança garantindo o mínimo de dano e eliminação do tumor. O processo de necrose na área ablada não é homogêneo e Zhang *et al*. (2016) identificaram as áreas e alterações celulares conforme a variação de temperatura que influenciarão a possibilidade de recorrência (IZZO et al., 2019).

As áreas são descritas a seguir a partir do local do eletrodo em direção à região não afetada ou saudável (Figura 1-9): (1) área com dano letal com temperatura maior ou igual a 50ºC gerando necrose identificada por colapso da membrana celular, desnaturação proteica e inutilização de enzimas e um dos fatores usados como referência de necrose completa, a disfunção mitocondrial, (2) área com dano subletal com temperatura entre 41 a 45ºC indicado pelo metabolismo prejudicado incluindo danos ao reparo de DNA, assim como danos teciduais indicados pelo ácido hialurônico e citocinas, além de hiperemia dos vasos sanguíneos e (3) área normal abaixo de 40ºC, com células intactas e presença de antígenos tumorais (ZHANG *et al*., 2016).

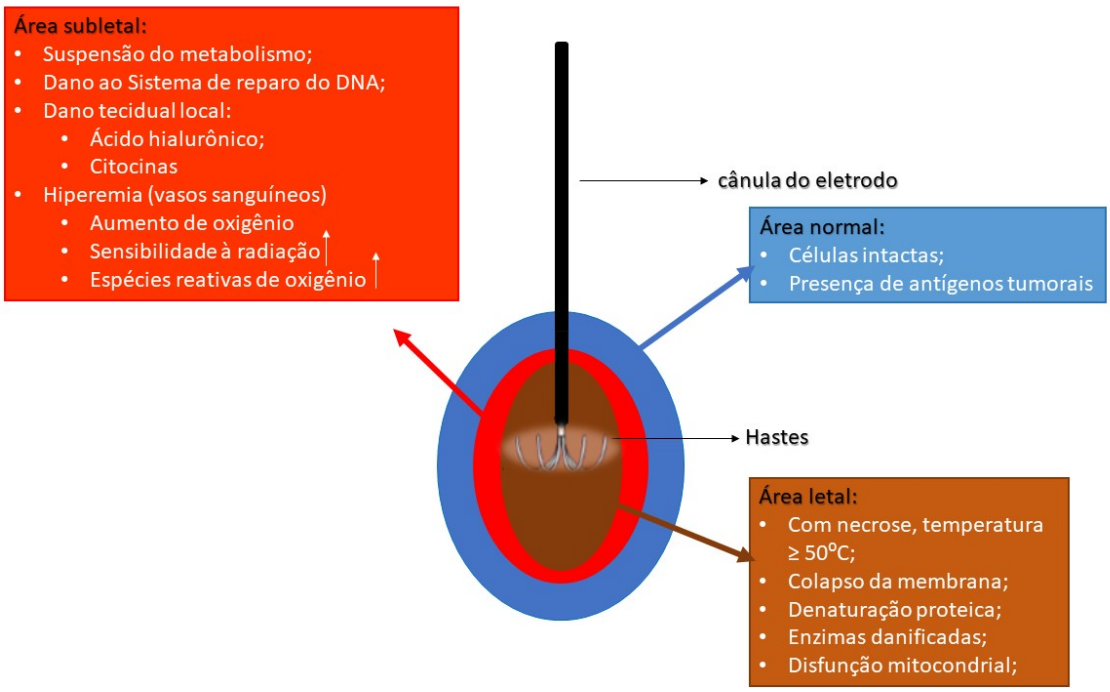


Figura 1-9 Esquema com indicação das três áreas típicas que ocorrem na região da ablação com detalhamento dos eventos celulares em cada uma delas (adaptada de ZHANG et al, 2016).

Portanto, na zona de necrose, é esperado que aconteça a morte celular definitiva. A recorrência está geralmente relacionada à área subletal onde ocorre tipicamente a coagulação celular, mas que após a intervenção por ablação, pode haver a recuperação dessas células danificadas e sua proliferação. Além do risco de retorno do tumor pela área subletal, Ikemoto e colaboradores (2017) observaram a patofisiologia da recorrência em tecido hepático e verificaram que alterações em vias moleculares envolvidas com proliferação e adesão celular são ativadas podendo tornar esse tumor mais agressivo e metastático (IKEMOTO; SHIMADA; YAMADA, 2017).

A análise elencou cinco mecanismos padrões de recorrência pós-ablação: (a) semeadura de células tumorais por ação direta da inserção do eletrodo; (b) recorrência após ablação incompleta; (c) metástase transversa devido ablação incompleta em decorrência da inserção do eletrodo na artéria-porta hepática; (d) progressão transportal após ablação em torno do ramo secundários e principal de irrigação sanguínea local; (e) microrruptura do tumor durante ablação ocasionado por um aumento da pressão intratumoral (Figura 1-10). Pode-se inserir esses mecanismos em dois grandes padrões de recorrência: (I) recorrência por ablação incompleta e, (II) recorrência sistêmica por existência de microtumores não-detectáveis pós-ablação.

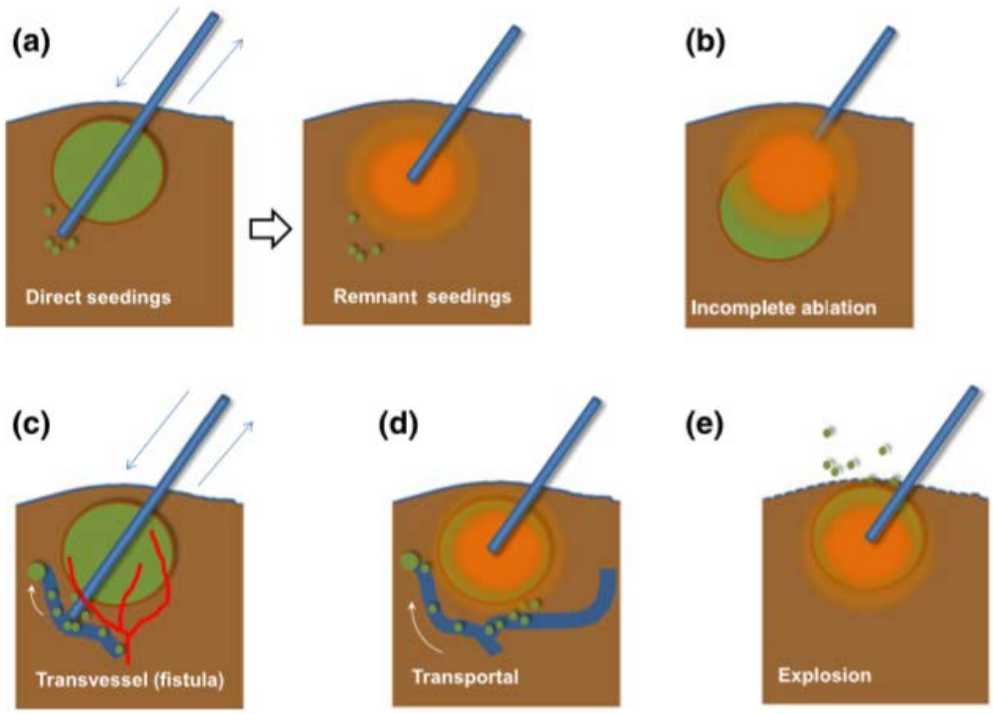


Figura 1.10 O esquema ilustra os possíveis mecanismos de recorrência para um carcinoma hepatocelular após a ARF. (a) Semeadura direta a partir da agulha de ablação por radiofrequência. (b) Recorrência após ablação incompleta. (c) Metástase do vaso por causa da ablação incompleta através da derivação arterio-portal formada pela inserção da agulha. (d) Progressão de transporte após ablação ao redor do ramo principal do portal ou ramos secundários do portal. (e) Microrruptura do tumor durante a ablação devido ao aumento da pressão intratumoral (IKEMOTO; SHIMADA; YAMADA, 2017).

Verifica-se que algumas variáveis se interpõem na recorrência do tumor e que podem ser identificadas em uma linha temporal desde o início do procedimento até o seguimento (*follow up*) pelo clínico que acompanha o paciente. Essas variáveis já estão definidas na literatura e é possível identificar alguns momentos de intervenção específicos (que são descritos a seguir) para evitar a recorrência além do sucesso terapêutico da ablação do tumor (KOGA et al., 2023).

Os momentos ideais de intervenções são: (1) inserção do eletrodo no paciente; (2) procedimento de ablação em si; (3) momento da finalização do procedimento, ainda com o eletrodo posicionado e imageamento disponível com identificação de áreas não totalmente abladas; (4) identificação de regiões residuais do tumor durante o acompanhamento ou *follow up* do paciente, ou seja, o acompanhamento do paciente pelo clínico pós-ablação com o uso de imagens e novo procedimento ablativo para sua imediata eliminação. Essas etapas estão ilustradas na Figura 1-11 em uma sequência temporal (etapas de 1 a 4) com a descrição da forma de atuação pelo clínico.

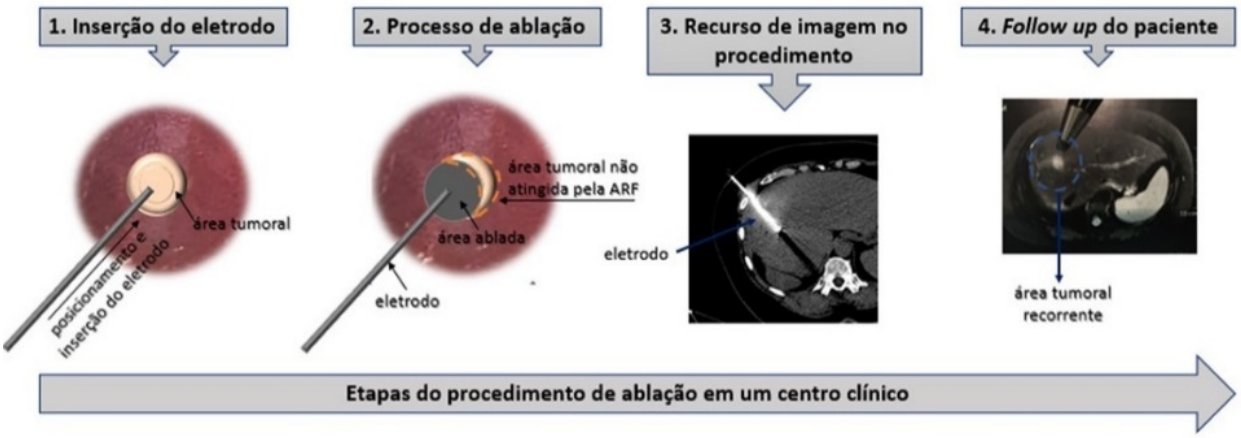


Figura 1-11 Etapas desde o início do procedimento de ablação por radiofrequência até o retorno do paciente ao clínico com identificação dos momentos em que uma intervenção é possível e permite reduzir a recorrência tumoral (MONTEIRO, 2018).

A ablação por radiofrequência incompleta (iARF) em tumores pode resultar em efeitos variados e desafiadores no tratamento. Quando a ablação não garante o aumento de temperatura ideal em toda a região ablada pode permitir a sobrevivência de células cancerígenas remanescentes, potencialmente levando à recorrência do tumor. A literatura já tem indicado maior agressividade na tumorigênese e fatores relacionados à atividade imunológica local como a proteína de morte celular programada 1 (PD-1) (SHI et al., 2019), HSP70/HIF-1α (WAN *et al.*, 2016; WANG *et al.*, 2021), a interleucina-6 (IL-6) e o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) (MARKEZANA et al., 2021) . Portanto, a obtenção de ablação completa e efetiva é essencial para otimizar os resultados terapêuticos na abordagem de tumores por meio da RFA.

Outra limitação que se mostra como desafio na ARF, é o aumento do volume de ablação para além dos 3 cm. Essa limitação está relacionada ao processo de transferência de energia pelas células do tecido que após um período de tempo alcança a temperatura de carbonização finalizando o processo de ablação (ZHANG *et al*., 2016).

1.4 O Projeto SOFIA®

O SOFIA (Software of Intensive Ablation) foi um projeto financiado pelo Ministério da Saúde em parceria com a Universidade de Brasília pelo laboratório LaB - Laboratório de Engenharia Biomédica, vinculado ao LEI (Laboratório de Engenharia e Inovação) da FGA

(Faculdade do Gama). Sua proposta foi desenvolver um equipamento de ablação por radiofrequência constituindo-se de um gerador de RF (Radiofrequência), eletrodo monopolar ativo e software de controle para o Sistema Único de Saúde (SUS). O projeto se iniciou em janeiro de 2015 em diversas frentes para o desenvolvimento de tecnologias para ablação. Dentre as aplicações mais comuns de Ablação por Radiofrequência (ARF) na área médica, temos: o hepatocarcinoma, o câncer de pulmão de células maiores, tumores ósseos, fibrilação atrial, varizes, neoplasias renais e tratamento para dores crônicas da face e cabeça. A neoplasia mais estudada para o uso da ARF é o carcinoma hepatocelular para o qual o Projeto SOFIA manteve seu foco durante sua execução (DA FONSECA et al., 2019). O projeto foi finalizado em 2017 com quatro protótipos finalizados e uma patente vinculada à Universidade de Brasília e aprovação dos ensaios pré-clínicos pela Anvisa, mas sem transferência tecnológica até o presente momento.

O aparelho é composto basicamente por quatro módulos operacionais: gerador de radiofrequência de 500kHz podendo atingir potência de até 50W, placa de controle de potência para atender o gerador, placa de aquisição de medidas e controle digital. O SOFIA é um equipamento utilizado no tratamento de pequenos nódulos tumorais no fígado de até 3 cm. Primeiramente, os nódulos são localizados através de exames de tomografia computadorizada, ressonância magnética ou ultrassom. A partir da localização, o médico anestesia o paciente e realiza a incisão do eletrodo do equipamento SOFIA de forma minimamente invasiva até o local alvo. O procedimento é então iniciado, o eletrodo fornece uma corrente em alta frequência, da ordem de 40-50W e 500kHz, até atingir o nível de necrose das células tumorais. Quando finalizado o procedimento, o equipamento permite que a interrupção seja feita manualmente pelo médico ou automaticamente pelo próprio software do SOFIA. O resultado deste tratamento é a eliminação da região tumoral localizada (CAVALCANTE et al., 2018).

Equipamentos de Ablação por Radiofrequência (ARF) já são comercializados, entretanto, com custos elevados por ser uma tecnologia importada. A proposta do SOFIA é produzir tecnologia nacional para um equipamento de ARF reduzindo exponencialmente o custo final dos equipamentos. Com o desenvolvimento de tecnologia nacional para o ARF e realizada a transferência e licenciamento tecnológico desse produto biomédico, todo o processo de aquisição e manutenção desse equipamento se tornará acessível (CAVALCANTE et al., 2018).

Os equipamentos atualmente comercializados apresentam significativas limitações, os quais o Projeto SOFIA teve como meta sanar: (a) ao final do procedimento, não há indicação se o tumor foi destruído com sucesso; (b) a operação do equipamento é predominantemente

manual; (c) não acompanham software de planejamento do procedimento; e (d) não há maneiras de impedir a reutilização do eletrodo. O SOFIA pretendeu suprimir todas as lacunas supracitadas através da junção de seu software e hardware inovadores.

1.5 O conceito de bioimpedância e sua importância na Ablação por radiofrequência (ARF)

A bioimpedância ou impedância biológica é definida como a capacidade que um tecido biológico tem de se opor a uma corrente elétrica (MARTINSEN; GRIMNES; SCHWAN, 2002). As propriedades dos tecidos biológicos são classificadas conforme a resposta seja passiva ou ativa mediante a fonte geradora de eletricidade. Quando o próprio tecido biológico é a fonte geradora define-se como resposta ativa, como exemplo tem-se o caso da autonomia elétrica do tecido cardíaco em que seus sinais podem ser aferidos por um equipamento de eletrocardiograma (MIKLAVČIČ; PAVŠELJ; HART, 2006) .

Por sua vez, a resposta passiva ocorre quando os tecidos biológicos respondem ao estímulo de uma fonte de corrente externa. Para a engenharia biomédica, a bioimpedância é interpretada como um tecido que possui uma impedância elétrica (Z) que é responsável pela oposição a um fluxo de corrente alternada. O corpo humano possui uma resistência elétrica e de uma capacitância conectada em série ou paralela, o circuito elétrico equivalente utilizado para interpretar os dados de medida da bioimpedância é mostrado no esquema da Figura 1-12 (GROSSI; RICCÒ, 2017).Essa bioimpedância será específica para cada tecido do corpo.

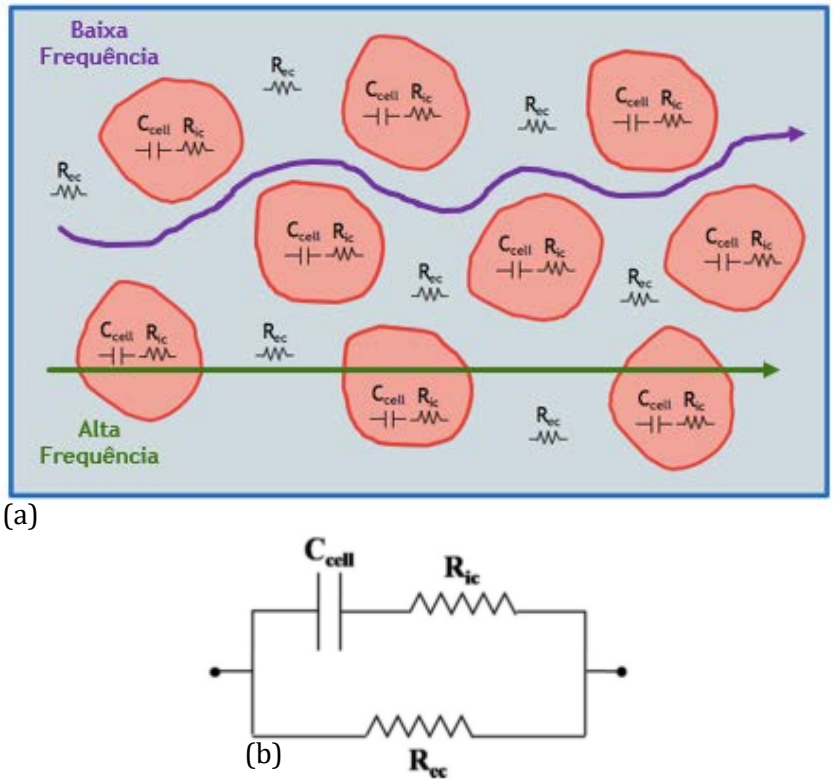


Figura 1-12 Na letra (a) observamos o caminho de baixa frequência pela linha em roxo, ou seja, a corrente percorre o ambiente extracelular e a linha em verde, mostra o caminho da alta frequência que ultrapassa a membrana celular. O circuito elétrico equivalente está representado na letra (b). LEGENDA: C_{cell}: Capacitância equivalente da membrana celular, que é responsável pela reatância capacitiva; R_{ic}: Resistência intracelular e R_{ec}: Resistência extracelular (adaptado de GROSSI, RICCÒ, 2017).

No caso do procedimento de ARF, devido ao movimento dos íons presentes nas células, haverá uma deposição de energia no tecido e geração de calor, além do efeito Joule produzido pela passagem da corrente elétrica. À medida que se eleva a temperatura do tecido, eleva-se também a condutividade elétrica do tecido, como efeito final haverá uma redução da resistividade (e consequentemente da impedância) do tecido, o que facilitará a passagem de corrente. Quando a impedância alcançar um valor crítico devido a temperatura ter atingido valores já próximos a 100°C, o processo de carbonização já terá se iniciado, isolando eletricamente o eletrodo. O aumento súbito na impedância é relatado na literatura como uma forma de resistência ou *roll off* (DA FONSECA et al., 2019, 2021).

No caso do procedimento de ARF, observa-se que esse fenômeno tem sido utilizado como opção de controle durante a ablação e a observação da condutividade elétrica de cada tecido ou meio em que a RF é aplicada, torna-se fundamental para avaliação da terapia por ARF combinada proposta nesse estudo.

1.6 A relação entre os processos de morte celular e a temperatura durante a Ablação por radiofrequência (ARF)

O processo celular principal que envolve o sucesso da terapêutica com RF é a total necrose do tecido tumoral identificado no imageamento durante o procedimento de ARF. A ARF utiliza energia térmica para induzir a morte celular por necrose coagulativa e desnaturação de proteínas (ZHANG et al., 2016). A morte celular pode seguir a via da necrose ou da apoptose (Figura 1-13). No caso do aumento da temperatura causada pela ARF, espera-se que ocorra o processo de necrose pela alta temperatura, mas os dois tipos de danos podem ocorrer, sendo o processo apoptótico mais comum no processo de coagulação celular e pode ser revertida pelo organismo (CHOWDHURRY; THARAKAN; BHAT, 2006).

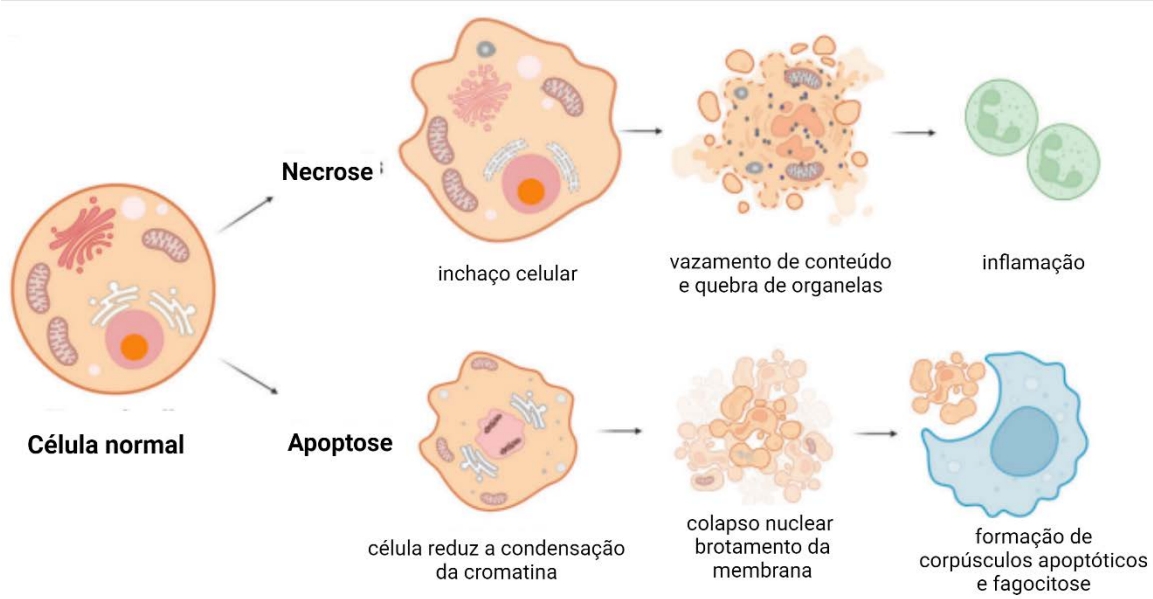


Figura 1-13 Esquema comparativo do processo de necrose e apoptose a partir de uma célula normal com as alterações mais representativas de cada tipo de morte celular (Adaptado de PARK *et. al*, 2023).

Quando as células são expostas a elevações térmicas, ocorre uma série de eventos intracelulares que culminam na ruptura da membrana plasmática e subsequente liberação de seu conteúdo intracelular. Este processo, conhecido como necrose, é caracterizado por danos irreversíveis às células, resultando em inflamação localizada. No contexto da ablação por radiofrequência, a aplicação controlada de calor direcionado a regiões específicas do tecido tumoral visa induzir necrose nas células cancerígenas, proporcionando uma estratégia terapêutica eficaz. Compreender os mecanismos moleculares subjacentes à morte celular por necrose induzida pelo aumento de temperatura é crucial para otimizar protocolos de tratamento e melhorar a eficácia clínica dessas intervenções (GALLUZZI et al., 2018).

Durante a ablação, a geração de calor eleva a temperatura local do tecido, buscando atingir uma temperatura suficientemente alta para provocar a coagulação das proteínas celulares. Esse processo resulta na desnaturação e coagulação das proteínas, causando danos nas membranas celulares e formando uma lesão de coagulação com alterações irreversíveis devido ao calor (LI et al., 2016; LIAO et al., 2017). Após o procedimento, o sistema imunológico é ativado, induzindo inflamação na área tratada e remoção gradual das células mortas. Com o tempo, a região lesionada passa por cicatrização, podendo ser substituída por tecido cicatricial, e em alguns casos, ocorre regeneração parcial. A necrose de coagulação é caracterizada pela coagulação das proteínas celulares, preservando a arquitetura tissular básica (SHIMADA; YAMADA, 2017; DENG et al., 2022; IKEMOTO).

Um estudo das vias de sinalização apoptótica no processo de ablação permite compreender as nuances da dinâmica da morte celular no tecido ablado e tem sido utilizado como referência para alguns estudos de terapias combinadas (BEYK; TAVAKOLI, 2019; FANG et al., 2019). Há uma proposta de que uma ablação por RF poderia também seguir as vias de regulação positiva de proteínas pro-apoptóticas - Bax, caspase 3, HSP70 e P53 e a via de regulação negativa da proteína anti-apoptótica – Bcl-2 (FANG *et al*., 2019). Também as interferências na atuação do sistema imunológico, considerando-se a atividade de citocinas inflamatórias – IL-6, IL-10, IL-2 avaliando-se a polarização de macrófagos M1 em M2 possibilitam traçar um panorama do comportamento do microambiente tumoral. Mas, considerando-se a temperatura mínima de 50ºC, alcançando até 70ºC, não há mais possibilidade de apoptose, apesar desse contexto, essa avaliação foi realizada nessa tese, mostrando que se há ablação por radiofrequência utilizando eletrodos, a expectativa é que haja necrose por coagulação (GEOGHEGAN et al., 2022; KOGA et al., 2023).

1.7 Uso de nanobiotecnologia como terapia combinada com a Ablação por radiofrequência (ARF)

Devido ao perfil de lesão não homogênea, as terapias combinadas surgem como uma perspectiva para solucionar as limitações típicas da ARF e buscam aumentar o volume de ablação, reduzir a recorrência e aumentar a sobrevida pós-ablação. Já há publicações de diversas inovações surgidas para superação das limitações da técnica e dentre elas encontra-se a nanotecnologia como uma das alternativas mais promissoras, como opção terapêutica

conjugada à radiofrequência, tornando-a potencialmente mais eficiente ao melhorar a transferência da temperatura na área da ablação de uma forma controlada (JUN et al., 2015; FANG et al., 2019; YANG et al., 2021;ASHIKBAYEVA et al., 2022).

A nanotecnologia é a ciência de escala nanométrica de 100 nm (10^{-9}) e conforme a Recomendação 2011/696/UE da Comissão Européia (CE) uma substância para ser considerada nanoestrutura deve estar em um estado não-ligado ou como agregado ou como um aglomerado, em que 50% ou mais das partículas em número de distribuição de tamanho, em uma ou mais dimensões externas, estão no intervalo de tamanho entre 1-100 nm (10^{-9}), ter sido produzido intencionalmente e possuir propriedades e fenômenos químicos e/ou biológicos que ocorrem devido sua escala nanométrica . A Food and Drug Administration (FDA) dos EUA não possui uma definição formal de nanomateriais, mas avalia produtos caso a caso. O órgão sugere que os fabricantes consultem a FDA sobre qualquer produto que contenha nanomateriais, especialmente em produtos regulamentados pela FDA, como alimentos, cosméticos e produtos farmacêuticos (APOLINÁRIO et al., 2020; BARATA-SILVA et al., 2021).

O Japão adota uma definição semelhante à da CE, a Lei de Nanotecnologia do Japão define nanomateriais como aqueles com pelo menos uma dimensão entre 1 e 100 nanômetros. Já a Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OCDE) desenvolveu uma definição ampla para nanomateriais, que inclui materiais com propriedades específicas devido ao tamanho ou características da superfície. A OCDE enfatiza a importância de considerar propriedades específicas em vez de se ater apenas às dimensões. Os nanomedicamentos, produtos farmacêuticos desenvolvidos com nanotecnologia, exibem propriedades físicas, químicas e biológicas distintas daquelas do mesmo material em uma escala convencional. Na figura 1-14, é possível observar as variações de nanoestruturas produzidas pelo homem com aplicações em áreas biomédicas (APOLINÁRIO et al., 2020; BARATA-SILVA et al., 2021).

Diversas instituições, como a European Chemical Agency (ECHA), OECD, o International Conference on Harmonization (ICH), a European Medicines Agency (EMA), o Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Risks (SCENIHR) e a FDA, têm desenvolvido manuais e guias para orientar a indústria farmacêutica na produção de nanomedicamentos, buscando normatizar os processos de produção. Apesar dos avanços, a regulação atual dos nanomedicamentos ainda requer melhorias contínuas, especialmente na área ambiental. Alguns produtos já foram desenvolvidos e comercializados, e recentemente, a International Standard Organization (ISO) publicou o ISO/TR 22019:2019, intitulado "Nanotechnologies- Considerations for performing toxicokinetic studies with nanomaterials", que descreve os princípios básicos para

estudos relevantes em toxicocinética de nanomateriais (APOLINÁRIO et al., 2020). E no Brasil, recentemente em 2023, está disponível para consulta pública o Guia de Avaliação de Segurança Biológica de Materiais de Uso em Saúde de Base Nanotecnológica Guia nº 63/2023 – versão 1, de 25/07/2023 produzido pela ANVISA (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA - ANVISA, 2023).

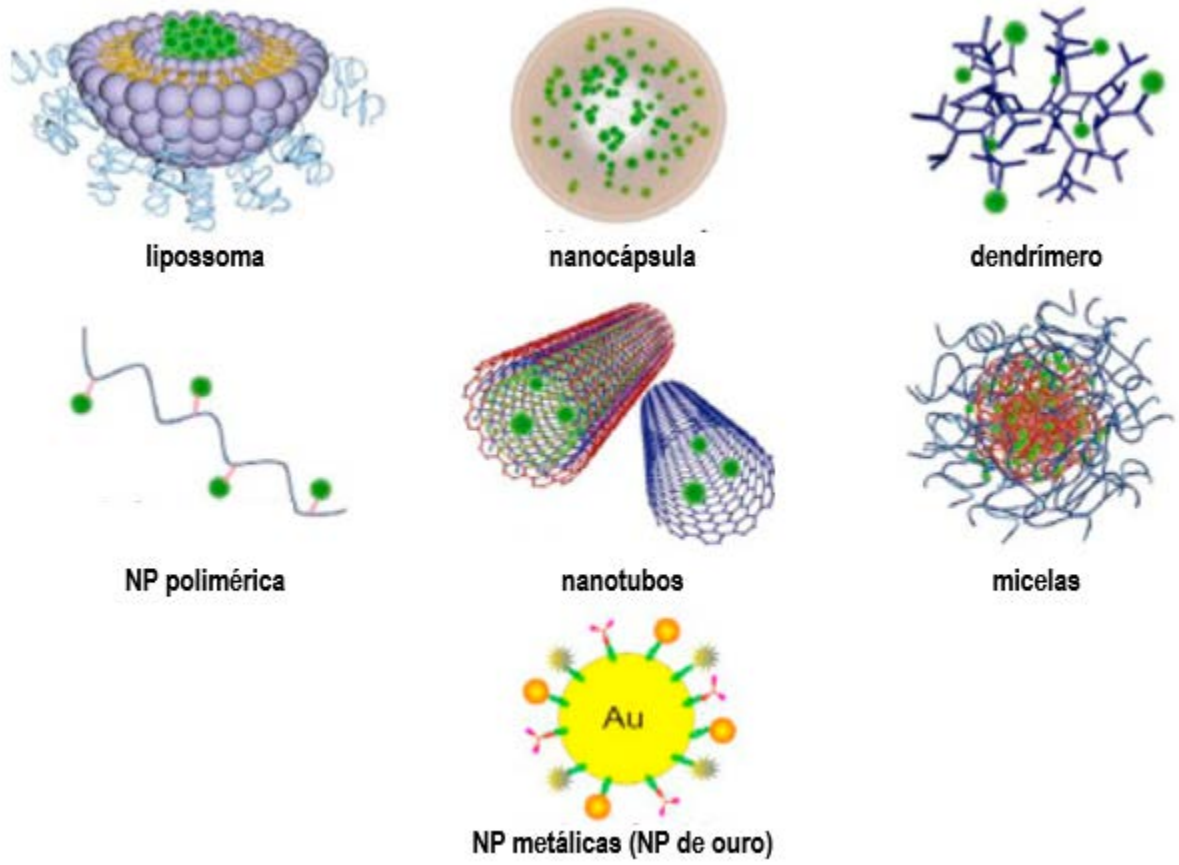


Figura 1-14 Alguns exemplos de nanoestruturas que podem ser utilizadas nas áreas biomédicas como terapêutica para vários tipos de enfermidades. NP – nanopartícula (WANI et al., 2016).

O alcance da nanotecnologia perpassa diversas áreas e permite desenvolver soluções para produção de novos materiais semicondutores, condutores, armazenamento de dados, produção de medicamentos mais eficientes, com menos efeitos colaterais, melhora da resolução de imagens de ressonância magnética e tomografia, portanto auxiliando o diagnóstico preciso e precoce de diversas doenças e outras possibilidades ainda não dimensionadas por ser uma tecnologia da quinta revolução industrial, portanto, recente (DARABDHARA et al., 2019).

A nanotecnologia aplicada à medicina, hoje denominada nanomedicina tem sido amplamente estudada e a responsividade de nanoestruturas com a RF já é conhecida na

literatura (COLLINS et al., 2015). O uso de nanoestruturas metálicas fornece novas perspectivas para uma opção mais simples de síntese e possibilidade de um comportamento de interação bastante controlado e efetivo com a radiofrequência produzida por geradores tradicionais (REJINOLD; JAYAKUMAR; KIM, 2015).

O ouro possui um comportamento já conhecido na literatura de aumento de temperatura na presença de radiofrequência gerada por solenóide, mas pouco se conhece sobre os mecanismos dessa interação. Mecanismos prováveis são o aquecimento eletroforético, aquecimento magnético e aquecimento indutivo ou por Joule, mas sua real contribuição ainda está pouco definida (COLLINS et al, 2015). O uso de nanopartículas de ouro e óxido de ferro com comportamento magnético induzem um aquecimento localizado já comprovado com o uso de bobinas solenóides para emissão de RF em estudos *in vitro* e *in vivo* (BEYK; TAVAKOLI, 2019a).

As nanopartículas de ouro (AuNP) possuem propriedades anticancerígenas para tratamento fototérmico, fotodinâmico, antiangiogênicos e de entrega de fármacos. Sua atuação na inibição da sinalização de diversas vias importantes para a biologia do câncer, mostrando que as nanopartículas de ouro visam especificamente células cancerígenas. Quando dentro dessas células, as AuNP têm como alvo genes supressores de tumor e oncogenes (CHUGH et al., 2018). Na Figura 1-15 estão indicados os mecanismos de toxicidade para células cancerígenas.

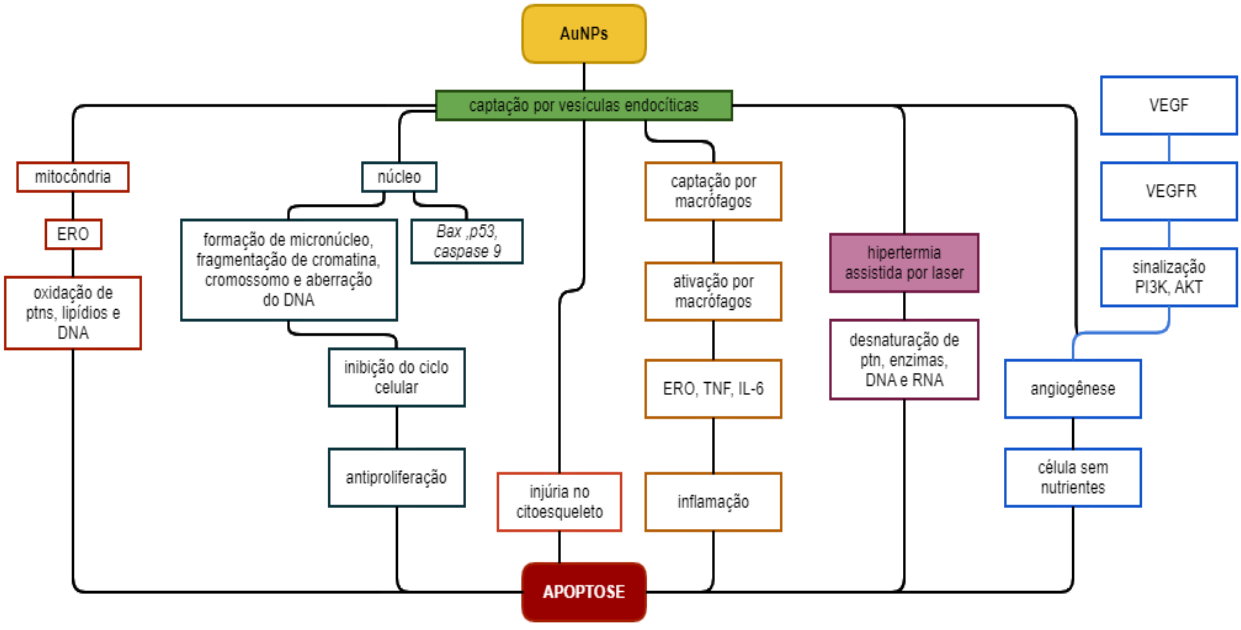


Figura 1-15 Principais mecanismos seguidos pelos AuNPs para exercer suas propriedades anticâncer: os AuNPs são absorvidos pela célula por endocitose, as vesículas são distribuídas no citoplasma e no núcleo, produzindo efeitos tóxicos que levam à apoptose ou morte celular programada. ERO – espécies reativas de oxigênio, TNF - fator de

necrose tumoral, VEGF - fator de crescimento endotelial vascular, VEGFR - receptor de fator de crescimento endotelial vascular e IL-6 - interleucina-6, (adaptado de CHUGH, et al, 2018).

O grafeno é uma folha bidimensional (2D) de átomos de carbono em hibridização sp^2 com a espessura de apenas um átomo organizada em estrutura com formato de favo de mel (AHMAD; FAN; HUI, 2018). Grafenos têm sido propostos como bons materiais para ligação e entrega de fármacos, tais como agentes anticâncer, mas tem se mostrado como altamente hidrofóbico (SANTOS; SALES; PATERNO, 2017). Para evitar a insolubilidade do grafeno em água, a solução encontrada foi oxidá-lo formando seu derivado – o óxido de grafeno (GO) que apresenta solubilidade em água (ASADI et al., 2018).

O GO é biocompatível e com alto potencial para atuar como carreadores para entrega de medicamentos ou outras substâncias como as AuNP devido sua hidrofobicidade, a biocompatibilidade e toxicidade estão diretamente relacionadas ao tamanho, estudos mostram que a redução do tamanho é uma vantagem para esses dois quesitos (TEIXEIRA et al., 2016). Já o óxido de grafeno reduzido (rGO) é obtido pela retirada dos grupos oxigenados presentes no GO e também é utilizado para detecção de células cancerígenas e como carreadores.

1.7.1 As nanoestruturas de ouro e óxido de grafeno (GO) utilizadas com Ablação por radiofrequência (ARF)

As nanopartículas e nanocompósitos utilizados nesse estudo foram produzidos pelo Laboratório de Pesquisa em Polímeros e Nanomateriais (LabPoln), da Universidade de Brasília e já são caracterizados e bem consolidadas na literatura pelo grupo de pesquisa, incluindo caracterização do nanocompósito (MONTEIRO et al, 2023). Uma nanopartícula de ouro com cobertura de citrato, a ser denominada de Au-cit; uma nanofolha de óxido de grafeno, a ser denominado GO, uma nanofolha de óxido de grafeno com polietilenoimina, a ser denominada GO-PEI e o nanocompósito de óxido de grafeno com polietilenoimina (PEI) e nanopartículas de ouro depositadas, a ser denominado GO-PEI-Au. Para o ensaio *ex vivo*, utilizou-se também uma nanopartícula de ouro com polietilenoimina (PEI), a ser denominada AuNP – PEI – 10x para observação do comportamento do polímero PEI (SANTOS; SALES; PATERNO, 2017; TEIXEIRA et al., 2016)

As nanoestruturas Au-cit, GO e GOPEI, serão avaliadas como referências de comparação da atuação do compósito nos ensaios *in vitro* e *in vivo*, assim como a nanoestrutura AuNP – PEI – 10x foi utilizada como parâmetro, mas o objetivo final do estudo é a avaliação do

nanocompósito GO-PEI-Au. As nanoestruturas foram caracterizadas pelo grupo de pesquisa LabPoln/IQ (Laboratório de Síntese de Polímeros/IQ) e possuem estabilidade e aquelas ligadas ao GO estão conectadas sobre a folha de grafeno, como se observa no esquema ilustrativo da estrutura do nanocompósito GO-PEI-Au (Figura 1.16).

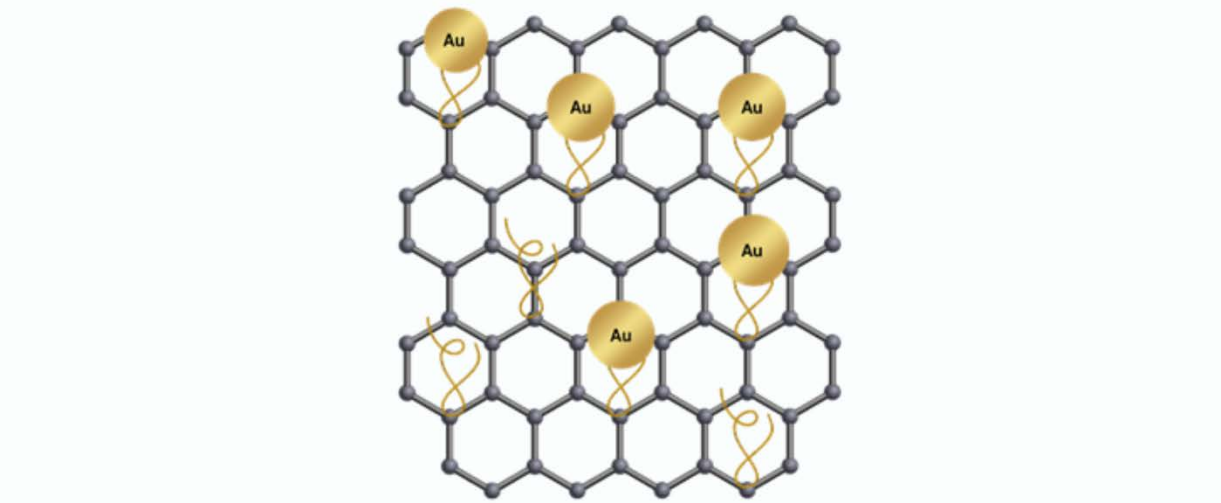


Figura 1-16 Esquema ilustrativo indicando a estrutura do nanocompósito GO-PE-Au contendo a nanopartícula de ouro por método químico com fotoexcitação com UV (autoria própria).

Como ilustrado na Figura 1-17 para a síntese de nanocompósitos com ouro, foi utilizado um método químico com $HAuCl_4$ com fotoexcitação a 254 nm a 16W em mais de uma opção de fração molar [PEI]/[Au]. O PEI é um polímero biocompatível que permite estabilizar a estrutura coloidal, portanto, atua como estabilizante do nanocompósito (TEO et al., 2012).

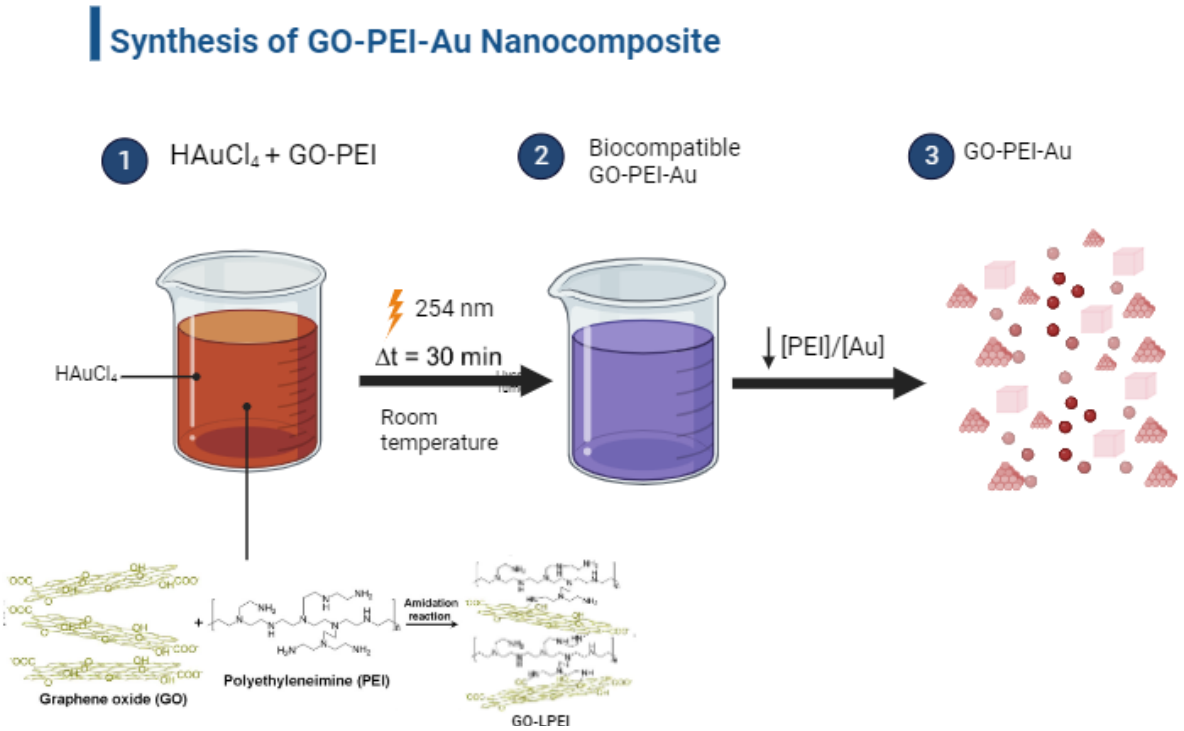


Figura 1-17 Processo de síntese dos nanocompósitos de Au. Observa-se o uso de fotoexcitação à temperatura ambiente da solução aquosa de $HAuCl_4$ a diferentes frações molares. No detalhe, observa-se a estrutura molecular do PEI (Autoria própria).

A caracterização realizada pelo (LabPoln) sugere que a funcionalização do GO com PEI foi homogênea e que sua presença é essencial para a produção bem-sucedida do nanocompósito GO-PEI-Au. O histograma de distribuição de tamanho para o nanocompósito GO-PEI-Au forneceu um diâmetro médio de 26,6 ± 0,3 nm após ajuste log-normal.

A partir dos dados da curva isotérmica foi verificado que 30 min de reação são mais que suficientes para que a reação atinja o equilíbrio e foi o tempo escolhido para a preparação da amostra GO-PEI-Au. Os dados de tamanho hidrodinâmico (HD), o índice de polidispersidade (PDI) e o potencial zeta, indicaram que a suspensão é estável (MONTEIRO et al., 2023).

2 JUSTIFICATIVA

A incidência e mortalidade por câncer aumentam progressivamente no mundo. O panorama de possibilidades para o tratamento do câncer ainda está centrado na cirurgia ou ressecção, quimioterapia, radioterapia, hormonioterapia, imunoterapia ou transplante de medula óssea – em casos de leucemia (INCA, 2020). Opções terapêuticas denominadas tratamentos acessórios, com baixa invasividade como a ablação por radiofrequência (ARF) pode ser aplicado em tumores de pequenas dimensões e quadros iniciais de diagnósticos de câncer de fígado, pulmão, rim e outros (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014).

Apesar da potencialidade e segurança do procedimento de ARF já bem consolidada na oncoclínica, há ainda duas principais limitações da técnica de ARF que são a recidiva pós-ablação em 3 a 5 anos e o alcance limitado para volumes tumorais de até 3 cm (ZHANG et al., 2016). Devido ao perfil de lesão não homogênea, as terapias combinadas surgem como uma perspectiva para solucionar as limitações típicas da ARF.

Dentre as opções para superação dessas limitações encontra-se a nanotecnologia como uma das alternativas mais promissoras. Sua atuação conjugada com a radiofrequência, permite favorecer a transferência da temperatura na área da ablação de uma forma controlada (JUN et al., 2015). Dentre as várias opções de nanoestruturas, as nanopartículas de ouro e óxido de ferro com comportamento magnético induzem a um aquecimento localizado já comprovado com o uso de bobinas solenoides para emissão de RF em estudos *in vitro* e *in vivo*.

Grafenos têm sido propostos como bons materiais para ligação e entrega de fármacos, tais como agentes anticâncer (DOS SANTOS, 2017). O óxido de grafeno (GO) é biocompatível e com alto potencial para atuar como carreador tanto para entrega de medicamentos ou outras substâncias como as AuNP devido à sua hidrofobicidade. A biocompatibilidade e toxicidade estão diretamente relacionadas ao tamanho, estudos mostram que a redução do tamanho é uma vantagem para esses dois quesitos (TEIXEIRA et al., 2016).

Portanto, essa tese, propõe uma terapia combinada de ARF com ouro e grafeno na forma de compósitos como opção para garantir as vantagens dessa técnica e prover soluções para suas limitações. As nanoestruturas podem favorecer o aumento do volume de ablação, reduzir a recorrência e por consequência, aumentar a sobrevida pós-ablação. A ARF é mais uma opção terapêutica que fornece maior qualidade de vida durante o tratamento do câncer e após sua aplicação para o paciente em comparação às técnicas tradicionais.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar a ação antitumoral da terapia combinada da ablação por radiofrequência com nanoestruturas de ouro e grafeno em modelo tumoral *Walker* 256 (LLC-WRC-256).

3.2 Objetivos específicos

- Validar o modelo *in vitro* e *in vivo* com a linhagem *Walker* 256 e o rato *Wistar* para estudo da terapia combinada de ARF com o nanocompósito GO-PEI-Au e as nanoestruturas de referência Aucit, GO e GO-PEI;
- Avaliar a viabilidade celular em diferentes concentrações das nanoestruturas, internalização do nanocompósito e alterações morfológicas celulares com a linhagem tumoral LLC-WRC-256 (*Walker* 256);
- Caracterizar a progressão e padrão de crescimento do modelo tumoral Walker (linhagem *Walker* 256) nos ratos *Wistar* machos por meio de análises histológicas;
- Verificar toxicidade da terapia combinada envolvendo o uso de equipamento médico de ablação térmica por RF e o nanocompósito GO-PEI-Au em ratos portadores do modelo tumoral *Walker* 256, por meio de análises clínicas, hematológicas e bioquímicas;
- Verificar o efeito antitumoral do uso combinado do equipamento de RF e das nanoestruturas em ratos *Wistar* portadores do modelo tumoral *Walker* 256 por meio de análise histopatológica e imunomarcadores, além da avaliação do tipo de morte celular e da sobrevida após o tratamento.

4 METODOLOGIA

Para validar os efeitos biológicos induzidos pela terapia combinada de ARF com o nanocompósito GO-PEI-Au neste estudo foi utilizado o eletrodo com formato de agulha da *Covidien Cool Tip* com o gerador de RF denominado SOFIA® produzido pelo Laboratório de Engenharia Biomédica da Universidade de Brasília, em ratos *Wistar* com o modelo tumoral *Walker* 256 implantado a partir do cultivo de células ascíticas da linhagem celular *Walker* 256 obtida na Universidade Federal do Paraná (UFPR), essas células foram produzidas em matrizes de ratos *Wistar.* Para os ensaios *in vitro* foi utilizada a linhagem tumoral *Walker 256 (LLC-WRC-256)* obtida da Sigma-Aldrich e a linhagem normal NIH-3T3 obtida pelo Banco de Células da UFRJ.

Para alcançar esse objetivo, o estudo foi realizado em 3 (três) fases: (1) Fase *in vitro*, (2) Fase *ex vivo* e (3) Fase *in vivo*. No delineamento experimental geral da figura 4-1 estão descritos os experimentos previstos para as Fases *in vitro, ex vivo* e *in vivo*.

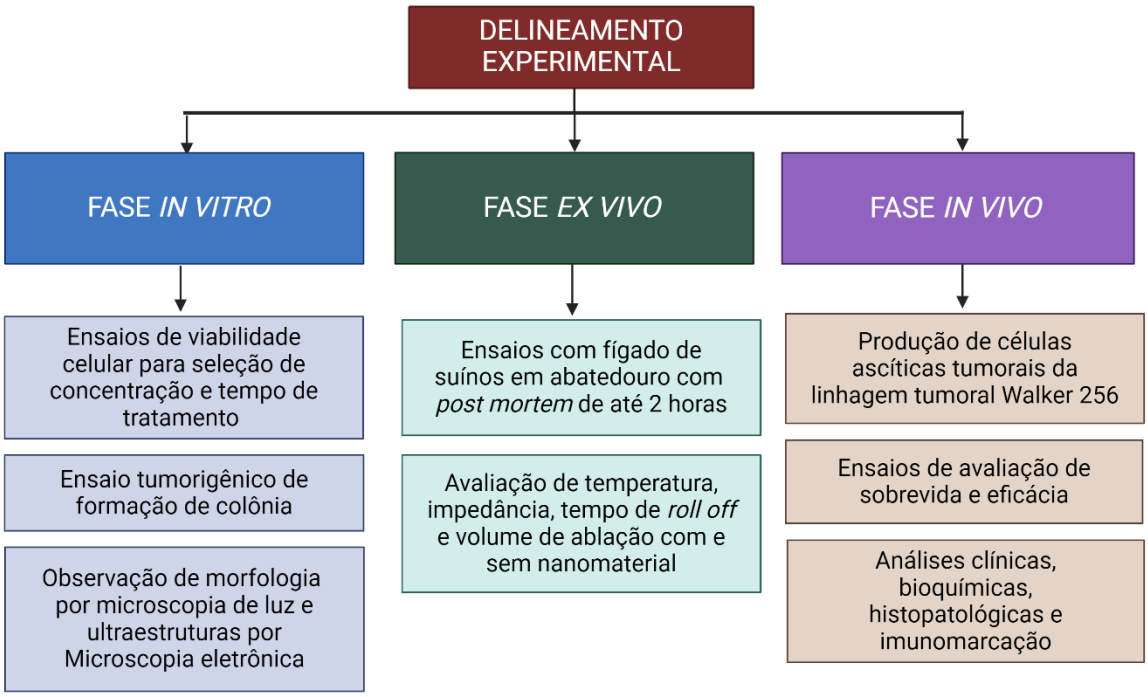


Figura 4-1 Fluxograma do delineamento experimental geral do estudo dessa tese.

4.1 Fase *in vitro*

Foram utilizadas a linhagem tumoral LLC-WRC 256 (*Walker* 256) e a linhagem normal NIH-3T3 para avaliação da ação de cada nanoestrutura com testes de viabilidade celular, tempo de tratamento e concentração do fármaco conforme variação da temperatura; ensaio tumorigênico de formação de colônia; observação de morfologia e ultraestrutura por microscopia de luz e Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), respectivamente; e internalização por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET).

4.1.1 Manutenção das células

A linhagem LLC-WRC 256 (*Walker* 256) foi utilizada como modelo tumoral e cultivada em meio *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI-1640). A linhagem NIH-3T3 foi cultivada em meio *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM), as duas linhagens foram mantidas à 37°C com 5% de CO_2 e umidade de 90%. Os meios foram suplementados com 10% de soro fetal bovino inativado (SFB) e (100 µg/mL penicilina e 100 µg/mL estreptomicina) a 1%. A linhagem LLC-WRC 256 (*Walker* 256) foi obtida na Sigma Aldrich e NIH-3T3 foi obtida no Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ).

As escolhas dos modelos de células tumorais envolvem as suas características como referência para o planejamento experimental, permitindo responder a um conjunto de questões de investigação. Vários dos modelos animais de tumor utilizados para responder a essas questões são inicialmente avaliadas *in vitro*, favorecendo uma direção mais enxuta da etapa de ensaios *in vivo* com redução de grupos experimentais. Quanto mais informações obtidas com os modelos *in vitro*, menos animais serão utilizados, conforme recomendado, por exemplo, pela FDA no seu plano de toxicologia preditiva (FDA, 2021).

O modelo tumoral Walker 256 permite estudar a progressão tumoral, desde o desenvolvimento inicial do tumor primário até a formação de metástases em órgãos distantes, proporcionando uma compreensão da evolução do tumor e do processo de sintomas típicos muito semelhante ao aqueles de um ser humano, como caquexia em pacientes avançados. A sua utilização no planejamento permite fornecer uma resposta eficaz para terapias combinadas, como a proposta neste estudo, e obter um conjunto de respostas relativas ao microambiente tumoral e aos mecanismos biológicos (BRIGATTE et al., 2007; AMARAL et al., 2019).

4.1.2 Curvas de calibração

Foram realizadas curvas com avaliação da variação de temperatura conforme a variação do tempo de ablação e da concentração das nanoestruturas e tipos de meio de cultivo.

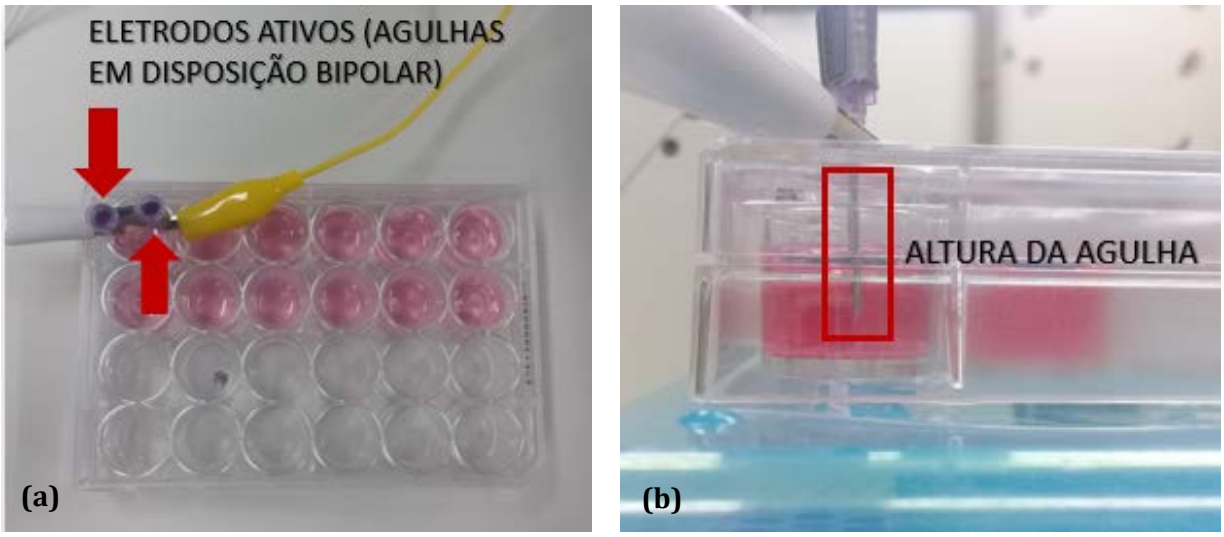
Os grupos controle e experimentais analisados foram:

- Grupo controle sem nanoestrutura ou ARF;
- Grupo controle com ARF;
- Grupos experimentais com as quatro nanoestruturas (Au-cit, GO, GO-PEI, GO-PEI-Au) em 5 concentrações, conforme (DOS SANTOS , 2017) ajustadas à concentração máxima da nanoestrutura Au-cit: 0,9375; 1,875; 3,75; 7,5; 15; 30 e 60 $\mu g.mL^{-1}$;
- Grupos experimentais com a terapia combinada com quatro nanoestruturas adicionadas às linhagens 24h antes da ARF (MACKEYEV et al., 2017) . O tempo de aplicação da RF foi definido em curva de calibração do tempo x temperatura para identificação do melhor protocolo de tratamento de ARF.

Para avaliar a interação entre as nanoestruturas e a ARF, escolheu-se observar a variação de temperatura por ser esse o objetivo principal do tratamento da ARF – eliminar células tumorais devido ao aumento de temperatura. Também foi criado um modelo experimental

utilizando-se uma placa de cultivo de 24 poços por se ajustar à emissão de RF utilizando um sistema similar ao utilizado com o paciente em que há o fechamento de um circuito com dois eletrodos. No caso da placa, por ser uma dimensão bem mais reduzida, fez-se uma expansão do eletrodo para duas agulhas de Gauge 20 x 5,5 mm que simularam um circuito fechado com dois eletrodos ativos (configuração bipolar) e uma resistência externa de 63,6 Ω em série com os meios de cultivo para que o equipamento de ablação identificasse o circuito formado apesar da baixa resistência elétrica a uma potência de 5W.

Para avaliar a variação de temperatura durante o processo de ablação *in vitro*, foi necessário produzir uma curva de calibração de temperatura x tempo com os dois meios de cultivo – DMEM e RPMI – utilizados para cada linhagem celular e desses meios com as quatro nanoestruturas avaliadas. Assim, foi possível identificar o comportamento do procedimento de ablação em relação às variáveis do equipamento como a impedância, a tensão, a corrente e a variação de temperatura. Os dados de temperatura foram obtidos com a câmera térmica VT 04A Fluke. Na Figura 4-2, pode-se observar o sistema de ablação *in vitro* montado e suas partes identificadas.



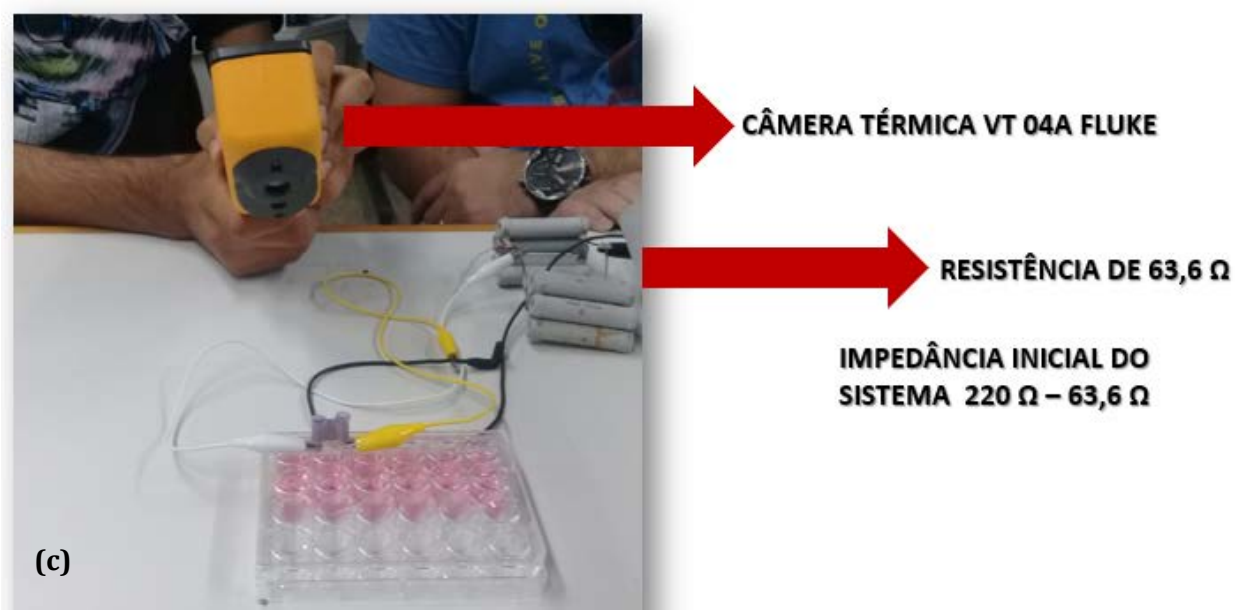


Figura 4-2 Sistema de ablação por RF com o equipamento SOFIA *in vitro*. Na letra (a) podem-se observar as agulhas atuando como os eletrodos ativos, na letra (b), tem-se uma imagem lateral para verificar que a agulha está mergulhada no meio de cultivo e na letra (c) tem-se o *set* experimental completo com a resistência, o valor total da impedância inicial do sistema e a câmera térmica.

Esse mesmo sistema de ablação foi utilizado para a aquisição das informações sobre a atuação das nanoestruturas com e sem ARF nos ensaios *in vitro*.

4.1.3 Ensaio de viabilidade celular

O ensaio de viabilidade das células LLC-WRC 256 e NIH-3T3, foi feito por ensaio padrão por brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT), descrito anteriormente por Mosmann (MOSSMANN, 1983). A solução de MTT interage com as desidrogenases mitocondriais de células viáveis, promovendo a redução do MTT ao composto formazan, o qual possui coloração púrpura. A viabilidade celular é indicada pela quantificação da produção de cristais de formazan e foi detectada por espectrofotometria em comprimento de onda de 595 nm no equipamento SpectraMax® M2 (Molecular Devices). O ensaio de MTT foi realizado em triplicata para cada concentração utilizada. Os experimentos ocorreram em série de três repetições como eventos independentes. Foram utilizados grupos experimentais com as quatro nanoestruturas + ARF em tempo pré-definido em curva de concentração para avaliação da toxicidade e tipos diferentes de tratamento.

Os resultados obtidos com os ensaios de viabilidade celular com a solução de MTT foram submetidos a uma análise estatística com a Equação de Hill ou Modelo de Hill para reduzir as interferências típicas desse tipo de análise indireta e obteve-se a dose letal 50% (DL-50), a Benchmark Dose 10% (BMD) (MONTEIRO et al., 2023).

4.1.4 Observação da morfologia celular por microscopia de luz

Para o estudo das alterações morfológicas da linhagem tumoral LLC WRC 256 (*Walker* 256) as células foram plaqueadas $1x10^5$ em placas de 12 poços. Após 24 horas de plaqueamento foi adicionado o tratamento com o nanocompósito GO-PEI-Au (3,75 µg/mL) ou somente o meio de cultura. Após mais 24 horas foi aplicada a RF por 2 minutos, no caso da linhagem LLC WRC 256 (*Walker* 256) logo após a aplicação da RF foi iniciada a observação das alterações em tempo real (*timelapse)* por um período de 24 horas no equipamento EVOS Cell Imaging System (Leica).

4.1.5 Análise da morfologia celular por microscopia eletrônica de varredura

Para analisar as diferenças morfológicas presentes na superfície celular em decorrência da terapia combinada de RF + GO-PEI-Au, as células tumorais e não tumorais foram analisadas em microscópio eletrônico de varredura (MEV), (JEOL, Japan). Primeiramente, 10^4 células foram plaqueadas em lamínulas redondas de 13 mm colocadas em placas de 24 poços e aplicada a RF por 2 minutos após 24h de tratamento com GO-PEI-Au. Após 48 h de tratamento, ocorreu descarte do meio de cultivo e do tratamento e as células passaram pelo processo de lavagem com PBS 1X, e foram fixadas com fixador Karnovisky (2% de paraformaldeído, 2% de glutaraldeído em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7,2) overnight à 4 ºC. Posteriormente ao descarte do fixador, as linhagens (LLC-WRC-256 – *Walker* 256 e NIH-3T3) foram lavadas com tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7,2. As células foram pós-fixadas, por 30 min, com tetróxido de ósmio 2% e ferricianeto de potássio 1,6% em tampão cacodilado de sódio 0,2 M, pH 7,2, então lavadas com água destilada. As células passaram por uma desidratação seriada com concentrações crescentes de acetona (30%-100%), pela secagem ao ponto crítico CPD 030 (BALZERS, EUA) e metalização SCD 500 (LEICA, Germany) para serem analisadas no Microscópio Eletrônico de Varredura JSM-7001F (JEOL, Japan).

4.1.6 Análise da internalização celular por microscopia eletrônica de transmissão

A linhagem LLC-WRC 256 (Walker 256) foi plaqueada na densidade de $1x10^6$ células e tratadas com GO-PEI-Au na concentração de 3,1 µg/mL por 4 e 6 horas de tratamento. As células foram desaderidas dos poços com tripsina, lavadas com PBS e fixadas por 1 hora em fixador

Karnovisk (contendo glutaraldeído 2% (p:v), paraformaldeído 2% (p:v) e sacarose 3% (p:v) em tampão cacodilato de sódio 0,1M (pH 7,2). Posteriormente, as células foram pós-fixadas com tetróxido de ósmio 1% (p:v) e ferricianeto de potássio 0,8% (p:v) em tampão cacodilato de sódio 0, M, pH 7,2 por 1 hora. O material foi lavado com tampão cacodilato de sódio e contrastado *in block* durante 24 horas com acetato de uranila 0,5% (p:v) a 4°C. Em seguida, as células foram lavadas, desidratadas em concentrações crescentes de acetona (30%-100%) e embebidas em resina Epon. Secções ultrafinas de 50 nm a 70 nm foram obtidas com facas de diamante em ultramicrótomo (Leica Microsystems, Áustria). As secções foram montadas em telas de cobre e examinadas em Microscópio Eletrônico de Transmissão Jeol 1011 (Jeol, USA) a uma tensão de aceleração de 80 kV.

4.1.7 Ensaio de formação de colônia e recuperação celular

Com o intuito de se avaliar a proliferação celular da linhagem LLC-WRC 256 (*Walker* 256), respeitando-se as variáveis do estudo, foi realizado o ensaio de colônia. A partir desse ensaio, é possível avaliar a eficácia do tratamento em inibir a formação de colônias e/ou diminuir o tamanho delas. Para tanto, as células foram plaqueadas em placas de 24 poços, em populações iniciais de $5x10^2$ células por poço. Em seguida, foram cultivadas de acordo com as quatro variáveis do estudo. No dia que corresponderia ao da análise microscópica, as células foram desaderidas com o uso de tripsina, cada grupo experimental foi contado e a viabilidade celular foi conferida com corante azul de tripan 0,4%. Depois, o número de $5x10^2$ células - de cada grupo - foi replaqueado em placa de cultivo de 6 poços. A placa foi mantida em estufa 37ºC, com CO_2 a 5% ao longo de 15 dias. Ao final do processo, retirou-se todo o meio de cultivo, as células foram fixadas com metanol puro por duas vezes - cinco minutos cada banho - e, por fim, utilizou-se o corante cristal violeta a 0,5% durante cinco minutos. As imagens foram obtidas pelo estereoscópio LEICA M205C (Leica-Alemanha) acoplado à câmera LEICA DFC292 (Leica-Alemanha) no aumento de 8x.

4.2 Fase *ex vivo*

Para avaliação do funcionamento do equipamento, foram realizados testes *ex vivo* em fígado de suínos com *post mortem* de no máximo 2h para ajustes de desempenho do equipamento SOFIA® com a terapia combinada com as nanoestruturas de ouro e grafeno permitindo avaliar o volume de ablação produzido por análise macroscópica a partir de imagens,

análise de variação de temperatura, tempo para alcance do fenômeno de resistência do tecido *(roll off)* e observação de variação de impedância.

Estudos *ex vivo* permitem ajustes e consolidação de parâmetros de funcionamento. Ao observar a estabilidade de funcionamento, o comportamento de variáveis físicas do *hardware* e *software* ao longo de um procedimento em simulação é possível antecipar ajustes que seriam necessários realizar com animais de laboratório e a interferência da presença do polímero PEI na constituição. Por essa tese envolver um estudo de terapia combinada com um dispositivo médico, há na literatura diversos cenários experimentais relatados que permitem a análise da interação da ARF com nanoestruturas (BURDÍO et al., 2007; NGUYEN et al., 2015; SHAO et al., 2017; ZIEGLE et al., 2018). Esses estudos envolvem realizar o procedimento de ablação em um órgão de interesse já extraído do corpo de um animal para análise macroscópica do volume de ablação que o equipamento é capaz de produzir.

No caso de um equipamento de ARF como o SOFIA® utilizou-se peças de fígado suíno com *post mortem* de até 2h obtidos em abatedouro. O fígado foi o órgão escolhido por ter sido o equipamento SOFIA® projetado inicialmente para ablação de carcinoma hepatocelular e seus parâmetros de funcionamento para esse tipo de tecido já são conhecidos pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Engenharia Biomédica/UnB facilitando posterior análise dos dados obtidos.

A peça de fígado foi separada em seus lóbulos e fragmentos de tamanhos de até 100 g foram cortados utilizando-se uma forma de PVC de tamanho específico para que todos tenham um tamanho e formato padrão e serem mantidos a 37°C em banho-maria até o momento de ablação. A potência escolhida foi de 20 W, conforme estudos anteriores do grupo de pesquisa (PERAFÁN, 2018). Essa potência foi confirmada em testes iniciais comparada às potências de 10 e 15 W e o tempo de ablação deverá ocorrer até o máximo de 10 min (máximo permitido pelo equipamento por questões de segurança no procedimento ablativo) ou até ocorrer o fenômeno do *roll off*. Esse padrão foi estabelecido utilizando-se somente ARF.

Os grupos experimentais e controle foram definidos por letras e símbolos como descritos a seguir:

- RF PURA – Grupo controle em que somente a RF foi aplicada;
- AD – Grupo controle em que foi aplicada RF e água destilada;
- SALINA - Grupo controle em que foi aplicada RF e soro fisiológico comercial;
- GO – Grupo experimental em que foi aplicada RF com a nanoestrutura GO;

- AuNP-PEI – 10x - Grupo experimental em que foi aplicada RF com a nanoestrutura AuNP-PEI – 10x;
- GO-PEI-Au - Grupo experimental em que foi aplicada RF com a nanoestrutura GO-PEI-Au.

Os materiais presentes no cenário experimental para execução dos procedimentais estão relacionados a seguir e a Figura 4-3 (a) e (b) permite identificar a disposição de cada item:

- Equipamento SOFIA®;
- Eletrodo formato guarda-chuva de 12 hastes e 4 cm de diâmetro da *Le Veen Standard* da *Boston Scientific*;
- Suporte com garra para posicionar o eletrodo;
- Forma de metal para atuar como eletrodo dispersivo ou *ground pad*;
- Formas de PVC para inserção das agulhas da bomba de infusão e para auxiliar no corte dos fragmentos de mesmo tamanho;
- Balança de precisão para aferir a massa de cada fragmento de fígado;
- Paquímetro para aferir o volume de ablação macroscópica;
- Suporte para bisturi e lâmina 21 de bisturi para corte dos fragmentos de fígado.

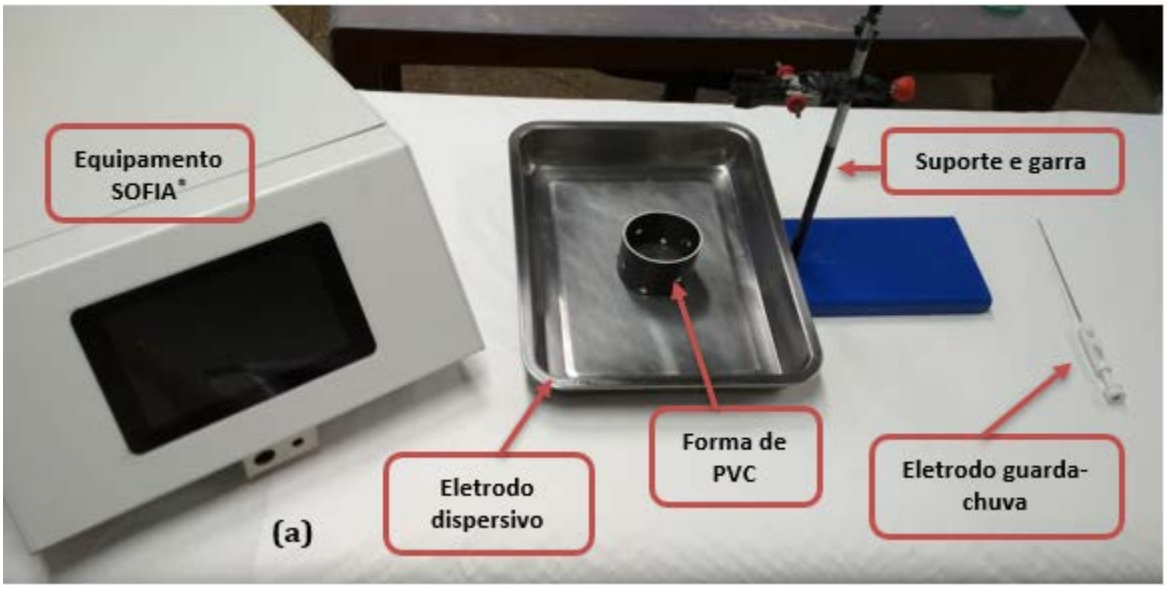




Figura 4-3. Observa-se nas imagens (a) e (b) os itens a serem utilizados durante os experimentos *ex vivo* com fígado suíno**.**

As três nanopartículas foram diluídas em água destilada na proporção de 1:1000 e injetadas no interior do fragmento da peça de fígado utilizando-se seringas dispostas na fôrma de PVC em um volume final de 9,5 mL com taxa de gotejamento de 1,9 mL por min ao longo de 5 min. O gotejamento foi controlado por uma bomba de infusão (Figura 4-4, (a) e (b)).

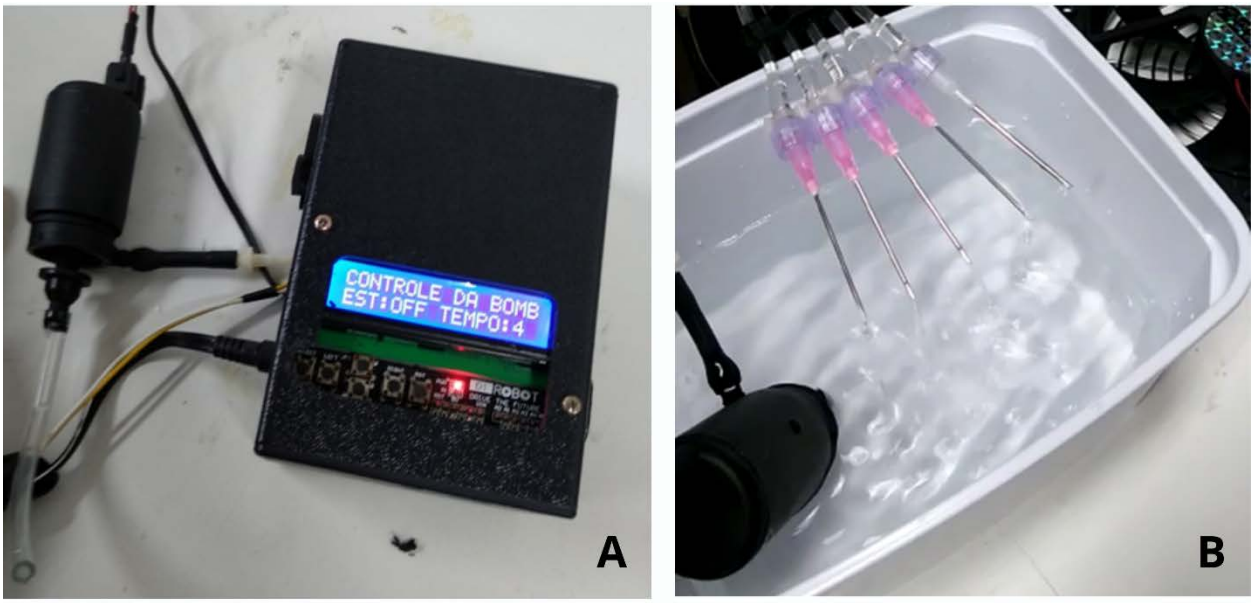


Figura 4-4 Em (a) observa-se o equipamento projetado para controle do gotejamento das nanopartículas e em (b) observam-se as agulhas liberando água destilada e que foram inseridas na fôrma de PVC.

Após o procedimento de ablação faz-se a aferição com o paquímetro a medida do eixo X, Y e Z para cálculo do volume final de ablação, conforme indicado pela imagem da Figura 4-5.

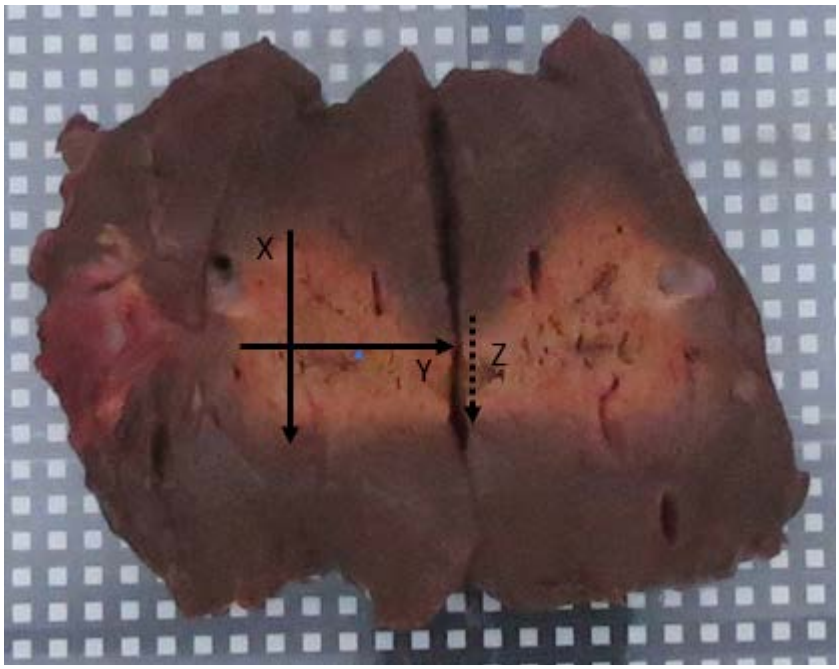


Figura 4-5 Na imagem observa-se um fragmento de fígado suíno pós-ablação, cortado ao meio para expor a região ablada de cor acastanhada mais clara que o fígado normal. Os eixos X, Y estão indicados por setas de cores preta preenchidas e Z (altura) está indicado por uma seta de cor preta pontilhada.

4.3 Fase *in vivo*

Para a fase *in vivo* previu-se 2 grupos de ratos *Wistar* machos com 45 dias de vida: (1) **Grupo Experimental Sobrevida** para estudo da sobrevida dos animais após a ablação com as nanoestruturas escolhidas. Nesse ensaio fez-se a validação da terapia combinada da ARF com as nanoestruturas, o tempo de sobrevida com cada tratamento, a redução do volume tumoral, o quadro clínico dos animais, (2**) Grupo Experimental – Estudo de eficácia terapêutica** para avaliação do efeito de cada tratamento no tumor.

Os dois grupos experimentais exigiram uma produção e manutenção das células ascíticas em um grupo matriz de 15 animais para posterior inoculação nos grupos experimentais. Para o estudo houve aprovação pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade de Brasília SEI n.º 23106.084999/2021-91.

Os ratos *Wistar* foram obtidos do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na área de Ciência em Animais de Laboratório/CEMIB/Unicamp. Os animais ficaram acondicionados no Biotério Central do Instituto de Ciências Biológicas/UnB em ambiente com ciclo claro/escuro de 12/12 horas com dieta e água *ad libitum*.

Os grupos experimentais da Fase ou Estudo *in vivo* estão descritos a seguir:

Grupo Experimental Sobrevida

(1) Animais sadios – 5 animais
(2) Animais com tumor tratados com solução salina - PBS, pH 7,2 (**grupo PBS**) - 5 animais
(3) Animais com tumor tratados com RF (**grupo RF**) - 5 animais
(4) Animais com tumor tratados com GO-PEI-Au (**grupo NANO**) - 5 animais
(5) Animais com tumor tratados com GO-PEI-Au + RF (**grupo RF+NANO**) – 5 animais
(6) **Grupo matriz para produção de células ascíticas** – 15 animais

Grupo Experimental – Estudo de eficácia

(1) Animais sadios – 5 animais
(2) Animais com tumor tratados com solução salina - PBS, pH 7,2 (**grupo PBS**) - 5 animais
(3) Animais com tumor tratados com RF (**grupo RF**) - 5 animais
(4) Animais com tumor tratados com GO-PEI-Au (**grupo NANO**) - 5 animais
(5) Animais com tumor tratados com GO-PEI-Au + RF (**grupo RF+NANO**) - 5 animais
(6) **Grupo matriz para produção de células ascíticas** – 15 animais

A fase *in vivo* utilizou a linhagem *Walker* 256 obtida de cultivo de células ascíticas tumorais em matrizes de rato *Wistar*. Esse modelo de formação tumoral permite a imunomodulação das células tumorais tornando-as mais agressivas a cada passagem em um animal. Para sua produção, foi realizada a transferência das células de um tubo criogênico das células ascíticas obtidas de matrizes animais da Universidade Federal do Paraná para dois ratos *Wistar* com 4 mL de solução-tampão fosfato salino (PBS) e após cinco a dez dias iniciou-se as transferências dessas células.

O carcinossarcoma Walker 256 é uma linhagem celular derivada de um tumor sólido originalmente desenvolvido em ratos. Este modelo tumoral tem sido amplamente utilizado em pesquisas científicas, especialmente em estudos antitumorais e oncológicos. Essa linhagem foi inicialmente desenvolvida por Walker em 1928, a partir de um tumor mamário sólido em uma rata. Desde então, essa linhagem tumoral foi mantida e passada por várias gerações de ratos. O tumor desenvolvido é heterogêneo, contendo tanto componentes carcinomatosos (células epiteliais) quanto sarcomatosos (células mesenquimais). Isso o torna um modelo útil para estudar tumores com características variadas (MARTINS et al., 2020).

O tumor Walker 256 é altamente proliferativo com um crescimento rápido. Sua agressividade contribui para sua utilidade como modelo de estudo, pois induz uma resposta imunossupressora no hospedeiro, permitindo estudar a relação entre o sistema imunológico e o

desenvolvimento tumoral, além de ser altamente metastático proporcionando uma oportunidade para estudar os mecanismos de disseminação tumoral e métodos para inibir a metástase (RICARDO DE BRITO BELLO et al., 2019). O carcinossarcoma Walker 256 é frequentemente utilizado para avaliar a eficácia de diferentes tratamentos antitumorais, como terapias quimioterápicas e imunoterapias. Sua rápida resposta ao tratamento facilita estudos farmacológicos, permitindo a avaliação de novas drogas em um curto período de tempo (BORODAY; CHEKHUN, 2018). Outra vantagem que se apresenta é a possibilidade de ser inoculado em diferentes órgãos com alto índice se desenvolver e em diferentes números, proporcionando controle sobre o tamanho e a localização do tumor para estudos específicos (ERÖS DE BETHLENFALVA-HORA et al., 2014; BORODAY; CHEKHUN, 2018; BELLO et al., 2019).

Os animais desenvolvem um conjunto de sintomas típicos induzidos pela ascite: pêlo arrepiado, orelha opaca, saco escrotal inchado e escurecido, abdômen inchado que permitem identificar o momento da próxima passagem. Após a primeira passagem, faz-se inoculação de 2 mL de células ascíticas para cada um dos próximos animais em sequência e ao término de 3 passagens, o conteúdo ascítico conterá células tumorais com alta agressividade (esquema da Figura 4.6). Na última passagem realiza-se a contagem de células para induzir a formação tumoral subcutânea. Utilizou-se, conforme a literatura, 3 x 10^7 células ascíticas (AMARAL et al., 2019; BELLO et al., 2019) e um *pool* de 1 mL de células foi inoculado no flanco direito do animal.

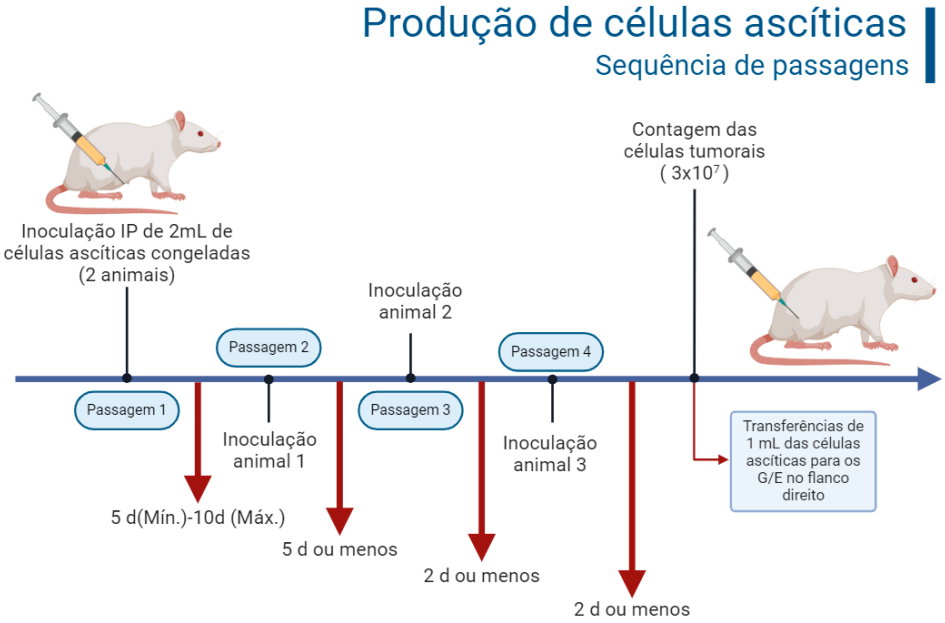


Figura 4-6 Esquema da sequência de passagens de células ascíticas entre matrizes de ratos *Wistar*.

O procedimento de retirada das células ascíticas de cada animal é realizado após a anestesia com isoflurano seguida de eutanásia em câmara de dióxido de carbono. Os procedimentos realizados nos ensaios sobrevida e eficácia estão descritos nas figuras 4-7 e 4-8. O ensaio de sobrevida seguiu o Escore de Morte Humanitária, conforme o guia para implementação de Ponto Final Humanitário da UNIFESP (2020), para o momento de eutanásia de cada animal e contabilizou um total de 38 dias de experimento. Após a etapa de produção de células ascíticas, no mesmo dia, foram transferidas $3x10^7$ células no flanco direito do animal e aguardou-se um período de até 10 dias para o crescimento mínimo tumoral de 2,5 cm^3 quando então o tratamento foi realizado conforme cada grupo experimental e acompanhada a remissão diariamente até 38 dias, sendo esse o limite para acompanhamento dos animais devido ao peso corporal que lhe permitiam estar nas caixas de propileno. No caso do ensaio de eficácia, os procedimentos seguiram as mesmas etapas, diferenciando-se no momento de eutanásia que ocorreu no 10º dia.

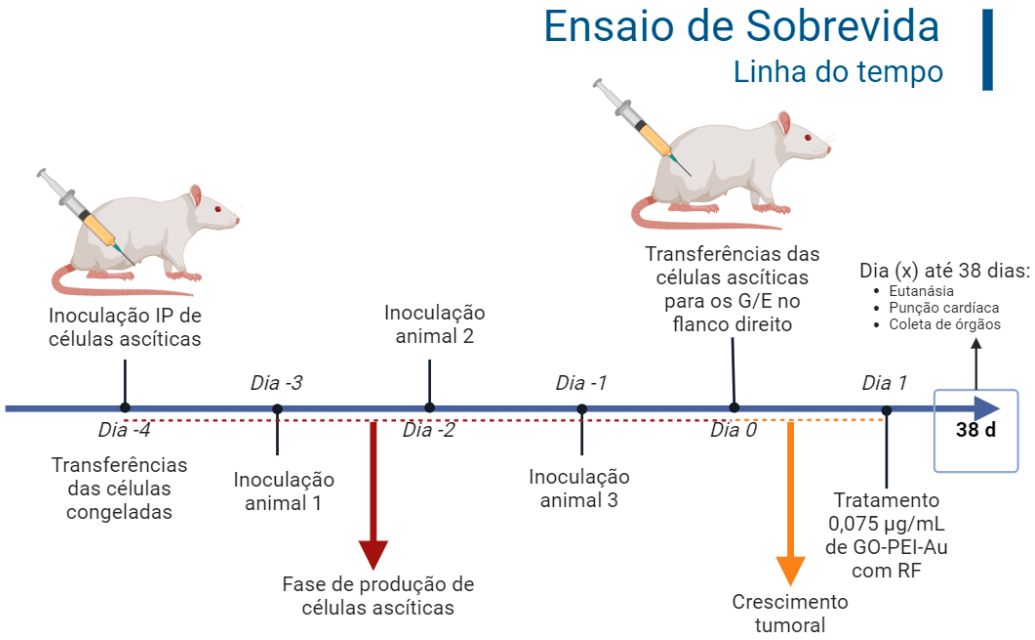


Figura 4-7. Linha do tempo com as etapas do ensaio de sobrevida.

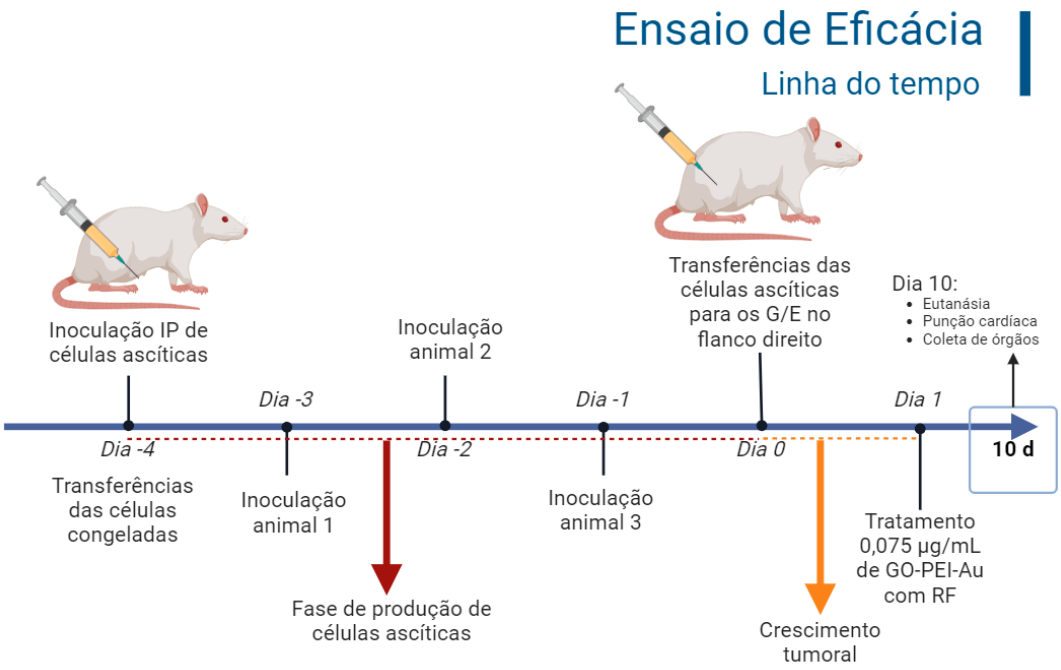


Figura 4-8. Linha do tempo com as etapas do ensaio de eficácia.

4.3.1 Análise histopatológica e imunoenzimática

A análise histopatológica foi realizada após a excisão do tumor subcutâneo e secções histológicas foram obtidas para caracterização do tumor permitindo verificar possíveis alterações provocadas pelo tratamento, tais como presença de infiltrado inflamatório, infiltrado tumoral, diferenciação e morte celular, pleiomorfismo, frequência de mitose, presença de aglomerados de nanopartículas, entre outros.

Os tumores, fígado, baço e rins, foram fixados em paraformaldeído 4% e então desidratados em uma série de concentrações crescentes de álcool etílico. Em seguida, foram diafanizadas em xilol, incluídos em parafina e emblocados em fôrmas de metal. Foram realizados 5 cortes histológicos (5 µm) foram realizados em micrótomo Leica (RM 2235, Alemanha) para cada lâmina. As secções foram distendidas, previamente, em álcool 30% e,depois, em banho-maria a 40ºC, para serem coletadas com lâminas de vidro. Estas foram mantidas, *overnight*, em estufa a 37ºC. Para a coloração, os cortes histológicos foram desparafinizados e reidratados durante três minutos em xilol 100% e em concentrações decrescentes de etanol, respectivamente. Em seguida, foram corados com hematoxilina e eosina por 60 e 120 segundos, respectivamente. A desidratação foi feita com soluções crescentes de etanol e xilol 100% (60 segundos cada banho), as lâminas foram recobertas

por lamínulas, utilizando-se Entellan® como meio de montagem, e colocadas em estufa (37ºC) por 12 horas. As lâminas foram escaneadas no Scanner Aperio (Leica) e fotografadas utilizando o software da fabricante Aperio ImageScope.

Também foram realizadas análises imuno-histoquímicas: avaliação de proliferação celular usando o marcador Ki67 e análise das moléculas reguladoras do ciclo celular, BCL-2 e p53 por meio de ensaio imunoenzimático e, com isso, identificar presença de necrose e/ou apoptose.

Para a imunohistoquímica, os blocos de parafina (tumor) foram submetidos a cortes histológicos (3 µm) e colocados em lâminas de vidro silanizadas. A imunohistoquímica foi realizada de forma automatizada no equipamento Bond (Leica, EUA). Foi realizada a incubação com os anticorpos anti-ki67, BCL-2 e p53 (anticorpos Bond RTU – Leica, EUA). A revelação foi realizada por meio da incubação com o cromógeno diaminobenzidina (DAB) e lavadas com PBS. As lâminas foram então contracoradas com hematoxilina de Mayer's, desidratadas e montadas com Entellan®.

4.3.2 Análise bioquímica e hematológica

A depuração de substâncias exógenas administradas no organismo como quimioterápicos ocorre, comumente, por via hepática (metabolismo e/ou excreção na bile) e/ou renal. Por conseguinte, substâncias tóxicas ao organismo podem causar danos ao fígado e aos rins e isto pode ser monitorado por meio de exames bioquímicos (CARNEIRO et al., 2015).

Por meio de punção cardíaca foi retirado sangue dos ratos (aproximadamente 1.000 µL) com o auxílio de seringas descartáveis de 1 mL. O volume sanguíneo foi, então, separado em minitubos para análise hematológica, com anticoagulante EDTA (ácido etilenodiaminotetracético bipotássico, 10%) e cuidadosamente homogeneizado por inversão logo após a coleta e, em seguida, centrifugados a 1.000 g por 10 minutos a 4ºC. As amostras foram submetidas à leitura em analisador automático de hematologia múltipla (equipamento XZ 2100 Sysmex, Japão). Os parâmetros avaliados foram: (1) leucograma (leucócitos totais - WBC, número de linfócitos, neutrófilos, monócitos e eosinófilos); (2) eritrograma (número de hemácias – RBC, hemoglobina - HGB, hematócrito - HCT, volume corpuscular médio - VCM, hemoglobina corpuscular – HCM e concentração de hemoglobina corpuscular média - CHCM); e (3) plaquetograma (número de plaquetas – PLT e volume plaquetário médio –VPM).

Para a análise bioquímica, o sangue coletado foi colocado em um tubo com gel separador de soro sanguíneo. As amostras foram analisadas avaliando as concentrações de transaminases pirúvica (TGP) e oxalacética (TGO), fosfatase alcalina, bilirrubina. A quantificação de creatinina foi utilizada como indicador de disfunção renal e os níveis de ácido úrico e uréia. Os procedimentos foram realizados com reagentes da marca *Labtest* conforme orientações do fabricante e as quantificações realizadas em equipamento bioquímico (Analisador automático Chem Well T, LabTest, Brasil). Os resultados dos animais sadios foram utilizados como valores de referência, por esse grupo ser composto por animais submetidos às mesmas condições ambientais.

4.3.3 Análise clínica

A análise de toxicidade aguda e validação da terapia combinada com as nanoestruturas e o equipamento SOFIA® foram avaliadas conforme parâmetros biológicos como medida de peso corpóreo, aspecto da urina e fezes, padrões de comportamento e alimentação. Análises clínicas são preditivas de toxicidade e são fundamentais para avaliar um sistema terapêutico (PEIXOTO et al., 2015).

A análise comportamental refere-se aos sinais clínicos que devem ser observados sistematicamente e registrados. Os sinais clínicos seguiram o protocolo para avaliação de toxicidade já consolidado pelo grupo de pesquisa em estudos anteriores (PEIXOTO et al., 2015) e envolveram a avaliação de sintomas clínicos como ocorrência de diarreia, ulcerações na pele, hiper ou hipoatividade, letargia, alterações neurológicas motoras, dores e câimbras abdominais e mortes não esperadas, prostração e quantidade de ração ingerida. Essas observações foram avaliadas durante todo o período experimental e, em particular, até duas horas após cada procedimento.

Em caso de necessidade, houve intervenção e retirada do animal que estivesse muito debilitado do experimento (a critério do médico veterinário). Conforme o guia para implementação de Ponto Final Humanitário da UNIFESP (2020), o ponto final humanitário deve garantir que o projeto de pesquisa alcance seus objetivos com o mínimo de sofrimento animal. Portanto, são descritos os pontos finais humanitários para a espécie animal escolhida e os procedimentos utilizados, especialmente no ensaio do Grupo Experimental Sobrevida. Para essa tomada de

decisão, durante a execução do projeto, tabelas de escores auxiliam e indicam como proceder em cada caso (CAVALCANTI, 2020).

4.4 Análise estatística

As análises estatísticas *in vitro* foram realizadas utilizando-se o *software* Graph Pad Prism 9.0. Para verificar a diferença entre os grupos de cada fase experimental foi utilizada a ANOVA Two way e testes de múltiplas comparações de Tukey com confiança estatística de 95%. Os dados sempre estarão apresentados como média ± desvio padrão. Para as curvas de calibração na fase *in vitro* fez-se uma regressão linear simples para estimativa do tempo necessário para obter a faixa de temperatura ideal de ablação no *software* R versão 4.3.0 (2023-04-21 ucrt), assim como para os dados de tensão, corrente e impedância do equipamento SOFIA. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos se o valor de $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 Resultados com a Fase *in vitro*

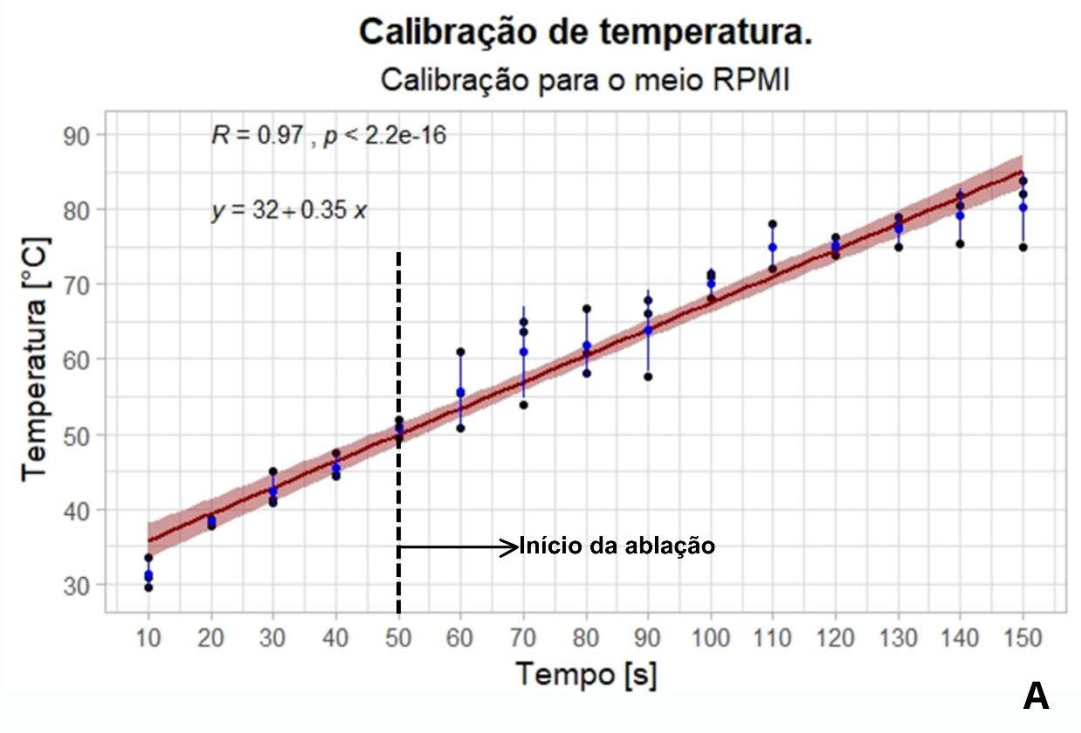
5.1.1 Curvas de calibração e avaliação de parâmetros

A curva de calibração dos meios de cultura DMEM e RPMI com a RF foi realizada de 10 em 10 segundos com análise das variáveis de temperatura, impedância, tensão e corrente. A análise de temperatura foi realizada com uma câmera térmica e a temperatura registrada foi a de maior valor, na Figura 5-1, pode-se verificar como a imagem da câmera térmica é produzida a partir de cada poço da placa de cultivo.



Figura 5-1 Imagem de um poço produzido pela câmera térmica. Da extremidade de cor azul até o centro de cor branca tem-se um aumento crescente de temperatura. O valor registrado com um sinal de cruz identifica o ponto mais quente em Farenheit (sempre convertido para Celsius pelo próprio equipamento).

A partir desses registros, foi possível construir uma curva de calibração somente com os meios de cultivo para validar o modelo e utilizá-la como referência de dados obtidos pelo equipamento de ablação além de identificar o tempo de exposição por RF necessária para obter-se a temperatura mínima de ablação de 50°C. Na Figura 5-2, pode-se observar o comportamento de cada um dos meios (A) RPMI e (B) DMEM mediante a aplicação da RF.



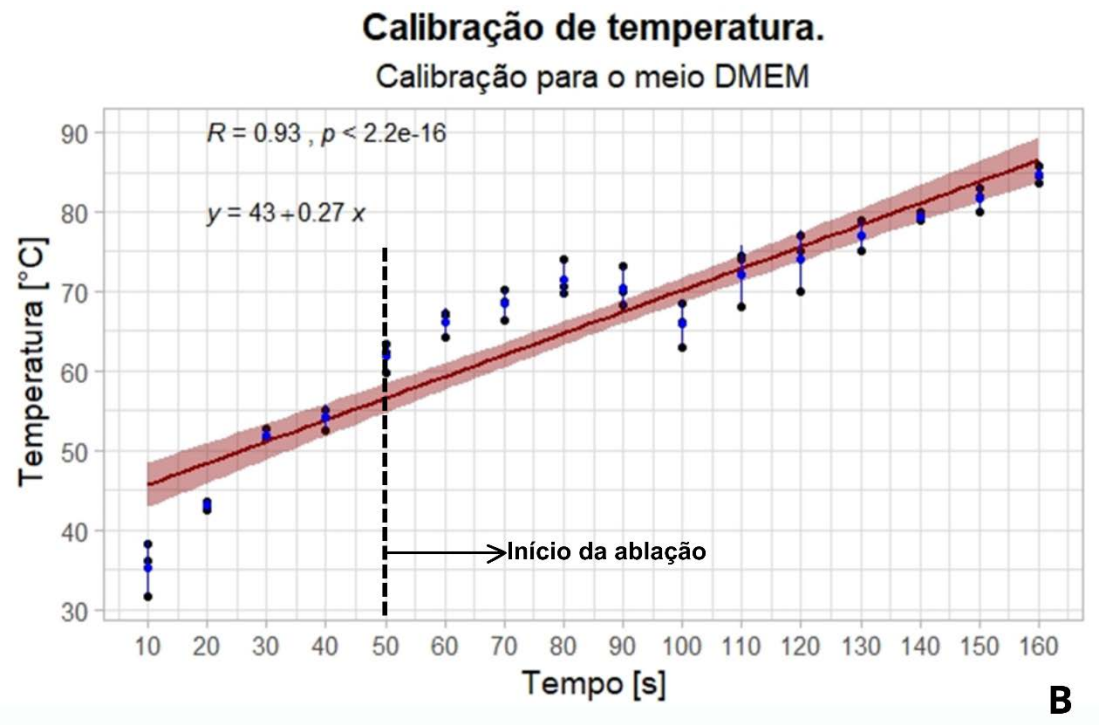
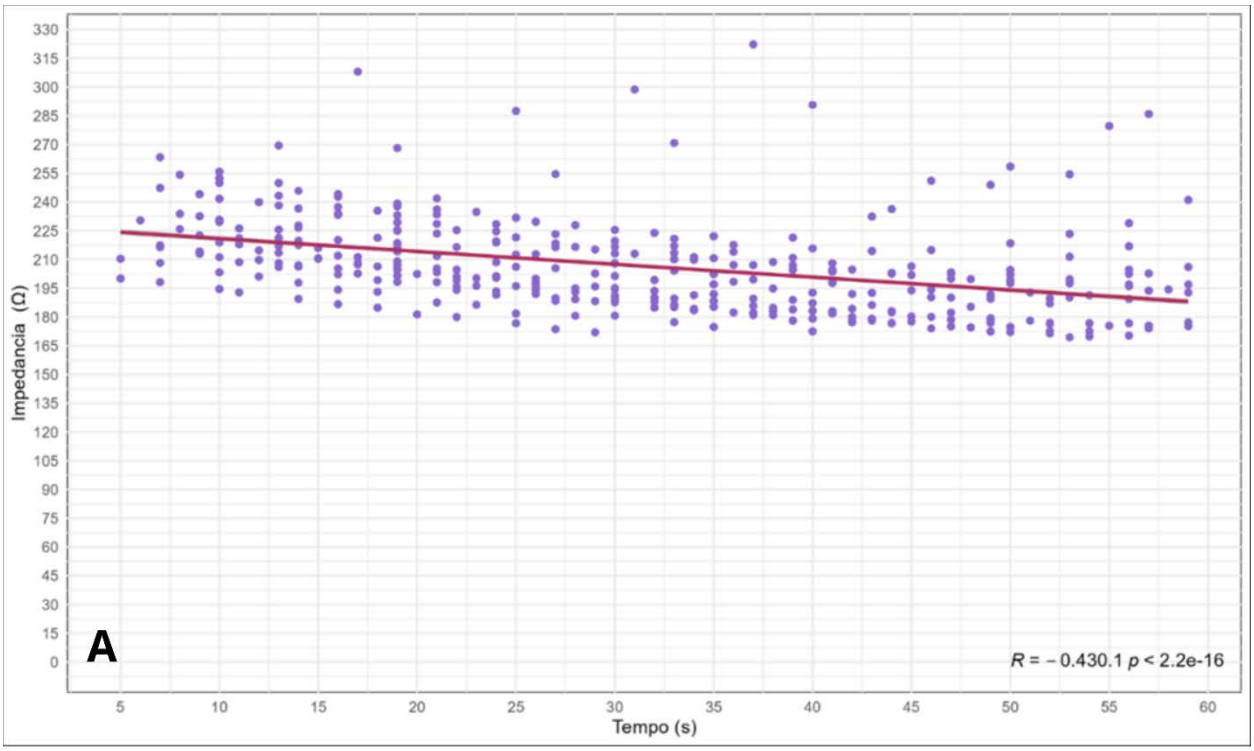
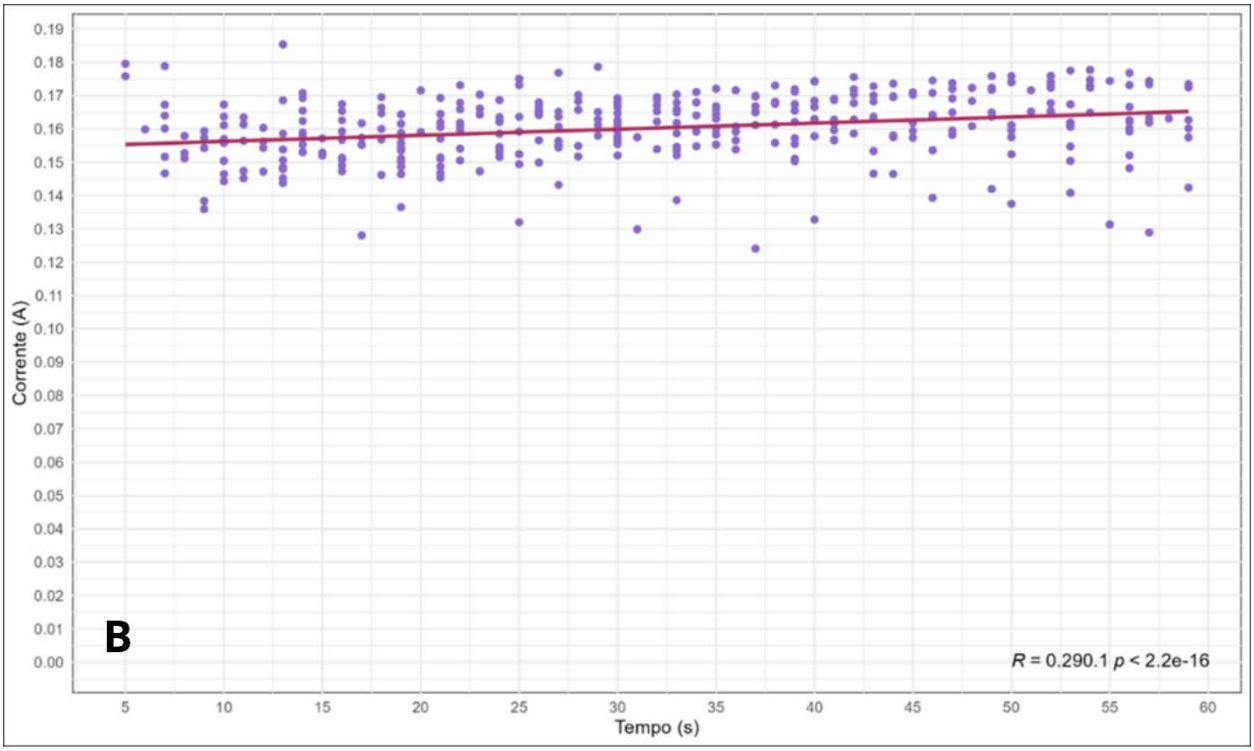


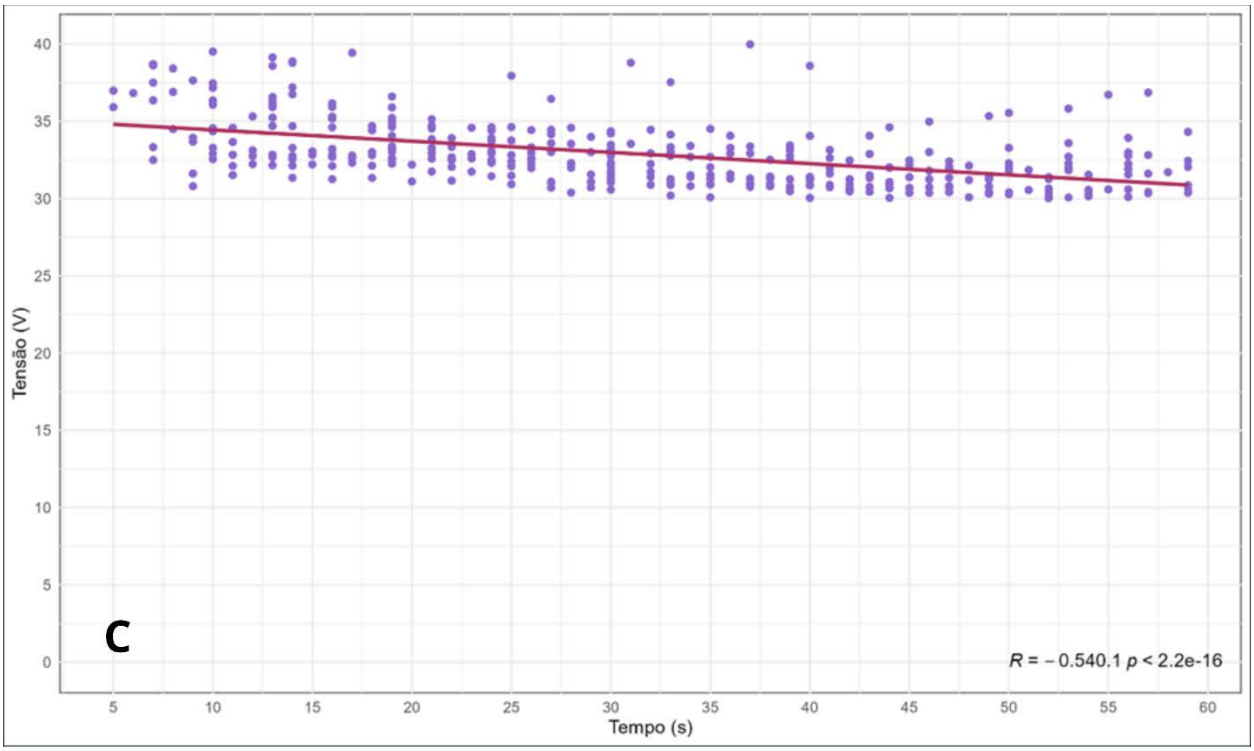
Figura 5-2 Os gráficos mostram a variação da temperatura em °C do meio RPMI (A) e DMEM (B). Observa-se que o meio DMEM apresenta mais oscilação na temperatura além de alcançar mais rapidamente os 50°C necessários para garantir uma ablação indicada no tempo x temperatura para que ocorra o dano térmico. A análise foi realizada em triplicata.

Verificou-se que com um tempo de 30 segundos, o meio de cultivo DMEM já alcança 50°C e que há uma oscilação maior da temperatura. No caso do meio de cultivo RPMI, a temperatura de 50°C é alcançada com 45 seg. O tempo máximo de aferição foi de até 150 segundos quando a temperatura de 80°C é alcançada em ambos os meios e já se aproxima a carbonização das células.

O comportamento do equipamento SOFIA® foi verificado pelas variáveis que são aferidas pelo *software* de controle do equipamento. As variáveis aferidas foram a tensão, corrente, impedância e potência. Verificou-se que o comportamento do equipamento foi estável com corrente e tensão mantendo a potência de 5W constante. A impedância dos meios também se mantém estável ao longo do procedimento, sendo necessária a constante troca das agulhas que atuam como eletrodos. Os dados são obtidos pelo equipamento a cada segundo e estão apresentados na Figura 5.3.


Impedancia (Ω)
330
315
300
285
270
255
240
225
210
195
180
165
150
135
120
105
90
75
60
45
30
15
0
A
R = – 0.430.1 p < 2.2e-16
5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
Tempo (s)


Corrente (A)
0.19
0.18
0.17
0.16
0.15
0.14
0.13
0.12
0.11
0.10
0.09
0.08
0.07
0.06
0.05
0.04
0.03
0.02
0.01
0.00
B
R = 0.290.1 p < 2.2e-16
5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
Tempo (s)



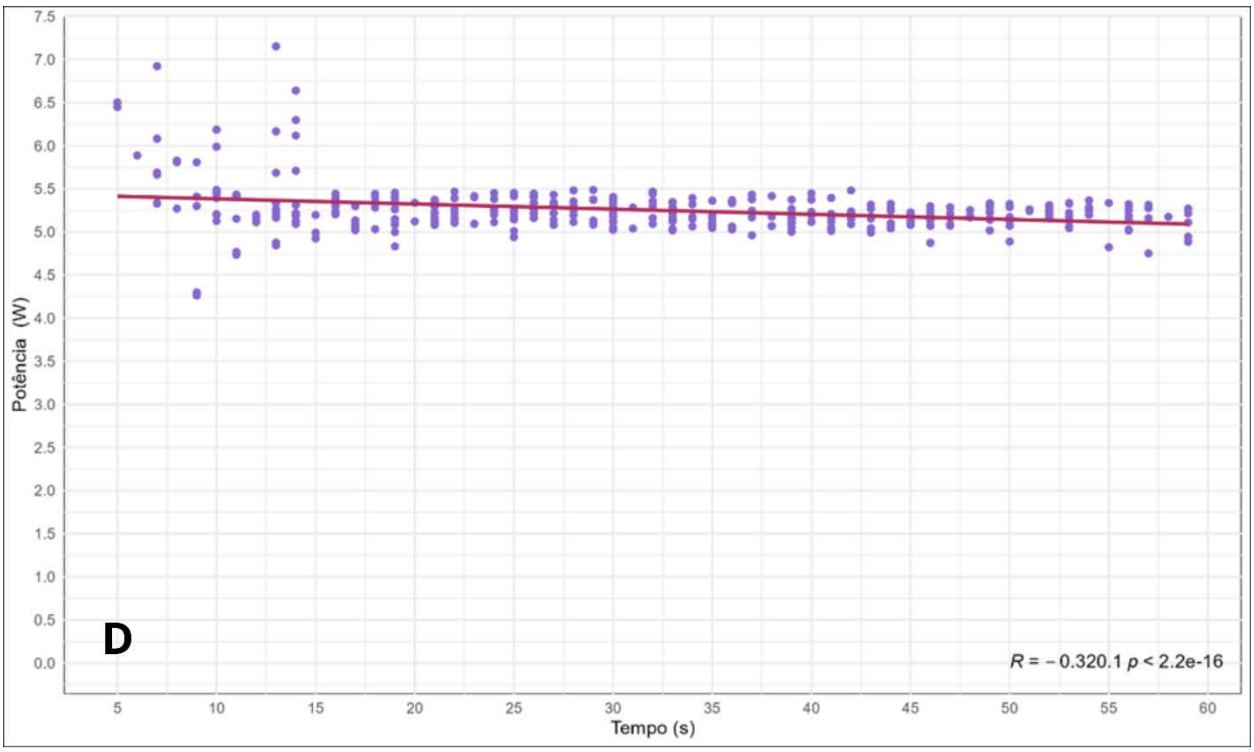


Figura 5-3 Apresentação dos gráficos de (A) Impedância em Ohms (Ω); (B) Corrente em Ampére (A) ;(C) Tensão em Volts (V); (D) Potência em Watts (W) conforme a variação dos segundos ao longo do procedimento. Os quatro gráficos foram submetidos à regressão linear simples, reta pontilhada em vermelho.

A interferência das nanoestruturas com o meio de cultivo também foi avaliada conforme a variação de concentração para o nanocompósito e as nanoestruturas de referência. E se observou que somente a variação de concentração interfere no tempo para o aumento da temperatura. Observou-se que tanto na nanoestrutura Au-cit, no GO e no GOPEI há uma queda na temperatura a partir dos 80 segundos até os 110 segundos quando imersas no meio de cultivo RPMI, conforme observado na figura 5-4. No caso do meio DMEM, figura 5.5, observou-se uma queda mais pronunciada na Au-cit, GO e GO-PEI-Au uma leve queda, no GOPEI o padrão se modificou havendo um aumento a partir de 50 segundos e tendência a um platô a partir de 90 segundos. Para cada curva foi aplicada uma análise de regressão linear simples que indicou serem as curvas significativamente diferentes entre si, mas quando comparadas posteriormente às curvas de viabilidade celular, observou-se que as alterações biológicas são isentas de outras interferências.

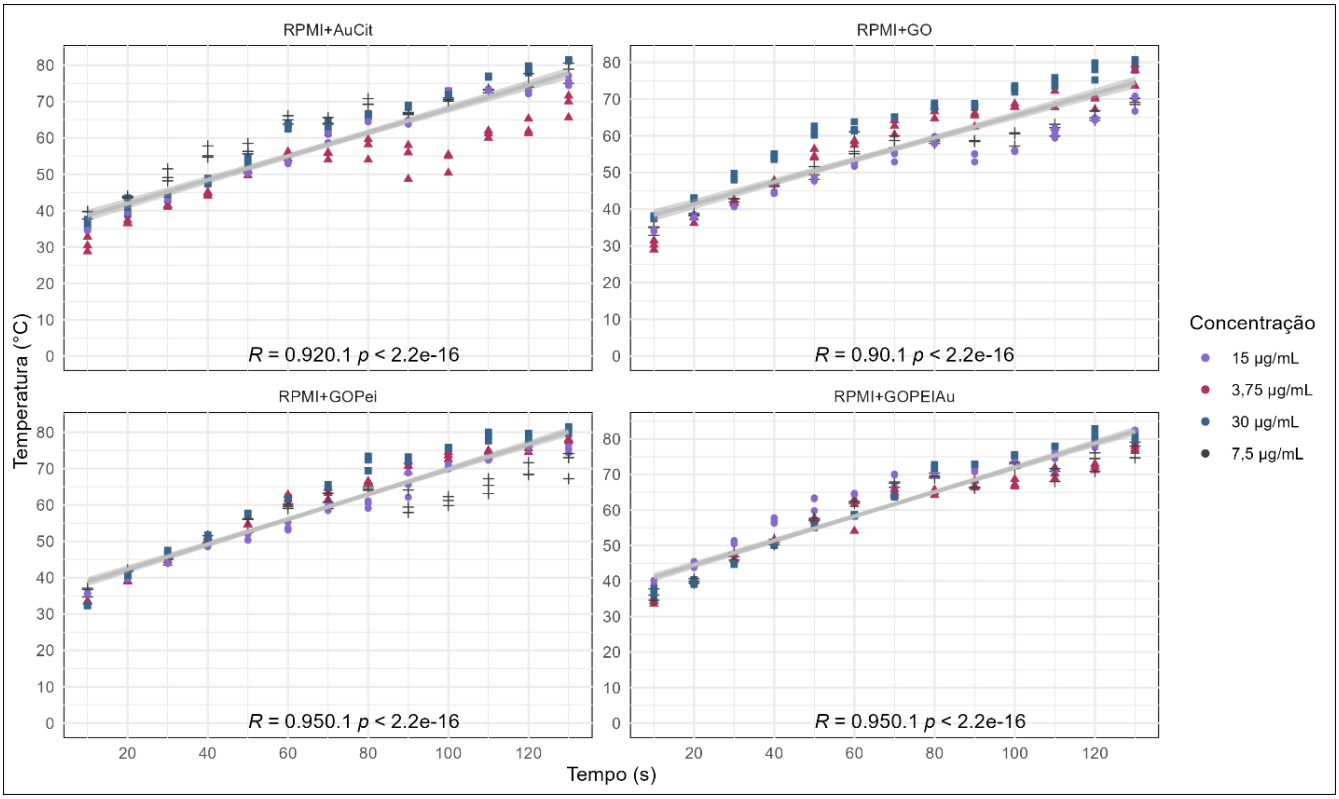


Figura 5-4 Curvas de calibração do meio de cultivo RPMI conforme a variação de concentração de cada uma das nanoestruturas (Aucit; GO; GO-PEI; Au-GO-PEI). O ensaio foi realizado em triplicata e aplicada uma regressão linear simples. Os dados são expressos com média ± erro padrão da média (*p<0,01 e ns = não significativo).

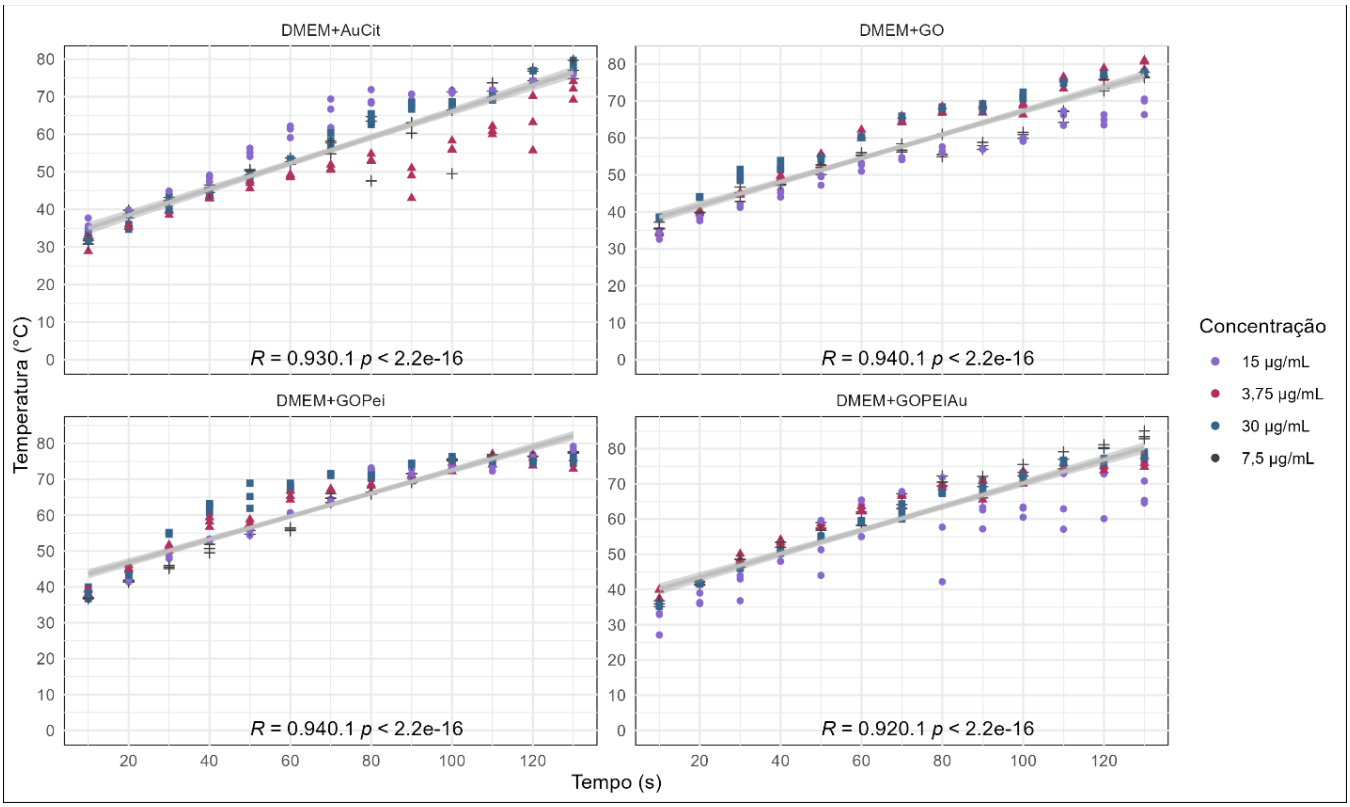


Figura 5-5 Curvas de calibração do meio de cultivo DMEM conforme a variação de concentração de cada uma das nanoestruturas (Aucit; GO; GO-PEI; Au-GO-PEI). O ensaio foi realizado em triplicata e aplicada uma regressão linear simples. Os dados são expressos com média ± erro padrão da média (*p<0,01 e ns = não significativo).

5.1.2 Ensaio de viabilidade celular

Inicialmente fez-se um estudo da toxicidade das nanoestruturas nas linhagens estudadas (LLC WRC 256, NIH-3T3) avaliando-se a viabilidade celular por ensaio de MTT nos grupos experimentais com as quatro nanoestruturas (Aucit, GO, GOPEI, GOPEIAu) em 5 concentrações, conforme (DOS SANTOS, 2017) ajustadas à concentração da solução final de 30 $\mu g.mL^{-1}$ obtida da síntese de nanoestrutura Aucit: 0,9375; 1,875; 3,75; 7,5; 15; 30 e 60 $\mu g.mL^{-1}$. Nas figuras 5.6 e 5.7 estão os valores obtidos para cada nanoestrutura, observa-se que o nanocompósito como terapia isolada para a linhagem tumoral tem baixa efetividade e baixa toxicidade na linhagem normal. Por essa razão, para a terapia combinada, escolheu-se a menor concentração para o estudo, pois não se observaram alterações significativas entre as diferentes concentrações.

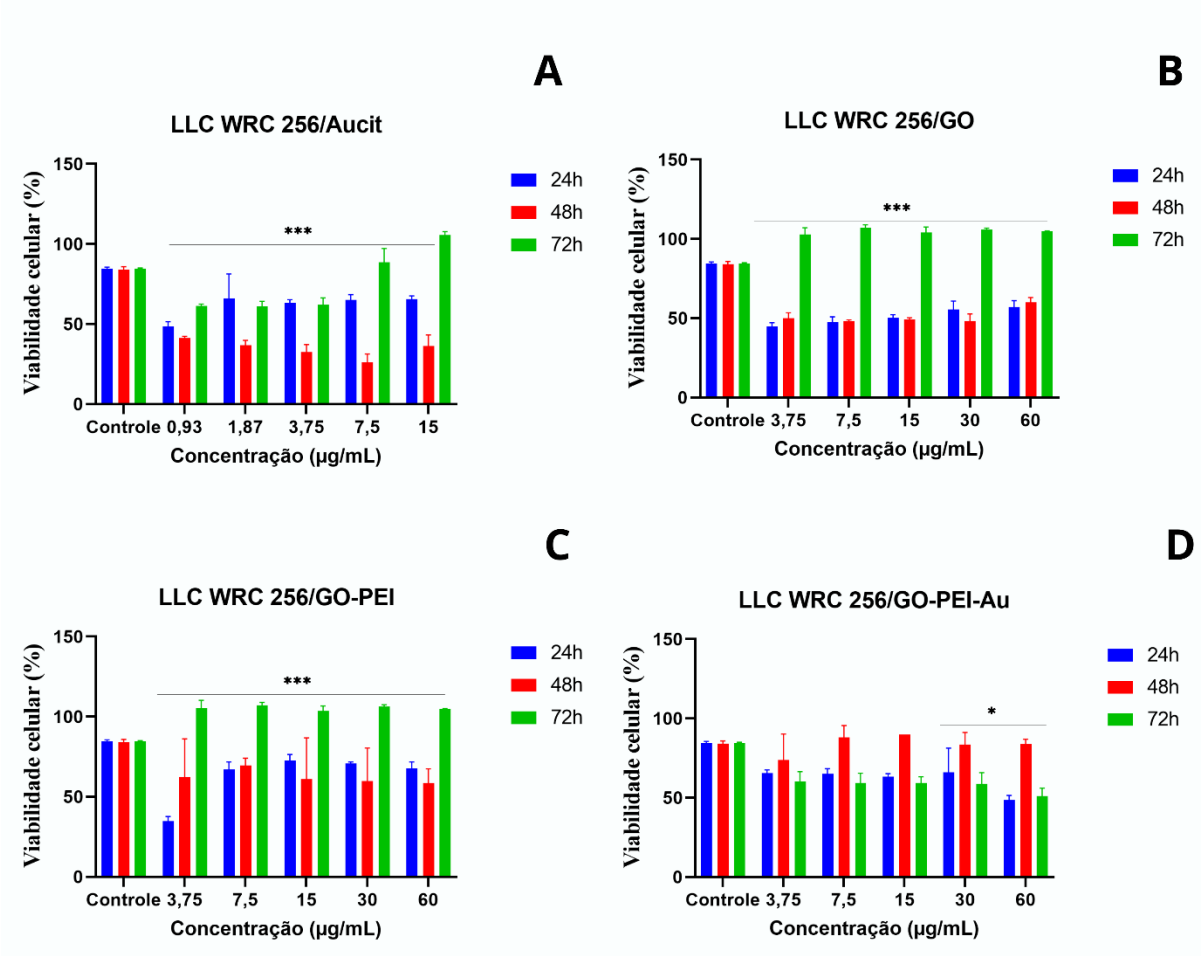


Figura 5-6 Viabilidade da linhagem tumoral LLC WRC 256 (*Walker* 256) com o nanocompósito GO-PEI-Au e as nanoestruturas de referência Aucit, GO e GO-PEI nas concentrações: 1,875; 3,75; 7,5; 15; 30 e 60 µg.mL^{-1}. No caso da nanoestrutura Aucit, a concentração da solução-mãe é 30 µg.mL^{-1} limitando sua concentração máxima a 15 µg.mL^{-1}. Os dados são expressos com média ± erro padrão da média (*p<0,01 e *** p <0,001).

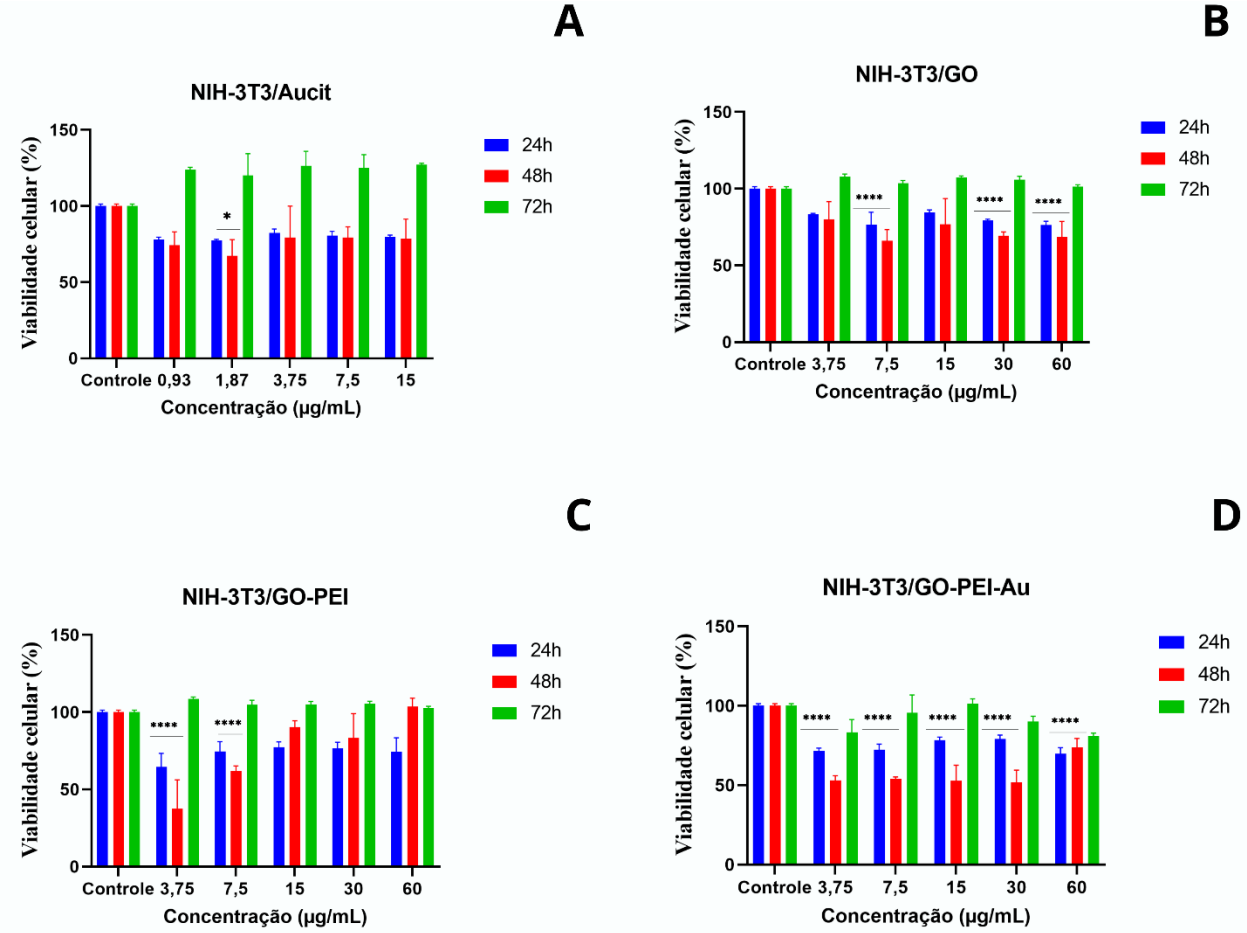


Figura 5-7 Viabilidade da linhagem normal NIH-3T3 com o nanocompósito GO-PEI-Au e as nanoestruturas de referência Aucit, GO e GOPEI nas concentrações: 1,875; 3,75; 7,5; 15; 30 e 60 µg. mL^{-1}. No caso da nanoestrutura Aucit, a concentração da solução-mãe é 30 µg.mL^{-1} limitando sua concentração máxima a 15 µg.mL^{-1}. Os dados são expressos com média ± erro padrão da média (* p<0,01 e **** p <0,0001).

Para a escolha do melhor protocolo de tratamento com RF foi realizado um ensaio com aplicação de RF por 1 a 6 minutos com cada linhagem aferindo-se a temperatura para as nanoestruturas de referência e o nanocompósito. Na figura 5-8 pode-se observar que a partir de 2 minutos há uma tendência a um platô, e com 3 minutos, o platô é estabelecido gerando uma curva assintótica, por essa razão, a escolha dos tempos de aplicação de RF para observação do tratamento foi de 1, 2 e 3 minutos.

Nas figuras 5-9 e 5-10 estão os resultados de viabilidade celular com o tratamento de 1, 2 e 3 minutos para cada linhagem celular com as nanoestruturas, observa-se um resultado bastante efetivo do nanocompósito GO-PEI-Au na terapia combinada com a linhagem tumoral LLC WRC 256 (*Walker* 256) a partir de 2 minutos de tratamento após 48h da aplicação. Todos os ensaios foram realizados com a concentração de 3,75 µg.mL^{-1} e o controle RF – tratamento somente com ARF – foi o padrão-ouro para comparação estatística.

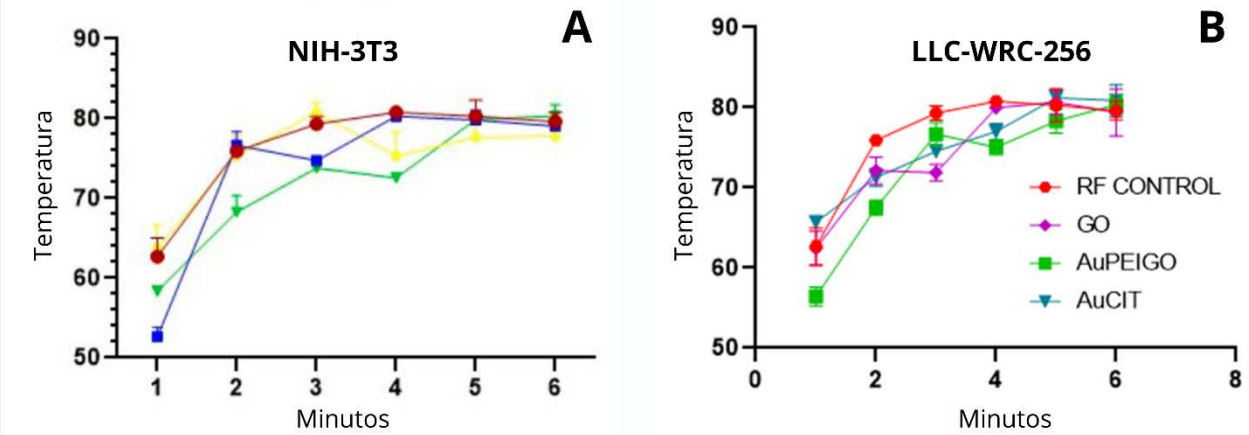
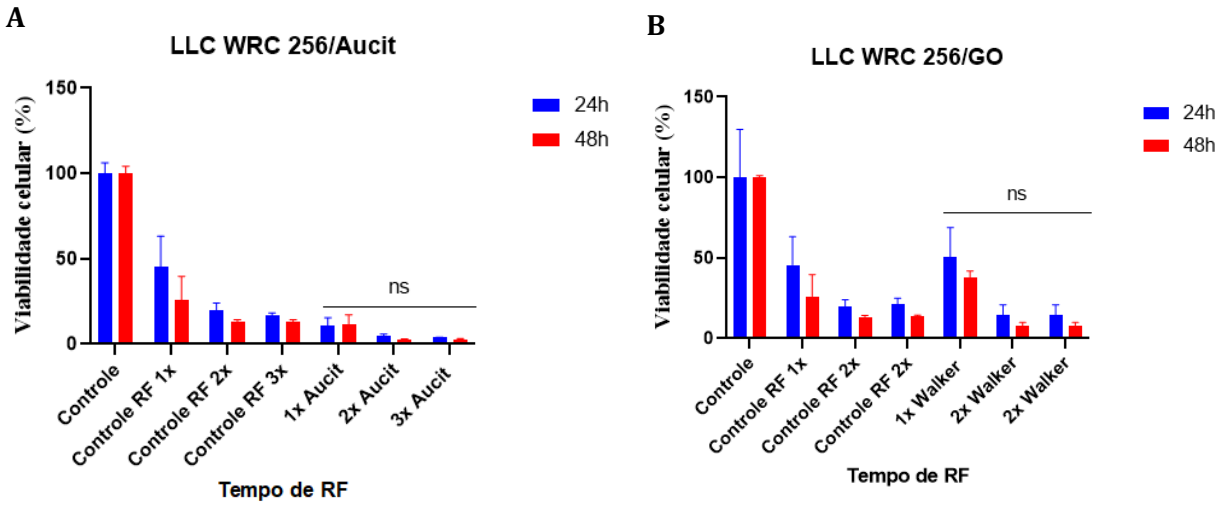


Figura 5-8 Curvas de temperatura com variação do tempo de aplicação da RF de 1 a 6 minutos. A curva (A) se refere ao meio de cultivo DMEM com a linhagem celular NIH-3T3 e a curva (B) se refere ao meio de cultivo RPMI com a linhagem celular LLC-WRC-256. Observa-se a característica assíntótica da curva.



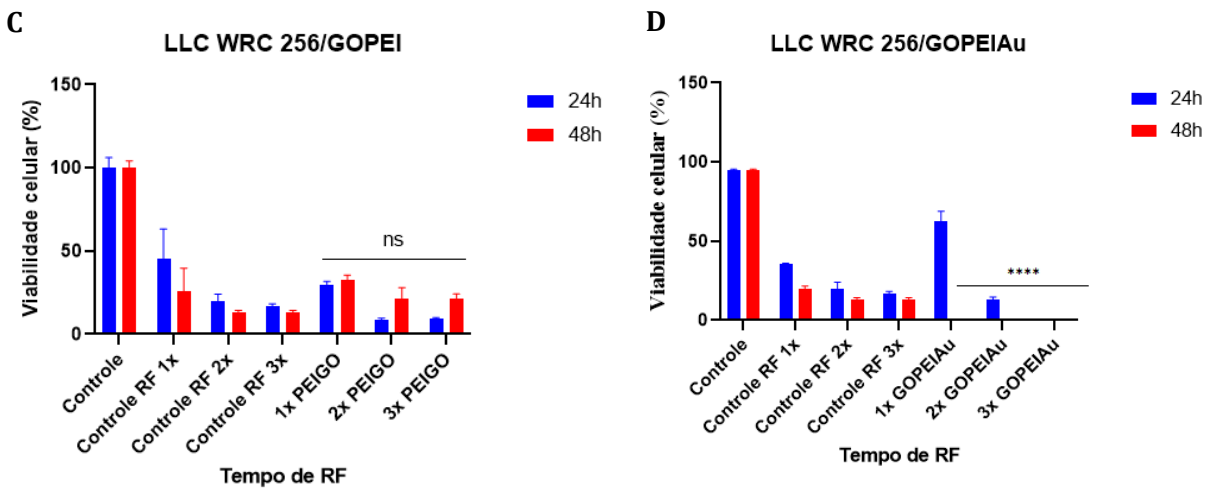
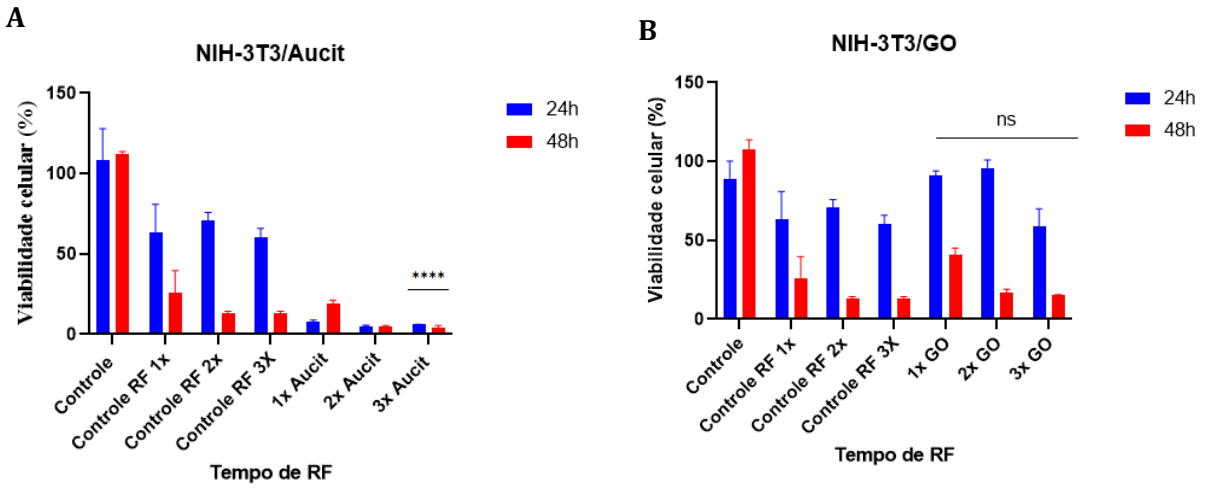


Figura 5-9 Viabilidade da linhagem tumoral LLC WRC 256 (*Walker* 256) com o nanocompósito GO-PEI-Au e as nanoestruturas de referência Aucit, GO e GO-PEI na concentração 3,75 µg.mL^{-1} com aplicação de 1, 2 e 3 minutos de RF (1x, 2x, 3x). Os dados são expressos com média ± erro padrão da média (ns – não significativo, **** p <0,0001).



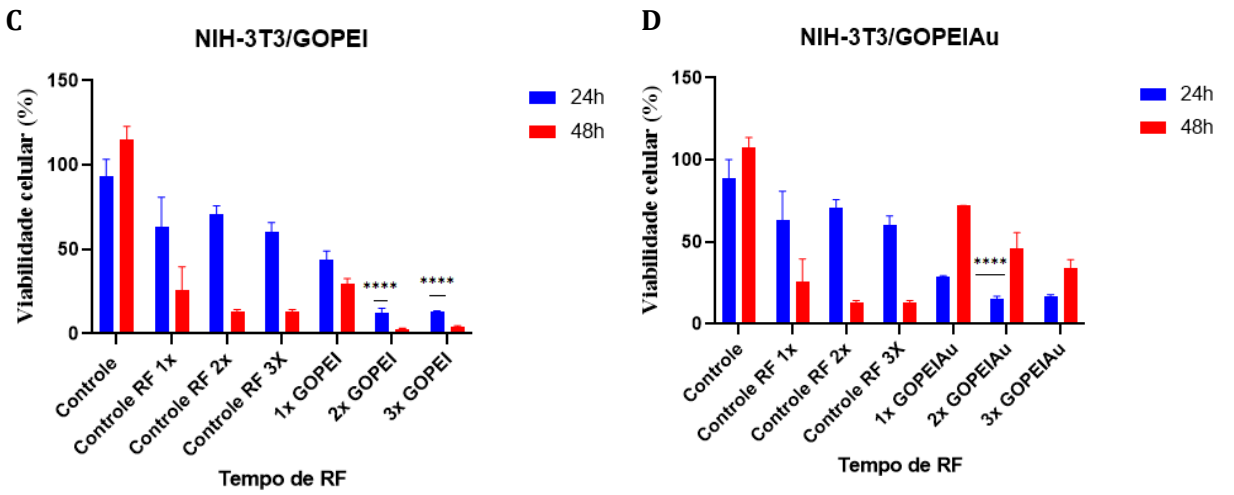


Figura 5-10. Viabilidade da linhagem normal NIH-3T3 com o nanocompósito GO-PEI-Au e as nanoestruturas de referência Aucit, GO e GO-PEI na concentração 3,75 $\mu g.mL^{-1}$ com aplicação de 1, 2 e 3 minutos de RF. Os dados são expressos com média ± erro padrão da média (ns – não significativo, **** p <0,0001).

Ao observarmos as curvas produzidas com a técnica do MTT, algumas informações são evidenciadas, o nanocompósito possui boa biocompatibilidade com as linhagens celulares estudadas e baixa toxicidade antitumoral em todos os tempos de tratamento. O mesmo pode ser observado com os nanomateriais de referência, havendo um restabelecimento populacional com 72 horas de tratamento.

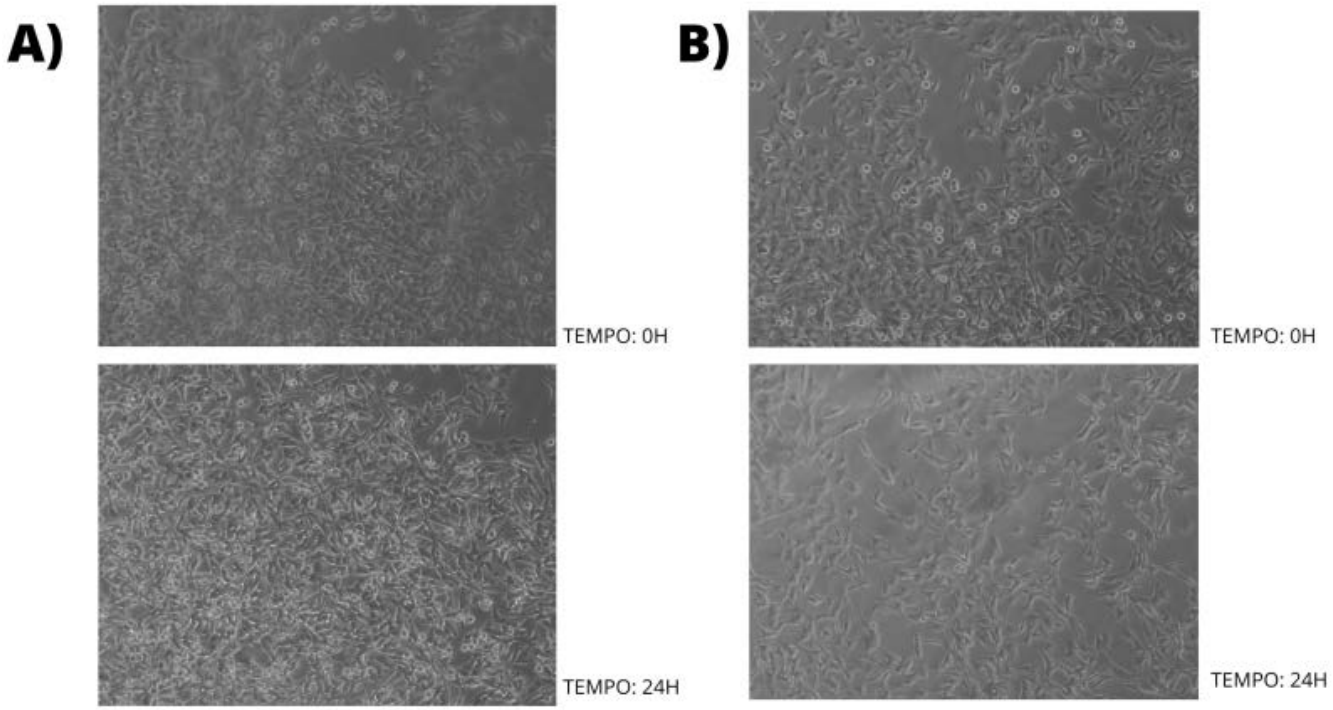
Mas, chama a atenção, o alcance da toxicidade antitumoral com a presença da RF, indicando a potencialidade do GO-PEI-Au como condutor da RF, tema promissor para estudos futuros. Em compensação, os nanomateriais de referência não apresentaram diferença significativa em comparação ao tratamento padrão-ouro da RF, sugerindo que o conjunto da plataforma de GO com PEI favorece a biocompatibilidade, conforme indicado pela literatura, e a presença do ouro como medicamento a ser conduzido até a célula por essa plataforma torna-se altamente promissora (YI et al., 2019; YANG et al., 2021).

Observou-se também, utilizando modelos matemáticos, que pelos resultados obtidos com as linhagens tumoral LLC-WRC-256 (Walker 256) e fibroblastos normais NIH-3T3 que a toxicidade do nanocompósito GO-PEI-Au foi aumentada na ordem de magnitude. Utilizando-se o modelo de Hill, sem aplicação de RF, os valores da BMD (20 µg/mL) e DL50 (23 µg/mL) são os maiores quando comparados aos nanomateriais de referência (GO, GO-PEI e Au-cit) para a linhagem celular LLC-WRC-256. Na verdade, estes valores mostram a biocompatibilidade melhorada da amostra GO-PEI-Au. No entanto, sob aplicação de RF, os valores de BMD e DL50

caem para 0,08 µg/mL e 0,10 µg/mL, respectivamente. Esta é uma redução que indica um enorme aumento na citotoxicidade, com uma redução de cerca de 99,6% na dose necessária para fornecer o mesmo nível de toxicidade celular (BMD e DL50). Também se observou a importância da polietilenoimina como vetor não-viral, fato já conhecido na literatura, no ensaio de internalização celular por MET em que houve uma redução de 24h (YANG; CHITHRANI, 2015), para a chegada do nanomaterial no núcleo celular para 6h, além de ser possível sugerir um processo de endocitose via lisossomos.

5.1.3 Observação da morfologia celular por microscopia de luz.

Após 24h de *timelapse* foi possível observar as alterações comparadas da terapia combinada de RF + GO-PEI-Au e da terapia somente com o nanocompósito GO-PEI-Au ou somente com a ARF. Observa-se que após a terapia com o nanocompósito há alterações nas células e uma diminuição pequena na população. Mas com a terapia de RF tem-se uma maior alteração das características morfológicas dessa população com surgimento de células com aspecto arredondado, o que se repete na terapia combinada RF + GO-PEI-Au, mas com uma redução populacional mais acentuada (Figura 5-11).



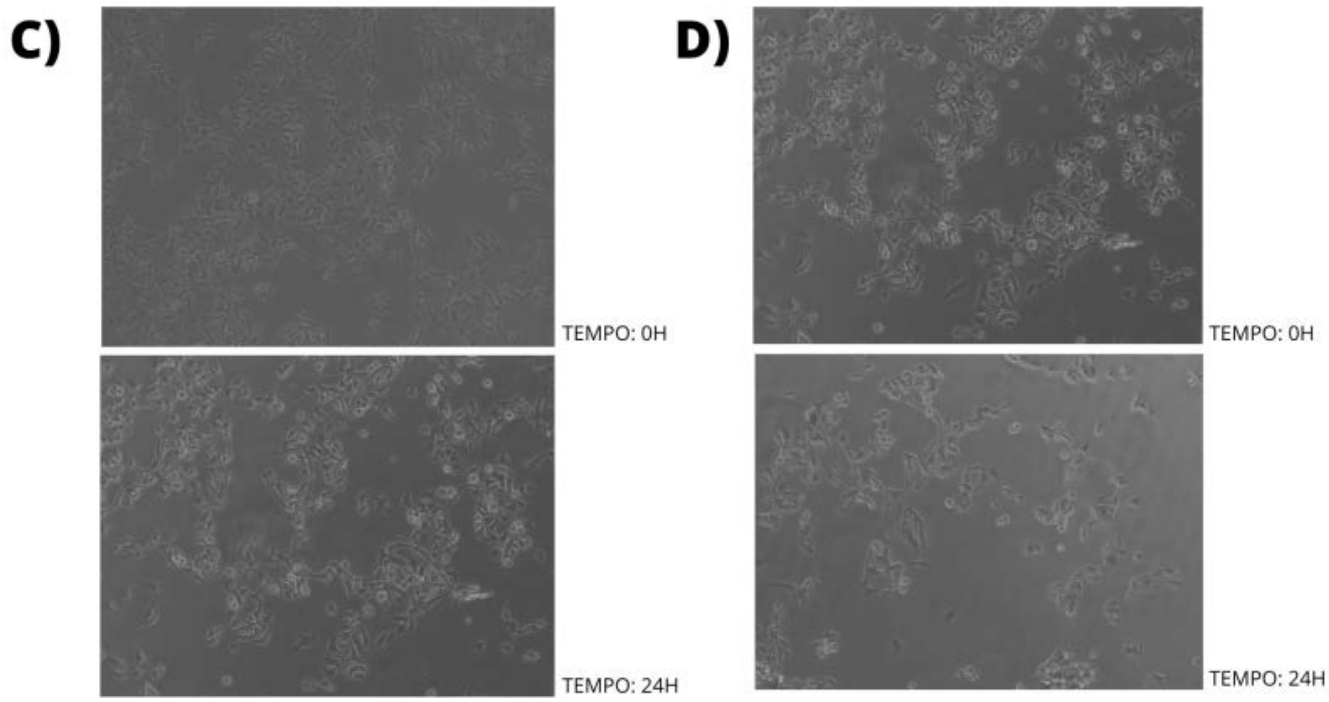


Figura 5-11 Avaliação morfológica por microscopia de luz em *timelapse* da linhagem LLC-WRC 256 (*Walker* 256) após 24h. O tempo 0h se refere ao momento imediato após a ARF e o tempo de 24h é referente a um dia após a ARF. A) Controle negativo; B) Tratamento com GO-PEI-Au; C) Tratamento com ARF; D) Terapia combinada RF + GO-PEI-Au.

Observações microscópicas ao longo de um período de 24 horas por meio do microscópio EVOS em timelapse permitiram a visualização dinâmica desses eventos. Observa-se que a aplicação da RF causa fragmentação das células e uma redução populacional significativa e sugere uma morfologia indicativa de necrose. A aplicação simultânea de nanomateriais, como o grafeno modificado com polietilenoimina e nanopartículas de ouro (GO-PEI-Au), juntamente com a exposição a radiofrequência, destaca-se como uma abordagem promissora para induzir danos celulares controlados.

A detecção de células em diferentes estágios de morte celular (apoptose, necrose) é possível por meio de microscopia de luz. Alterações na morfologia nuclear, fragmentação celular e formação de corpos apoptóticos são indicadores visuais importantes e não se observou a formação de corpos apoptóticos ao longo do timelapse (KARI et al., 2022). A população remanescente após o tratamento com GO-PEI-Au confere com os resultados obtidos no estudo de viabilidade celular, em que não há alterações significativas e com a terapia combinada é evidenciada o aumento de toxicidade pela presença de radiofrequência.

5.1.4 Análise de morfologia celular por microscopia eletrônica de varredura

Observou-se nas imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) alterações na morfologia das células com danos na superfície e perda das adesões como observado na Figura 5-12. A terapia combinada GO-PEI-Au + RF danifica as células com redução de prolongamentos celulares, perda das adesões, modificação no formato das células e presença de fragmentos celulares residuais.

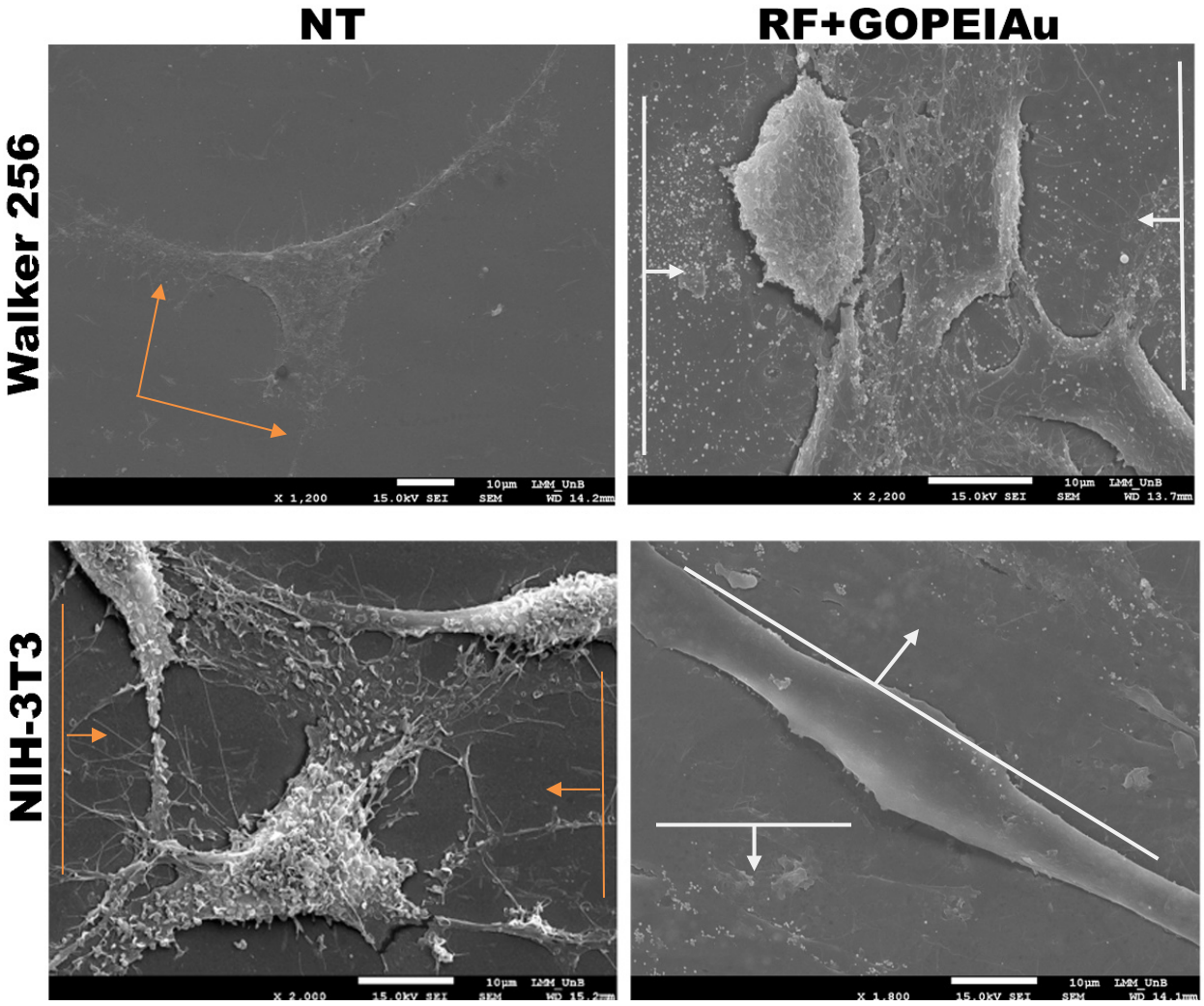


Figura 5-12 Avaliação morfológica da linhagem tumoral LLC WRC 256 (*Walker* 256) e da linhagem normal NIH-3T3, sem tratamento (NT) e com a terapia combinada (RF + GO-PEI-Au). As setas laranjas indicam a quantidade de adesões presentes nas linhagens celulares sem tratamento. As setas brancas indicam fragmentos celulares e debris resultantes da degradação celular causada pelo dano térmico.

A observação de células tumorais tratadas com o nanocompósito GO-PEI-Au combinado com radiofrequência por meio de microscopia de varredura indicaram as mudanças mais significativas na morfologia celular, como retração celular, perda de forma e alterações no tamanho. Essas mudanças podem ser indicativas de danos celulares devido ao dano térmico. O dano térmico pode causar a ruptura da membrana plasmática, levando à liberação de conteúdo

celular. Além disso, as células podem retrair-se, perdendo sua forma e estrutura normais. O aumento da temperatura pode levar à formação de bolhas e vesículas na membrana celular, indicando danos à integridade da membrana. A presença de fragmentos celulares e debris resultantes da degradação celular causada pelo dano térmico foi significativo e pode-se perceber uma grande quantidade em torno da célula detectada na imagem evidenciando o efeito tóxico da terapia combinada (BATISTA NAPOTNIK; POLAJŽER; MIKLAVČIČ, 2021; MILLER; ZACHARY, 2017).

5.1.5. Internalização do nanocompósito GO-PEI-Au por Microscopia Eletrônica de Transmissão

Observa-se na literatura (PINTO, 2013) que nanomateriais de ouro são internalizados na forma de clusters e envolvidos em vesículas, alcançando o núcleo em até 24h (KUS-LIŚKIEWICZ; FICKERS; BEN TAHAR, 2021). No caso da LLC-WRC 256, observou-se que também houve a internalização na forma de *clusters* envolvidos por vesículas em 4 horas de tratamento (Figura 5.13B,C), mas em 6 horas de tratamento as nanoestruturas alcançam o núcleo (Figura 5.13D).Pode-se supor que a presença da polietilenoimina, já conhecida na literatura como um vetor não-viral de DNA (PANDEY; SAWANT, 2016) possa ter favorecido a entrada do GO-PEI-Au reduzindo o tempo de alcance do nanocompósito ao núcleo de 24h para 6h. Na Figura 5.13A pode ser observada a célula sem tratamento.

PEIs são polímeros sintéticos derivados da polimerização de aziridina (bPEI) e da pós-modificação de polímeros precursores como poli(2-oxazolinas) ou poliaziridinas N -substituídas (lPEI). As unidades repetitivas de etilimina conferem alta solubilidade aquosa a esses polímeros e sua eficácia reside na capacidade de tamponamento de pH, onde, em ambientes ácidos, promove o inchaço osmótico do endossomo, levando à sua ruptura. Essa propriedade única protege os ácidos nucleicos transferidos da degradação lisossômica, aumentando assim a eficiência da transfecção *in vivo* (PANDEY; SAWANT, 2016).Considerando o nanossistema proposto nessa tese, o uso de óxido de grafeno associado ao PEI favorece sua biocompatibilidade e habilidade como carreador, acelerando a transferência do ouro (JIANG et al., 2017).

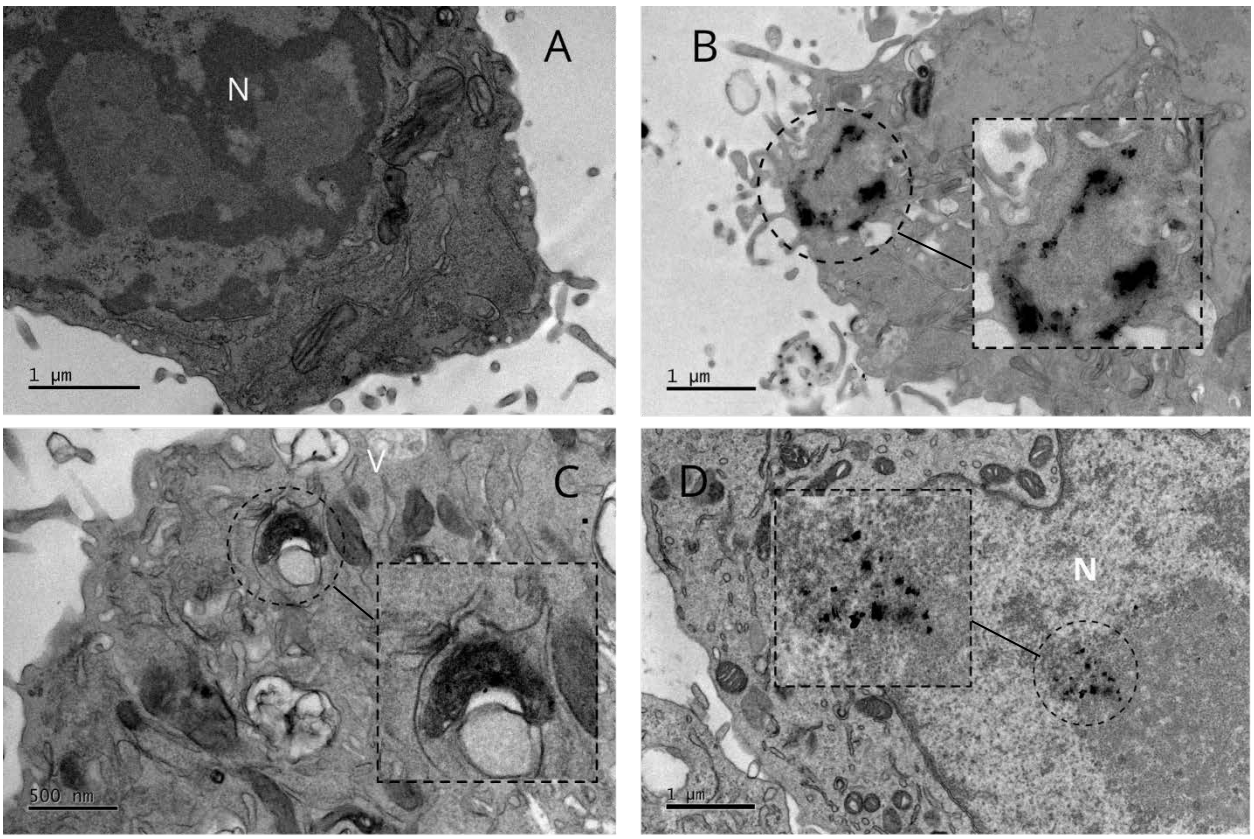


Figura 5-13 A) Célula sem tratamento. Escala 1 µm; B) Célula após 4 horas de tratamento com presença de GO-PEI-Au em vesículas, detalhe da área com GO-PEI-Au em pontilhado. Escala 1 µm; C) Detalhe de vesícula com presença de GO-PEI-Au em célula após 4h de tratamento. Escala 500 nm; D) Célula após 6 horas de tratamento com presença de GO-PEI-Au no núcleo celular no detalhe em pontilhado. Escala de 1µm.

5.1.6. Ensaio de formação de colônia e recuperação celular

Após o período de 15 dias, foi possível observar o estresse celular ao qual a célula foi submetida notando-se sua alteração morfológica. Além disso, a formação de colônias em cada grupo se apresentou de forma diversa, sendo que o tratamento conjugado mostrou-se eficiente para controlar a proliferação celular (Figura 5.14).

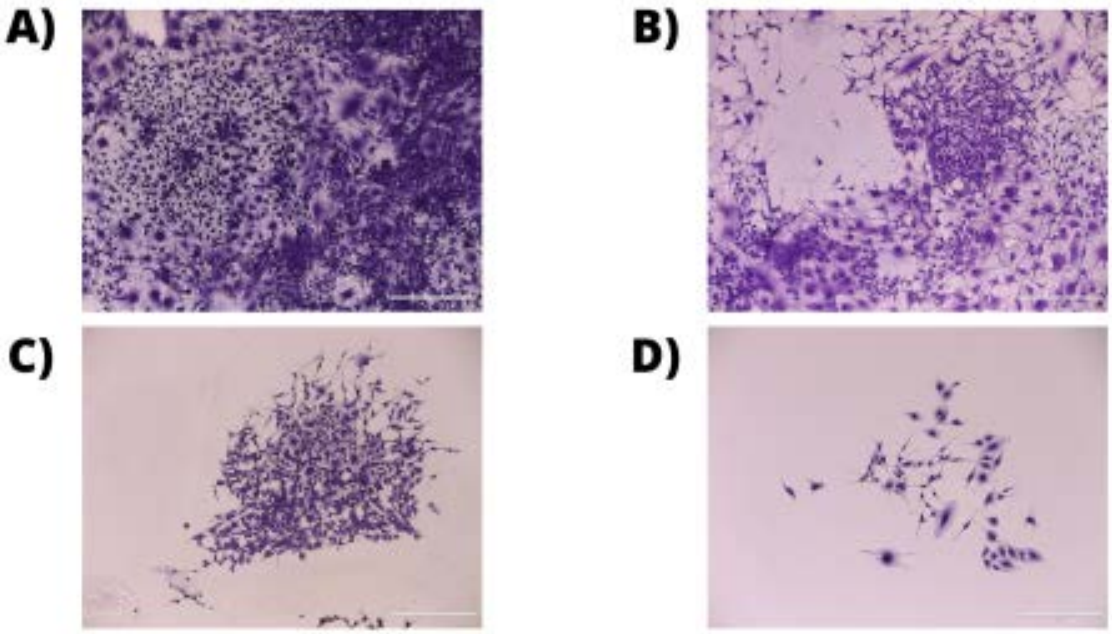


Figura 5-14 Avaliação das colônias formadas após 15 dias de replaqueamento. A) Controle; B) Tratamento com GO-PEI-Au; C) Tratamento com ARF; D) Terapia combinada de RF + GO-PEI-Au.

A terapia combinada utilizando o nanocompósito GO-PEI-Au, juntamente com a aplicação de radiofrequência, resultou em uma redução populacional notável. A microscopia evidenciou uma significativa redução na viabilidade celular e dificuldade em retornar a colônia. No caso do tratamento com RF, houve um retorno de uma pequena colônia, mas ainda assim bem reduzida, no entanto, com a terapia combinada, a pequena colônia formada ainda teve dificuldades em se estruturar indicando uma redução na capacidade de adesão entre células (SANJAI et al., 2024).

5.2 Resultados com a Fase *ex vivo*

Conforme já explicitado na metodologia, as nanoestruturas inicialmente envolvidas com os experimentos *ex vivo* são GO, AuNP-PEI – 10x e GO-PEI-Au. Análises foram realizadas com os resultados obtidos com o fígado suíno como a avaliação do volume de ablação final, da variação de temperatura, impedância e tempos de *roll off*.

A partir dos resultados, observou-se a interferência das nanopartículas sobre a impedância do tecido hepático suíno, causando um aumento dessa variável o que resultou em uma antecipação do *roll off* e consequente redução do volume de ablação (Figura 5.15). A redução da impedância do tecido favorece a transferência de energia e consequente aumento

na temperatura de forma a causar o dano térmico suficiente para necrose. Assim, o aumento na impedância sempre terá um efeito negativo impedindo essa transferência.

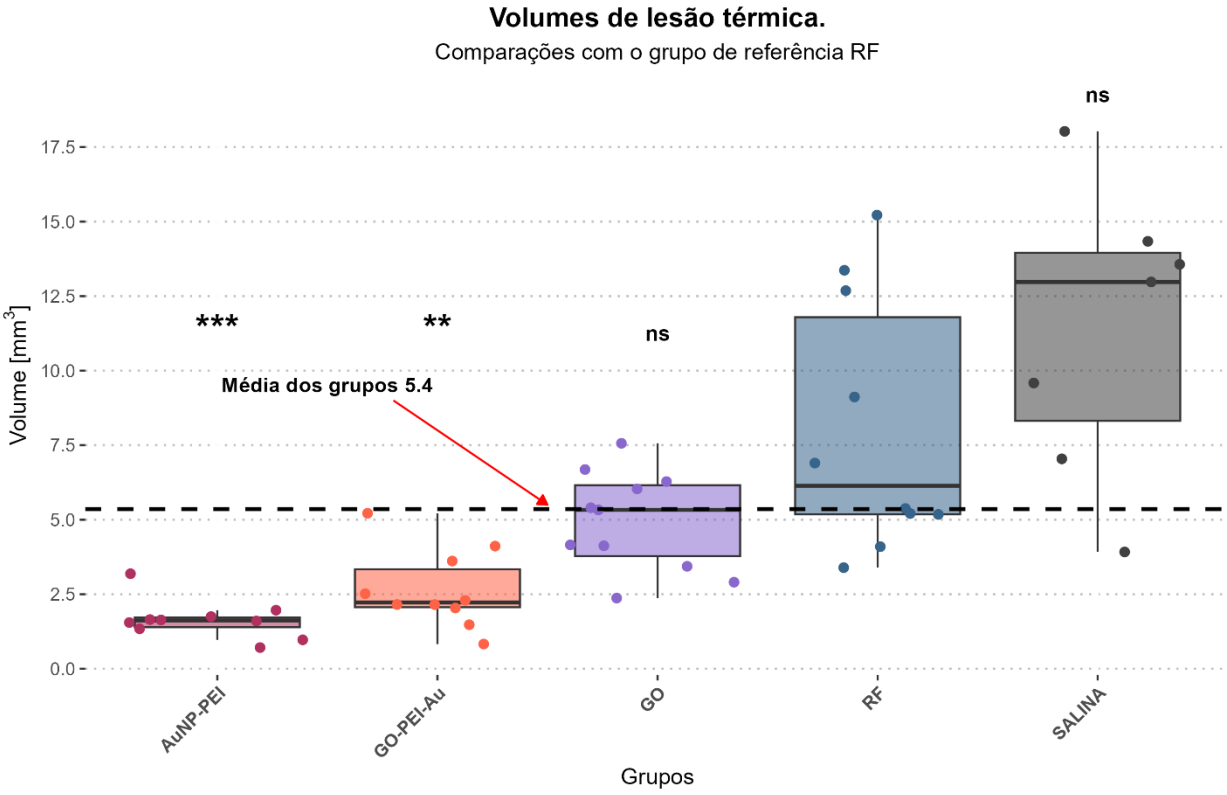


Figura 5-15 A análise em boxplot da variação do volume de ablação permitiu comparar a interferência das nanopartículas sobre a produção da ablação. Entre as nanoestruturas, o melhor volume obtido é o da nanoestrutura GO, mas em comparação ao resultado obtido pela RF pura e a solução salina, verifica-se que a diminuição do volume obtido foi significativo. GO; AuNP-PEI – 10x; GO-PEI-Au. RF: Radiofrequência somente; ns: não significativo; ** p< 0,05; ***: p <0,005.

Concluiu-se que algumas características das nanoestruturas geraram esse resultado, como a interferência sobre a condutividade térmica e elétrica das células de forma positiva, ou seja, melhorando essas condutividades, mas o que inicialmente é positivo tornou-se um fator impeditivo de gerar a ablação, porque o tempo para a transferência de energia foi muito curto. Na Figura 5.16, observam-se as temperaturas mínimas e máximas obtidas com cada nanoestrutura indicando que a nanoestrutura GO já se inicia com uma temperatura próxima à RF, mas o alcance da temperatura máxima é diminuído devido ao impacto na transferência de energia. Já a nanoestrutura AuNP PEI – 10x é bastante prejudicada sendo o pior resultado.

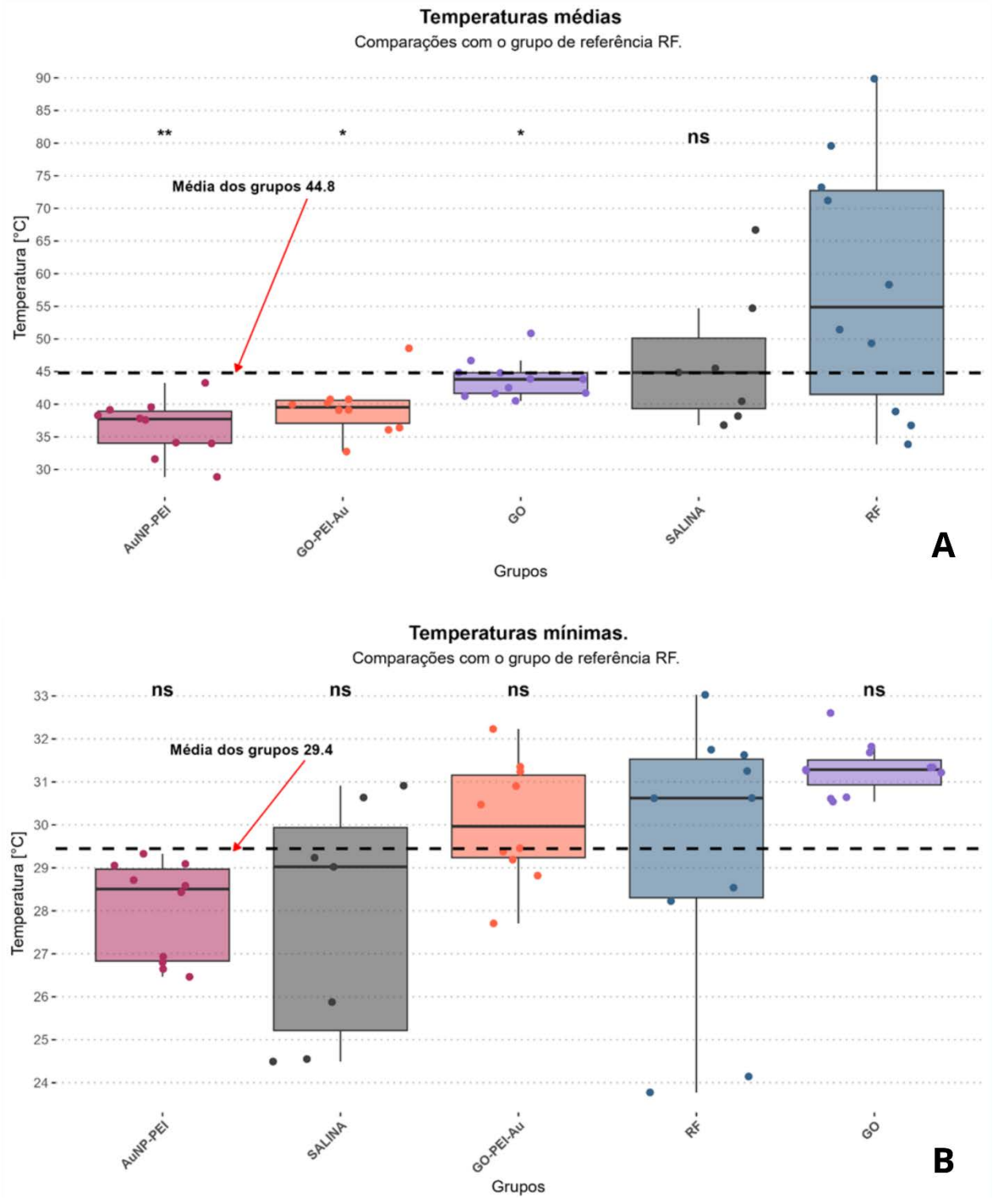
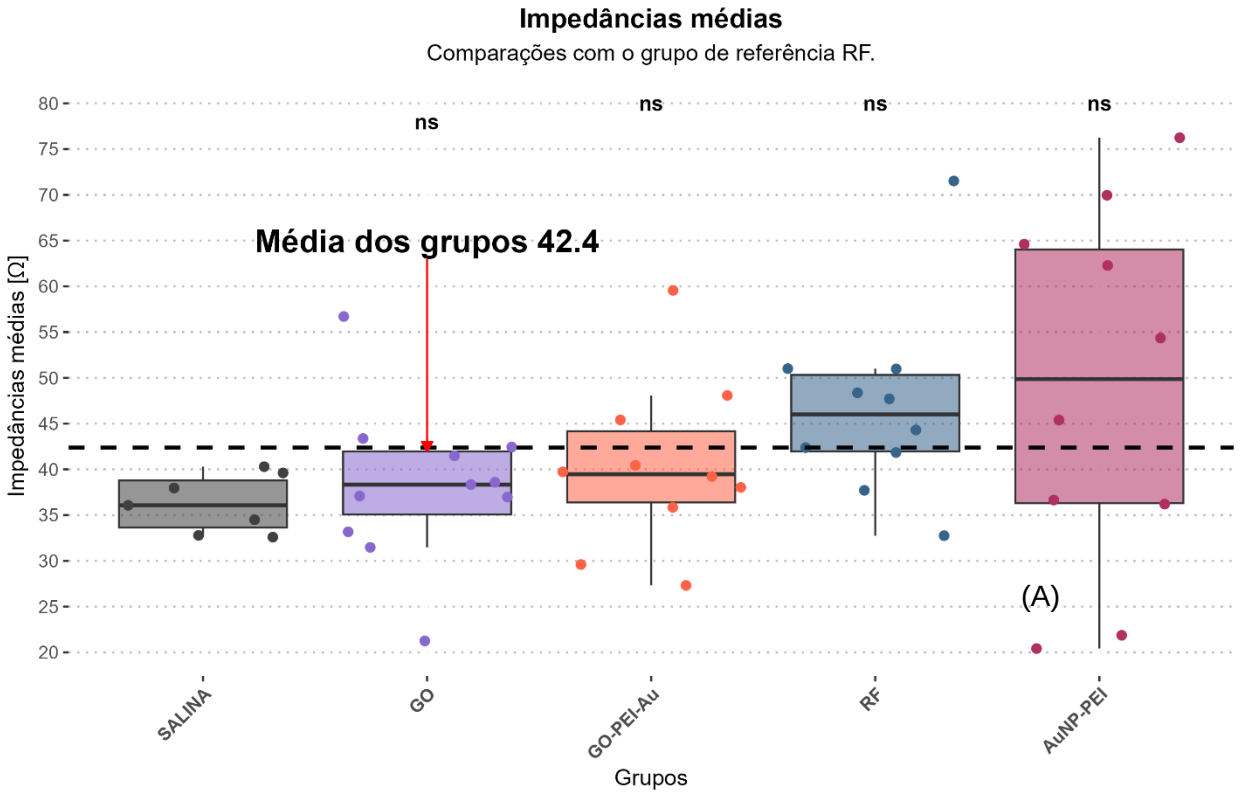


Figura 5-16 Avaliação da variação de temperaturas médias (A) e mínimas (B) para cada grupo experimental em comparação a cada grupo controle – RF e SALINA. Observa-se que a temperatura inicial da nanoestrutura GO é maior que o grupo controle RF, mas a temperatura média é reduzida. Já o comportamento da nanoestrutura AuNP- PEI – 10x é bastante prejudicado com uma baixa elevação da temperatura mínima e média. GO; AuNP-PEI – 10x; GO-PEI-Au. RF: somente RF; SALINA: RF + soro fisiológico; ns: não significativo; * p< 0,5; ** p< 0,05.

Por fim, o resultado obtido a partir das análises de impedância e *roll off* e observado na Figura 5.17, confirma a interferência das nanoestruturas sobre a condutividade térmica e elétrica, além das diferenças entre as nanoestruturas. A nanoestrutura AuNP PEI – 10x causa um aumento bastante significativo na impedância do tecido do fígado suíno, já a nanoestrutura GO tem um resultado bem melhor, e também na literatura já se conhece a boa interação entre as nanopartículas de grafeno com a RF (NGUYEN et al., 2016); BEYK; TAVAKOLI, 2019). Esse resultado favorece o uso do polímero PEI para anexar o Au ao GO, mas não como revestimento do Au, assim como positiva o uso do GO como condutor de energia para o nanossistema formado.



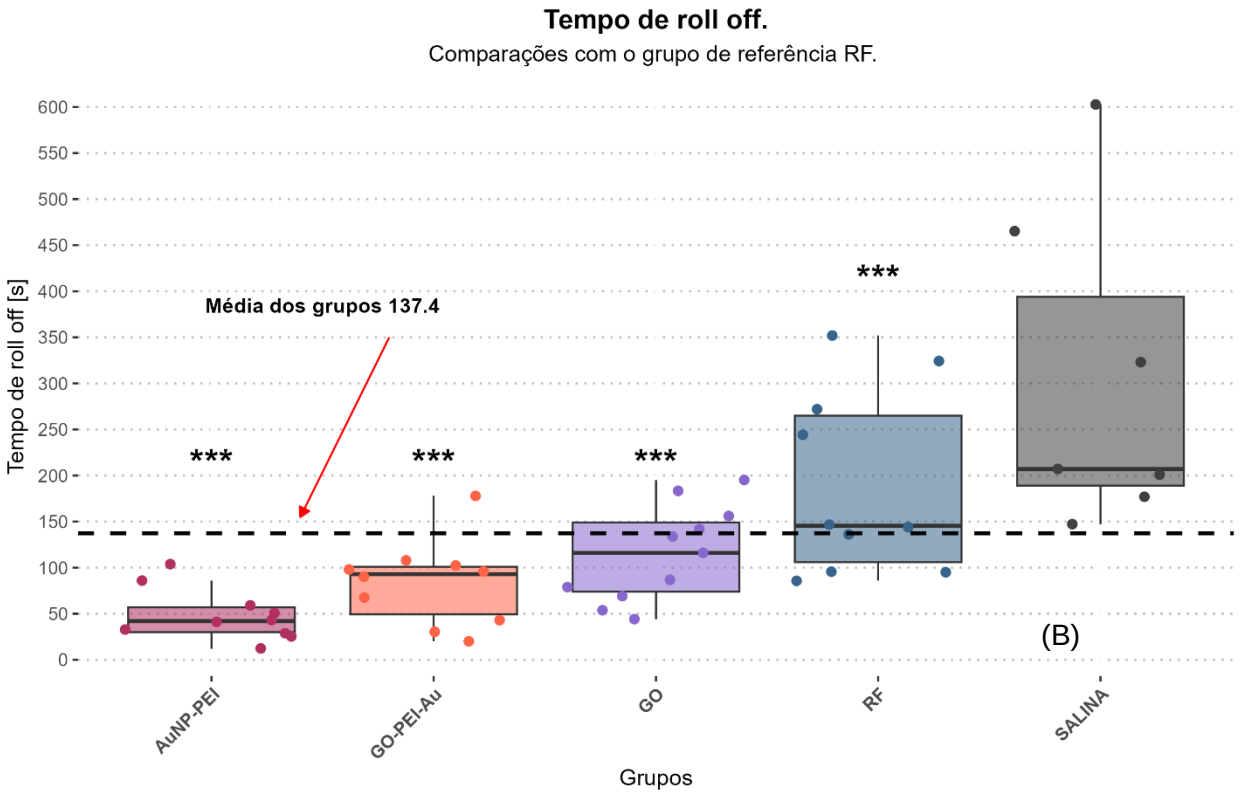


Figura 5-17 Na figura (A) observa-se a interferência das nanoestruturas na impedância e na figura (B), o efeito no *roll-off*. AuNP-PEI – 10x; GO-PEI-Au; GO; RF; SALINA: RF + soro fisiológico; ns: não significativo; ***: p <0,005.

.

Também é evidenciado o resultado já conhecido na literatura (DA FONSECA et al., 2019) da interferência da presença da solução salina no retardo da resposta do *roll off* que quando comparado à diminuição da impedância confirmam esse resultado. Mas, uma observação geral nos resultados, inferem uma interferência direta na condução da energia resultando em aumento rápido da impedância pelas nanoestruturas gerando um resultado inferior de área de ablação em comparação aos dos grupos controle RF e Salina, já que a literatura nos fornece informações de que as nanoestruturas metálicas são promissoras na interação com a RF (NGUYEN et al., 2016; MIRONAVA et al., 2017), o fato do tecido no ensaio *ex vivo* estar morto e haver maior volume da solução de nanoestruturas com o eletrodo pode ter interferido de forma negativa. Considerando que não foram identificadas variações ou desvios nas variáveis como tempo, temperatura inicial ou peso das amostras, o questionamento volta-se para a interferência das nanoestruturas nas variáveis biofísicas das células do tecido hepático. O resultado quantitativo obtido na redução da impedância ressalta a importância da polietilenoimina estar associada ao óxido de grafeno na forma do nanocompósito (GO-PEI-Au) para favorecer a condutividade elétrica reduzindo a impedância em 10 Ω quando comparado ao nanomaterial (AuNP-PEI) e em 7 Ω quando

comparado à aplicação da RF somente, indicando a vantagem de o ouro estar ligado ao polímero na plataforma de óxido de grafeno.

Observou-se que a suspensão de nanomaterial interfere também na formação da área de ablação reduzindo-a significativamente de 12,5 mm^3 a 2,5 mm^3. Esse resultado quando comparado ao resultado *in vitro*, observa-se que a presença de células vivas favorece a absorção desse nanomaterial, reduzindo sua presença no meio extracelular sugerindo sua provável intensificação no fluxo da corrente elétrica de tal maneira que no caso do ensaio *ex vivo* não permite que haja tempo suficiente para a ablação do tecido, fornecendo embasamento para a criação de modelos matemáticos que permitam transladar resultados ex vivo para embasar planejamentos experimentais *in vitro* e *in vivo* de forma mais eficiente.

5.3 Resultados com a Fase *in vivo*

Para consolidação do modelo *in vivo* com células ascíticas foi realizado um teste-piloto com as células obtidas na Universidade Federal do Paraná. Para que o processo de ablação ocorra com sucesso é necessário que um volume mínimo de tecido permita a inserção da extensão do eletrodo *Cool Tip* da Covidien, além de ser necessário utilizar um tamanho de corpo de animal suficiente para a transferência de energia o que influenciou diretamente a escolha do modelo animal. Utilizou-se um grupo de 5 animais para avaliar a relação tamanho tumoral obtido após a inoculação no flanco direito. Observou-se uma variação de tamanho entre 1,5 mm^3 a 4,5 mm^3 e fez-se a ablação com o eletrodo *Cool Tip* (*Covidien*) até que houvesse a carbonização externa do tumor. Após as cinco repetições, verificou-se uma variação de 8 a 12 minutos conforme o volume tumoral.

Para o ensaio de sobrevida e de eficácia, os procedimentos de ablação foram realizados todos no mesmo dia. Após os animais estarem anestesiados com cetamina (100 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg) inoculou-se 0,25 mL da solução de GO-PEI-Au (0,075 µg/mL de Au), aguardou-se 20 minutos para internalização conforme literatura (PINTO, 2013) e realizou-se a ARF, aplicando-se meloxican (1 mg/kg) logo após o procedimento. Os animais foram acondicionados novamente no biotério para recuperação da anestesia.

Observou-se que a recuperação dos animais foi típica de um pós-cirúrgico com prostração no dia posterior e consequente recuperação ao longo dos 3 primeiros dias. Esse fato corroborou com rotina de alimentação como indicada da figura 5-18, além de uma curva mais

pronunciada na quantidade de ração pelos animais que sofreram ARF. Também não se observaram alterações discrepantes no peso dos animais ao longo do estudo de sobrevida.

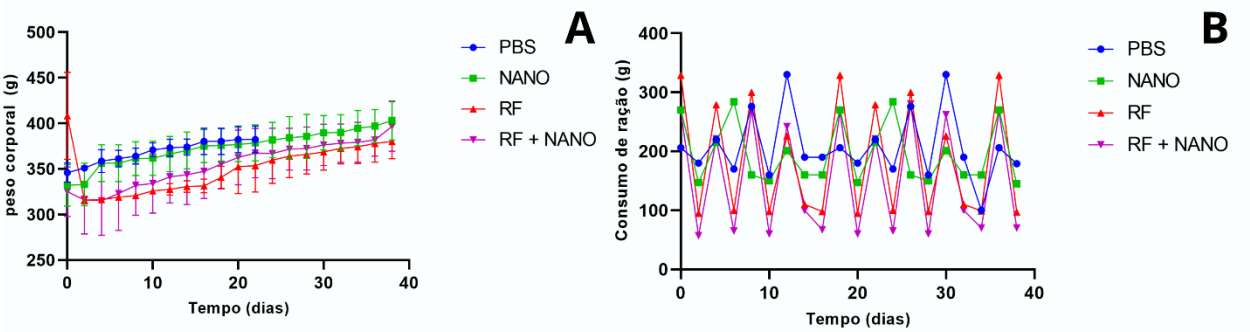


Figura 5-18 Em (A) observa-se a variação do peso da ração dos animais. Observou-se os grupos tratados com a RF tiveram maior consumo de ração. Em (B) pode-se verificar que não houve alterações significativas entre os grupos experimentais.

Na figura 5.19, pode-se observar que houve uma antecipação da redução do volume tumoral no grupo experimental da terapia combinada de RF NANO em 10 dias em comparação aos outros dois grupos com somente o nanocompósito GO-PEI-Au (GRUPO NANO) e somente a ARF (GRUPO RF). Quanto à taxa de sobrevivência, observou-se no grupo RF NANO, 100% de sobrevivência para 80% de sobrevivência nos grupo RF e NANO. Também, observou-se macroscopicamente uma resposta inflamatória menos pronunciada no grupo experimental da terapia combinada conforme observado nas imagens da letra C da figura 5-19.

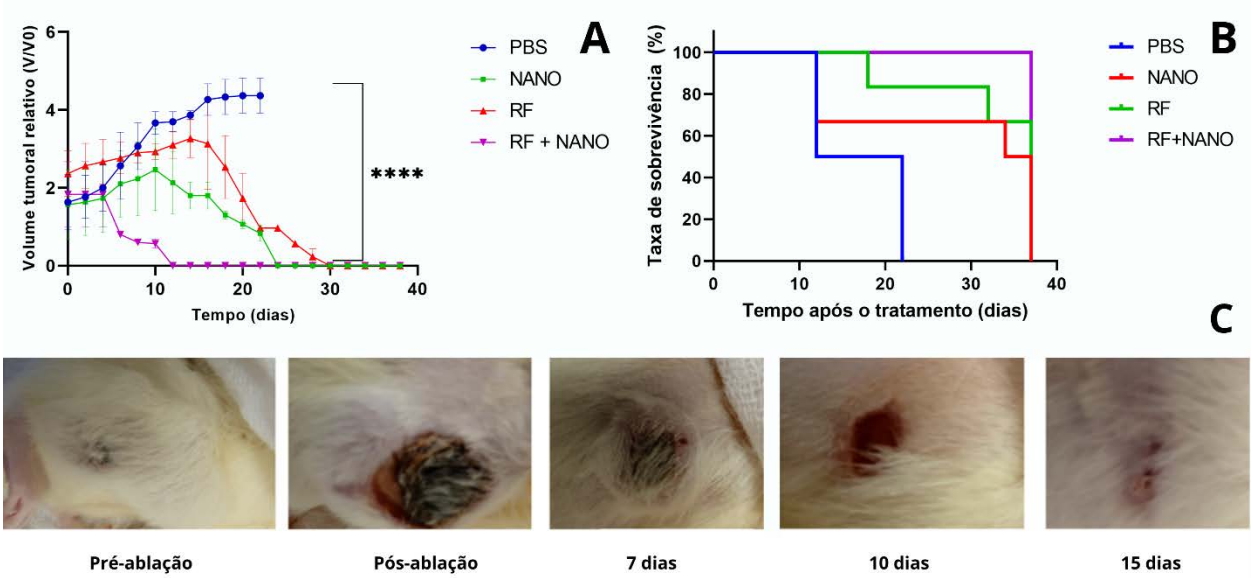


Figura 5-19 Observação da remissão tumoral relativa com a linhagem *Walker* 256 no estudo de Sobrevida ao longo de 38 dias. Em (A) é apresentado o gráfico do volume tumoral relativo em até 38 dias de ensaio, a eutanásia dos animais ocorreu conforme a sintomatologia e crescimento tumoral. Os animais do grupo PBS foram todos

eutanasiados em até 22 dias devido ao tamanho tumoral. Na letra (B) é apresentada a curva de sobrevida indicando a taxa de 100% de sobrevivência do grupo RF NANO. Na letra (C) pode-se observar a remissão tumoral do grupo RF + NANO em um dos animais representantes ao longo de 15 dias após o tratamento. Diferença significativa: **** p<0,0001.

A ablação por radiofrequência é um tratamento que causa um aumento da temperatura local para a ablação tumoral e por alcançar temperaturas acima de 50°C gera um processo inflamatório já bem descrito na literatura (JANSEN et al., 2010; VAN DEN BIJGAART et al., 2021). Também é observado que esse processo inflamatório estimula vias de proliferação metastáticas e angiogênicas sendo o fator de recidiva que ocorre no local da ablação (IKEMOTO; SHIMADA; YAMADA, 2017; MARKEZANA et al., 2021). Outro fator causador de uma provável recidiva local é uma ablação incompleta, fato bem descrito nesse tipo de tratamento devido à limitação do volume de ablação *versus* as características assimétricas de um tumor, sendo comum a sobrevivência de células em pequenas regiões que não foram alcançadas pela ablação (YANG et al., 2021), além da distribuição heterogênea da transferência de energia entre as células e que permitem gerar o calor local (MARKEZANA et al., 2021) . Como o resultado observado com o ensaio sobrevida mostrou uma antecipação da remissão tumoral, surge a hipótese de uma morte celular imunogênica causada por uma necrose pós-ablação incompleta no grupo RF+NANO, o que permite sugerir a hipótese do favorecimento da presença do PEI na estrutura do GO-PEI-Au para a redução tumoral completa observada por sua interferência na atividade imunológica como já relatado pela literatura (YIN et al., 2021).

5.3.1 Resultados clínicos, bioquímicos e hematológicos.

Os resultados provenientes das análises bioquímicas realizadas no grupo de sobrevivência (conforme apresentado na Tabela 5.1) indicam que apenas o grupo experimental PBS manifestou alterações significativas em suas enzimas hepáticas TGO/AST e TGP/ALT (apesar de não significativa). Essas modificações podem ser atribuídas, muito provavelmente, à agressividade característica do tumor Walker 256. Notavelmente, os animais desse grupo apresentaram níveis de caquexia entre 3 e 4, evidenciando alterações na coloração das orelhas e olhos, pelagem arrepiada, ocorrência de diarreia, bem como sintomas no momento da eutanásia, como dor e dificuldade de locomoção devido ao tamanho tumoral no flanco. Em contrapartida, os animais pertencentes aos três grupos tratados (NANO, RF e RF NANO) concluíram o período de 38 dias exibindo uma aparência saudável e níveis de atividade normais.

Os resultados do leucograma e eritrograma revelaram valores com alterações significativas nos leucócitos, indicando a presença de um processo inflamatório que pode

aumentar o risco de recidiva. Contudo, ao analisar os grupos tratados com RF, observa-se que o acompanhamento pós-ablação inclui a administração de antibióticos para controlar a infecção e o processo inflamatório intenso (VAN DEN BIJGAART et al., 2021; ABDALLA et al., 2023). No entanto, é importante destacar que o grupo NANO exibiu um padrão semelhante, evidenciando a necessidade de futuros estudos para compreender mais profundamente o papel do nanocompósito no processo inflamatório.

Tabela 5.1 Parâmetros hematológicos (leucograma e eritograma) e análise bioquímica das enzimas renais e hepáticas dos grupos experimentais do ensaio de sobrevida.

PARÂMETROS	SADIO	PBS	RF	NANO	RF + NANO
RBC mm^3	7,78 ± 0,3	7,53 ± 1,4	7,9 ± 1,7	7,92± 0,6	8,7 ± 0,1
HGB g/dL	15,5 ± 0,8	15,02 ± 2,6	15,6 ± 3,2	16,4 ± 2,6	17,1 ± 0,5
HCT (%)	42,5± 2,1	42,7 ± 4,9	43,1 ± 7,8	44,4± 5,5	45,6 ± 1,1
VCM (fL)	54,7± 2,5	57,8 ± 6,0	54,6 ± 2,8	56,4 ± 2,2	52,6 ± 1,2
HCM (pg)	19,9 ± 0,4	20,02 ± 0,8	19,7 ± 0.8	20,4±0.5	19,6 ± 0,7
CHCM (g/dL)	36,6 ± 1,6	32,9 ± 2,5	35,9 ± 36,1	36,8 ± 1,9	37,3 ± 0,5
Leucócitos ($x10^3$ µL)	2,2 ± 0,4	4,1 ± 0,4*	5,6 ± 3,1*	4,1 ± 2,1*	5,6 ± 2,5*
Plaquetas ($x10^3$ µL)	879,6 ± 149,8	943 ± 94,4	1023 ± 134,4	942,5 ± 149,1	1052 ± 76,9
TGP/ALT	57,25 ± 1,11	64,5 ± 2,25	48,00 ± 1,7	53,00 ± 1,2	56,00 ± 1,9
TGO/AST	139,75 ± 53,00	193,33 ± 22,5*	140,50 ± 31,00	139,50 ± 0,03	131,7 ± 23,0
GAMA-GT	1,5 ± 1,2	1,4 ± 1,2	1,6 ± 1,6	1,56 ± 0,8	1,45 ± 1,2
CREATININA	0,6 ± 0,02	0,7 ± 0,07	0,53 ± 1,12	0,62 ± 0,02	0,68 ± 1,4
FOSFATASE ALCALINA	184 ± 18,30	172,70 ± 31.2	173 ± 6,50	174 ± 2,30	178 ± 0,70
BILIRRUBINA	0,58 ± 0,24	0,60± 0,54	0,65 ± 17,1	0,59 ± 0,87	0,57 ±1,79
ÁCIDO ÚRICO	154.5 ± 15.10	169.2 ± 4.5	167 ± 3.39	157 ± 13.1	155 ± 3.9
URÉIA	45.55 ± 0.75	65.3 ± 0.10	46.65 ± 0.20	35,2 ± 1,31	45.7 ± 0.23

LEGENDA: RBC: Glóbulos vermelhos; HGB Hemoglobinas; HCT Hematocrito; VCM: volume corpuscular médio, HCM: hemoglobina corpuscular média, CHCM: concentração média de hemoglobina corpuscular, TGP: transaminase pirúvica, TGO: Transaminase oxalacética, GAMA-GT: gama glutamil transpeptidase. Os valores são representados como média ± erro padrão.

5.3.2 Resultados histológicos.

Após ensaio de sobrevida coletaram-se os tecidos do pulmão, fígado, rim e baço obtendo-se parâmetros comparativos entre os grupos experimentais indicadores de hepatoxicidade, nefrotoxicidade, presença de infiltrados inflamatórios e metástases. Também foram realizadas

análises histológicas do tumor obtido no ensaio de eficácia para identificação de processo de necrose coagulativa nos grupos com RF somados aos ensaios de imunomarcação.

5.3.2.1 Análise histológica do pulmão.

O pulmão desempenha um papel crucial no sistema respiratório, facilitando a troca de oxigênio e dióxido de carbono entre o ar e o sangue. Sua estrutura histológica abrange várias camadas e regiões, incluindo brônquios que se ramificam em bronquíolos e, por fim, em ductos alveolares. Estes últimos conduzem à área de troca gasosa nos alvéolos, pequenos sacos de ar revestidos por células epiteliais especializadas, como os pneumócitos tipo I, responsáveis pela troca gasosa, e os pneumócitos tipo II, que secretam surfactante para prevenir o colapso dos alvéolos (RAFAEL et al., 2011; BELLO et al., 2019;).

A análise histológica indicou a presença do nanocompósito no grupo experimental **NANO** como observado na figura 5-20, geralmente próximo aos vasos sanguíneos dos sacos alveolares, em compensação, no grupo **RF + NANO**, não se observou a presença de nanocompósito, indicando uma melhor absorção da nanoestrutura pelo tecido tumoral, provavelmente por interferência da radiofrequência nesse processo, dado já observado nos ensaios *in vitro*.

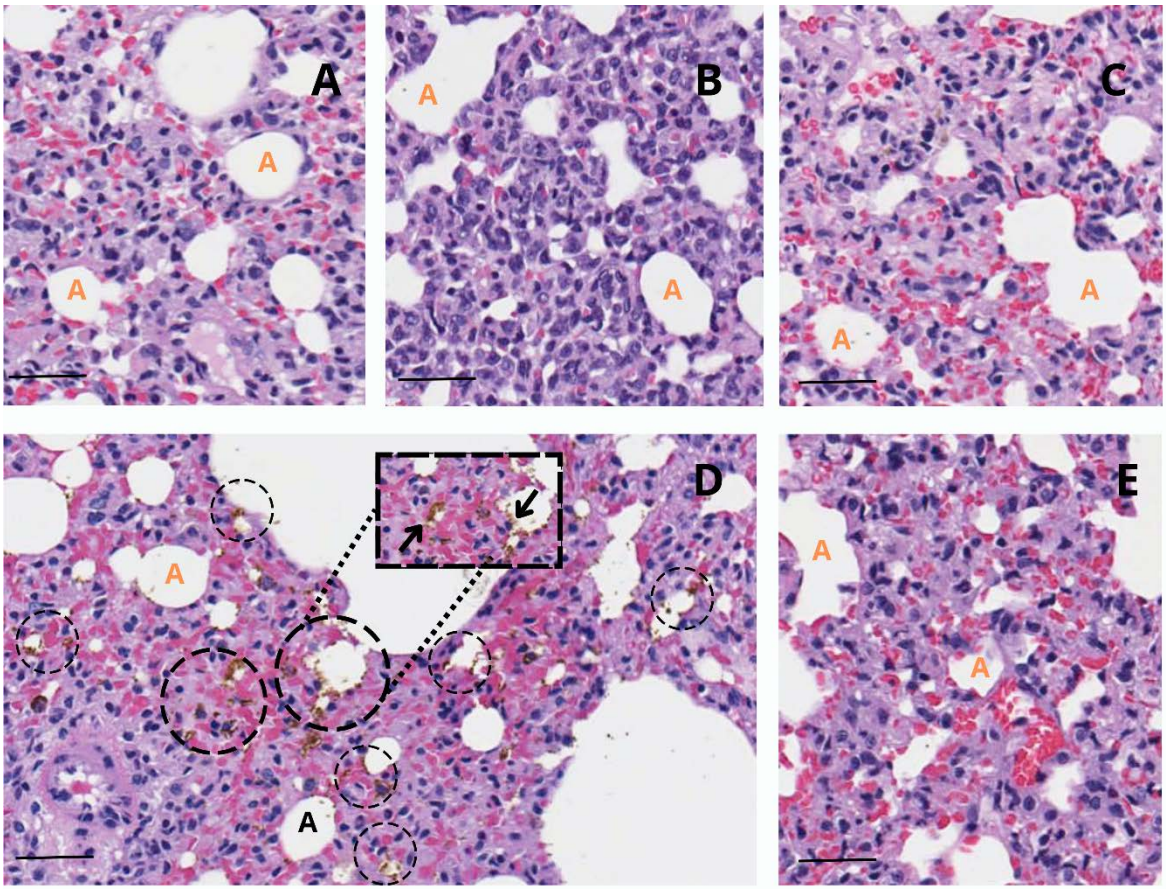


Figura 5-20 Fotomicrografias de pulmão do ensaio sobrevida. (A) Animais sadios; (B) Grupo PBS; (C) Grupo RF; (D) Grupo NANO; (E) Grupo RF+NANO. As letras A em laranja indicam alguns alvéolos representativos, e em (D) estão ressaltadas as áreas com a presença do nanocompósito GO-PEI-Au circuladas com pontilhado preto circular e é apresentado um detalhe de uma das áreas com o nanocompósito em uma caixa de pontilhado preto e as duas setas pretas dentro do detalhe indicam o acúmulo de GO-PEI-Au. Escala 100 µm. Coloração H&E (40x).

5.3.2.2 Análise histológica do fígado.

A descrição histológica de cortes de fígado de rato corados com hematoxilina e eosina (H&E) envolve os hepatócitos que são as células parenquimatosas predominantes no fígado, células poligonais com um núcleo central com coloração azulada pela hematoxilina, seu citoplasma geralmente é eosinofílico, corado em tons de rosa podendo haver notáveis espaços entre os hepatócitos chamados sinusoides onde o sangue flui. (ANDERSEN et al., 2013).

Observam-se que os cordões de hepatócitos possuem aparência saudável em todos os grupos, apesar do resultado das enzimas hepáticas com uma alteração significativa no grupo PBS, as fotomicrografias histológicas do fígado não indicaram alterações significativas entre os grupos, conforme observado na figura 5-21.

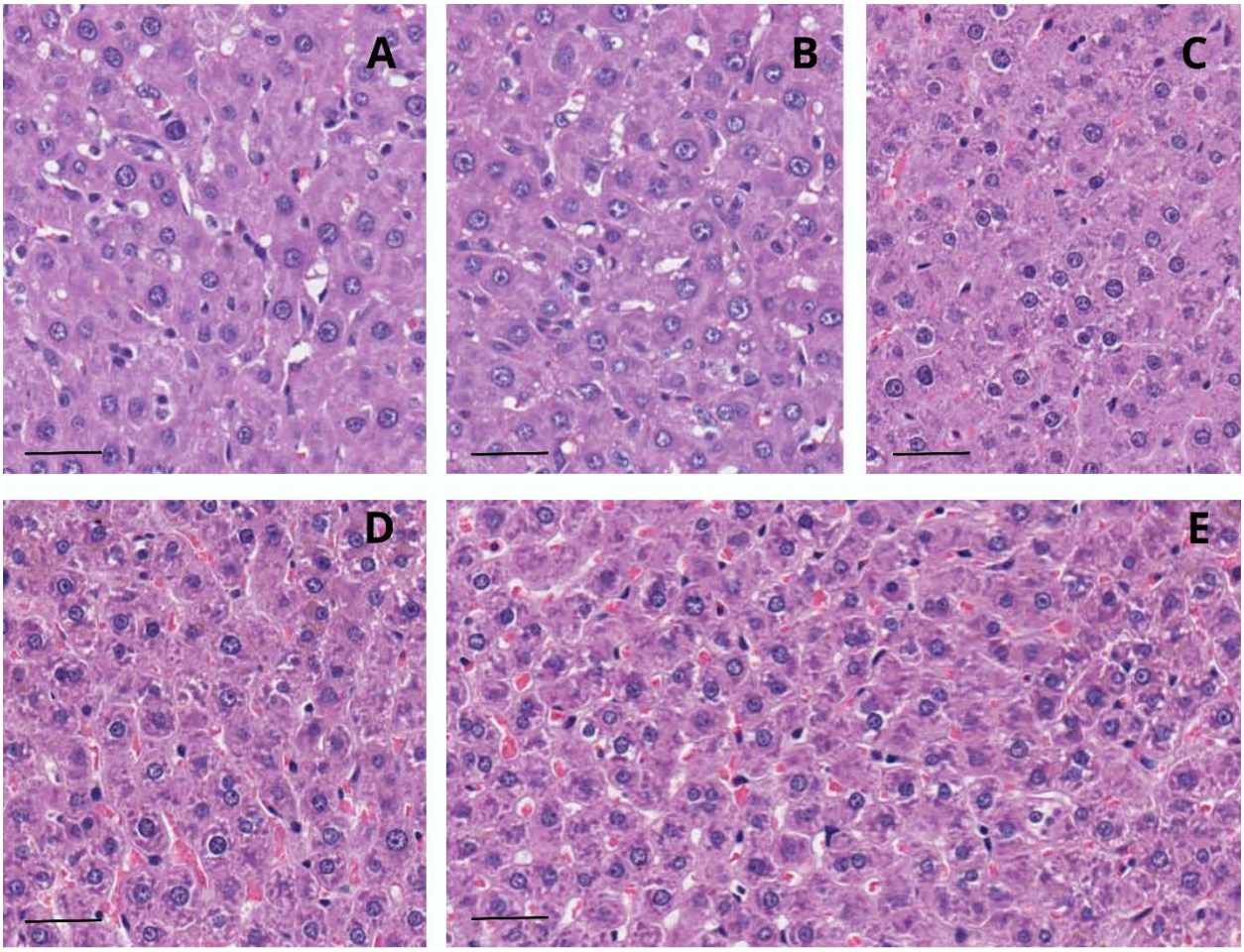


Figura 5-21 Fotomicrografias de fígado do ensaio sobrevida. (A) Animais sadios; (B) Grupo PBS; (C) Grupo RF; (D) Grupo NANO; (E) Grupo RF+NANO. Os núcleos azulados indicam os hepatócitos organizados em cordões. Escala 100 µm. Coloração H&E (40x).

5.3.2.3 Análise histológica do rim.

Os corpúsculos renais, unidades funcionais dos rins, são compostos por um glomérulo capilar envolvido pela cápsula de Bowman indicado na figura 5-22 com a letra G, observa-se que os corpúsculos estão bem preservados nos cortes de cada grupo experimental (DING et al., 2011). O tecido renal não apresentou alterações em seus glomérulos dentre os grupos tratados seguindo um padrão semelhante ao grupo de animais sadios, conforme se observa na figura 5.22.

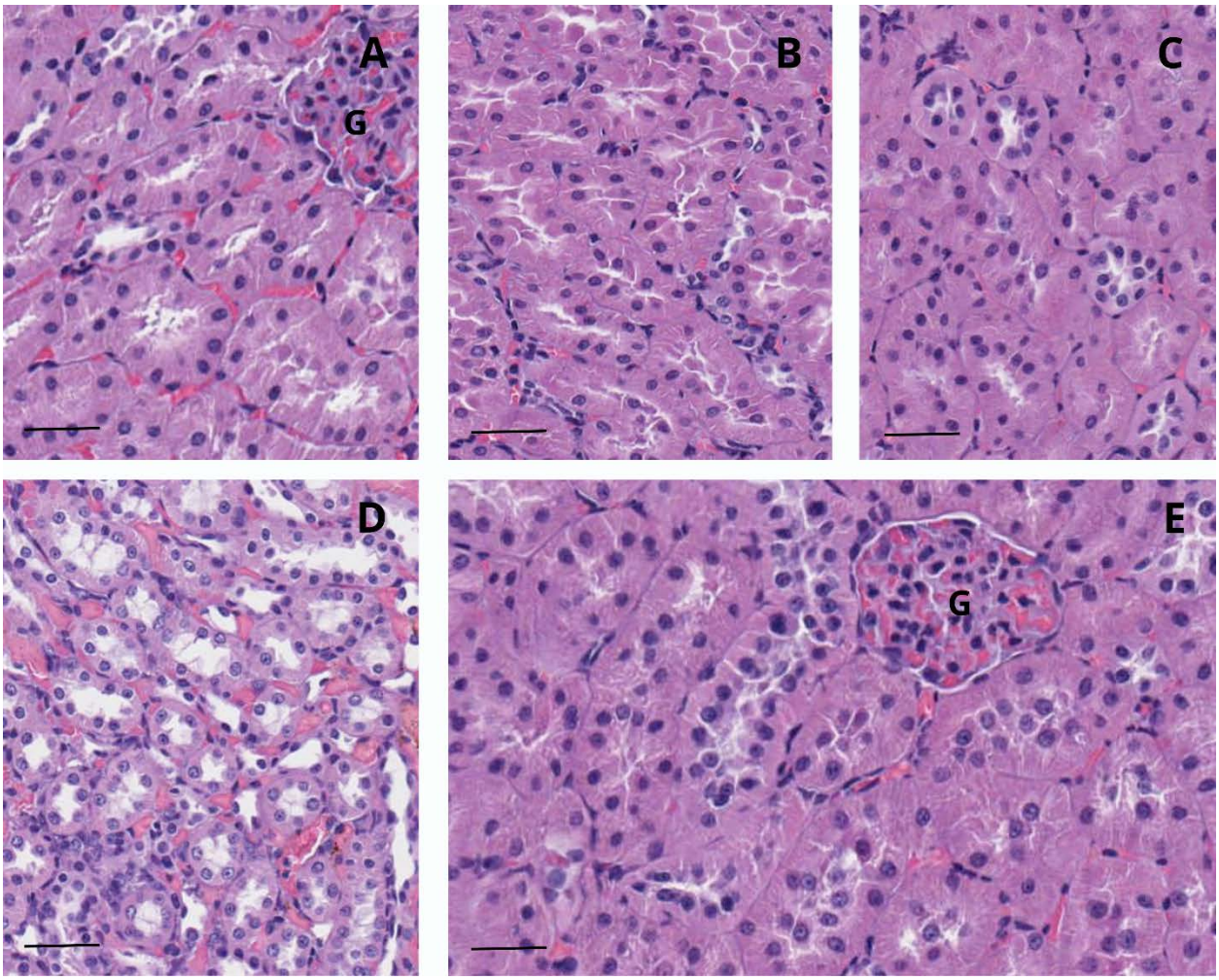


Figura 5-22 Fotomicrografias de rim do ensaio sobrevida. (A) Animais sadios; (B) Grupo PBS; (C) Grupo RF; (D) Grupo NANO; (E) Grupo RF+NANO. A letra G indica um glomérulo. Escala 100µm. Coloração H&E (40x).

5.3.2.4 Análise histológica do baço.

O parênquima do baço se divide em polpa branca que é constituída por nódulos linfáticos, e em polpa vermelha que corresponde a cordões esplênicos, com hemácias nos seios esplênicos (capilares sinusóides). A polpa branca é rica em células imunológicas, como linfócitos, e é visualizada como regiões mais densas e coradas em azul pela hematoxilina. A polpa vermelha é caracterizada por sinusoides sanguíneos e espaços abertos. As células sanguíneas, como eritrócitos, são coradas em tons de rosa pela eosina (IBRAHIM et al., 2018). A função principal do órgão é a produção de linfócitos e se observa no grupo de animais tratados (RF, NANO e RF NANO) maior extensão da polpa branca em comparação ao grupo saudável devido a atividade linfocítica intensificada e por essa razão mais focos de nódulos linfocíticos (IBRAHIM et al.,

2018). Considerando os valores obtidos no eritograma para leucócitos, é de se pressupor maior quantidade de focos de produção de leucócitos nos grupos experimentais tratados.

No grupo PBS (figura 5.23-B) observou-se uma homogeneidade na polpa branca pelo tecido esplênico e também no grupo NANO e RF (figura 5.23-C, D). Já no grupo controle de animais saudáveis, observa-se maior área de polpa vermelha e também pode-se perceber uma área significativa no grupo RF+NANO.

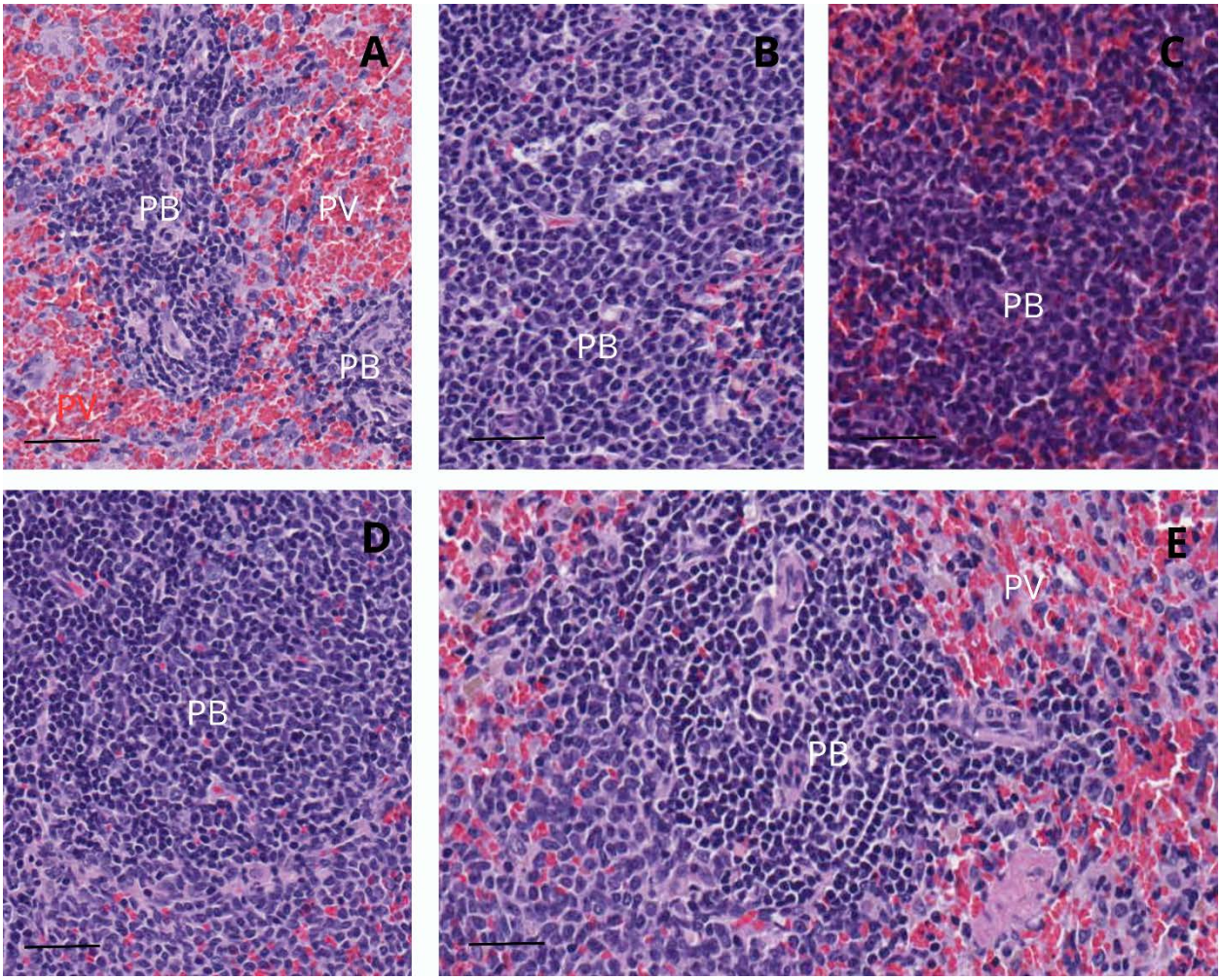


Figura 5-23 Fotomicrografias de baço do ensaio sobrevida. (A) Animais sadios; (B) Grupo PBS; (C) Grupo RF; (D) Grupo NANO; (E) Grupo RF+NANO. Escala 100 µm. Coloração H&E (40x).

5.3.3 Análise histológica dos tumores.

Obteve-se a partir do ensaio de eficácia a histologia por coloração de hematoxilina e eosina dos tumores dos quatro grupos experimentais: PBS, NANO, RF e RF-NANO. Essa

coloração permite identificar processos de necrose por coagulação devido ao dano térmico por exposição a altas temperaturas, ou hipertermia, causado pela temperatura acima de 50ºC, podendo alcançar até 100ºC formando uma área típica de hiperemia devido um aumento anormal do fluxo sanguíneo (KIM et al., 2011; RIVAS et al., 2021; MATTHEE et al., 2023)

A necrose por coagulação, resultante da exposição a altas temperaturas, induz danos térmicos severos nas células, provocando desnaturação proteica e formação de coágulos intracelulares (ZULKIFLI et al., 2023). Os danos histopatológicos incluem perda da estrutura tridimensional normal das proteínas, substituição da arquitetura celular por massas amorfas, inicialmente com a preservação do contorno celular. Esses coágulos comprometem o fluxo sanguíneo, interrompendo o suprimento de oxigênio e nutrientes. A resposta inflamatória inicial é mínima, intensificando-se com o tempo durante a remoção das células mortas por processos fagocíticos (KIM; ERINJERI, 2019). Essas características ressaltam a complexidade da necrose por coagulação em tecidos expostos ao calor elevado. Nas imagens das fotomicrografias C e D da figura 5-24, observam-se as áreas de massa amorfa e já sem definição do contorno celular. Também se ressalta uma redução de núcleos celular (corados com hematoxilina) em menor quantidade na imagem B, referente ao grupo NANO, da figura 5-24.

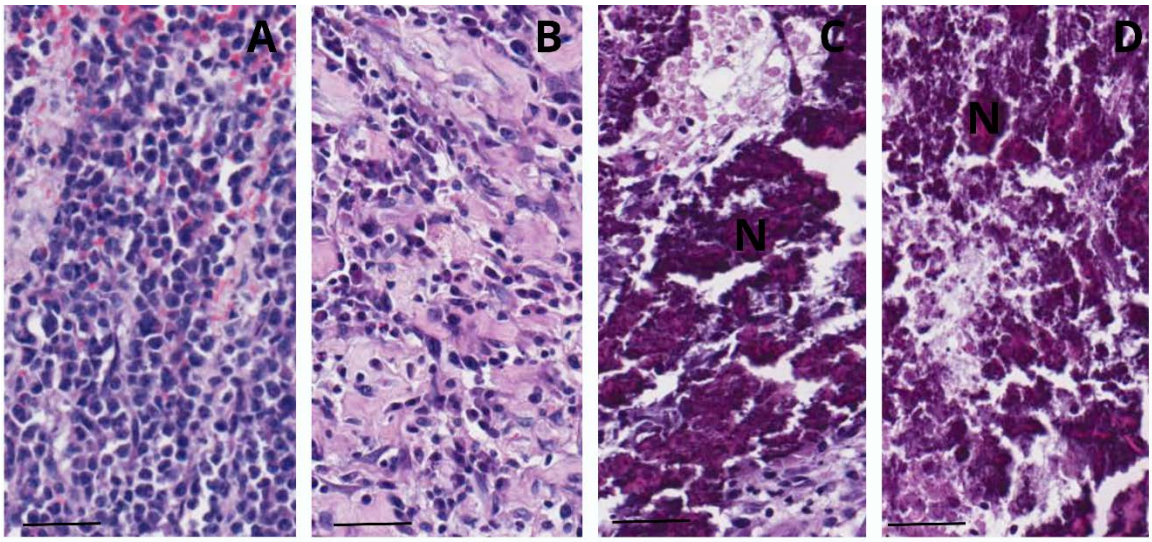


Figura 5-24 Fotomicrografias dos tumores do ensaio de eficácia com e sem tratamento. Observa-se a redução de células tumorais no grupo NANO, também se observa um padrão típico de necrose com a presença de massas amorfas eosinofílicas nos grupos RF e RF+NANO indicadas pela letra N em preto como representativa desse padrão. (A) Grupo PBS; (B) Grupo NANO; (C) Grupo RF; (D) Grupo RF+NANO. Escala 100 µm. Coloração H&E (40x).

A imuno-histoquímica foi utilizada para verificar se os tratamentos utilizados causam alguma diferença na expressão das proteínas BCL-2, P-53 e para avaliar a proliferação celular tumoral utilizando o marcador Ki-67 nos grupos experimentais. Estudos com terapias

combinadas com RF têm considerado a morte apoptótica como um indicador de sucesso da terapia combinada sugerida, mesmo considerando que a necrose é o tipo de morte esperada para temperaturas de ablação a partir de 50ºC (BEYK; TAVAKOLI, 2019; FANG et al., 2019).

Considerando que a ARF é um procedimento que induz a morte celular pelo aquecimento controlado do tecido-alvo por meio de ondas de radiofrequência, a expectativa de tipo de morte celular predominante nesse contexto é a necrose coagulativa. A necrose coagulativa é caracterizada pela desnaturação das proteínas celulares e a formação de coágulos intracelulares, resultando na coagulação do tecido. No caso da ablação por radiofrequência, as altas temperaturas alcançadas (geralmente acima de 60-70 graus Celsius) causam danos irreversíveis às células-alvo. Isso leva à coagulação das proteínas celulares, destruição da membrana celular e interrupção das funções celulares essenciais (GOLDBERG; GAZELLE, 2001; KIM et al., 2011).

O objetivo da ablação térmica por radiofrequência é criar uma área de necrose no tecido-alvo, geralmente um tumor, enquanto minimiza o dano aos tecidos circundantes saudáveis. A eficácia desse procedimento depende da capacidade de alcançar temperaturas letais para as células-alvo, mas também da capacidade de controlar a distribuição do calor para evitar danos excessivos aos tecidos normais (ZHANG et al., 2016).

Considerando a diversidade de análises de tipos de morte no escopo da ARF, esse estudo se propôs a estudar alguns marcadores mais comuns de apoptose que tem sido avaliados pela literatura recente, fornecendo um arcabouço teórico para futuros estudos de terapia combinada com RF. O BCL-2 é um proto-oncogene relacionado à morte celular/apoptose programada e a superexpressão da proteína Bcl-2 pode indicar invasão e a migração do câncer. A resistência à morte celular, característica do câncer, está associada à regulação das proteínas BCL-2, essenciais no controle da apoptose. Alterações na expressão dessas proteínas, resultando na inibição da apoptose, são comuns em várias malignidades. O papel crítico das proteínas BCL-2 torna-as alvos promissores para tratamento do câncer, os papéis das proteínas BCL-2 na regulação normal e disfunção apoptótica, destacando como defeitos nesse controle podem contribuir para o desenvolvimento e resistência terapêutica do câncer (KALONI et al., 2023).

A segunda escolha de imunomarcação para a proteína p53 se justifica por desempenhar um papel crucial na regulação do ciclo celular e na prevenção da formação de tumores. Sua função principal é agir como um supressor tumoral, promovendo a reparação do DNA danificado

ou, se a reparação não for possível, induzindo a apoptose (morte celular programada) para evitar a propagação de células danificadas. Ao avaliar a marcação de p53 por imunohistoquímica em uma amostra de tecido tumoral é possível determinar se há mutações ou expressão anormal da proteína. Mutações no gene TP53, que codifica a p53, são frequentemente associadas a vários tipos de câncer (BEYK; TAVAKOLI, 2019b).

A marcação de imunohistoquímica do Ki-67 em tumores permite avaliar a taxa de proliferação celular. O Ki-67 é uma proteína associada ao ciclo celular e está presente nas fases G1, S, G2 e M, mas não na fase G0 (quiescência). Portanto, a expressão do Ki-67 em células tumorais fornece uma estimativa da fração de células que estão ativamente proliferando no momento da amostragem. Ao analisar a marcação de Ki-67 em uma amostra de tecido tumoral, é possível determinar a porcentagem de células que estão em um estado de divisão celular. Isso pode ter implicações prognósticas e de resposta ao tratamento, uma vez que tumores com taxas de proliferação celular mais altas podem ser mais agressivos e, portanto, potencialmente mais suscetíveis a tratamentos que visam inibir a divisão celular. O Ki-67 é um marcador de proliferação celular indicando se o tratamento está em processo de remissão tumoral. O grupo experimental de eficácia foi utilizado para essa análise porque a eutanásia ocorreu durante o processo de recuperação dos animais (10º dia) e assim foi possível observar se houve diferença entre os grupos de tratamento no processo de remissão tumoral (GERDES, 1990; SOBECKI et al., 2016).

As marcações com BCL-2, p-53 e Ki-67 demostraram uma marcação inespecífica devido ao padrão típico de danos térmicos causados por necrose especificamente nos grupos com tratamento pela RF, o que não possibilitou uma avaliação quantitativa das imagens (Figura 5.25). Observa-se também que o grupo NANO, teve pouca marcação. Como se observa na marcação com HE, o tratamento com NANO reduz a quantidade de núcleos celulares sugerindo essa marcação reduzida e considerando a eficiência do nanocompósito em levar o nanomaterial para o núcleo celular, observado na internalização do nanocompósito por MET. Enfim, esse ensaio de imunomarcação evidencia que o tipo de morte típico para tratamentos envolvendo ablação é a necrose coagulativa. Sendo assim, não há possibilidade de marcação de apoptose quando esse tratamento é aplicado.

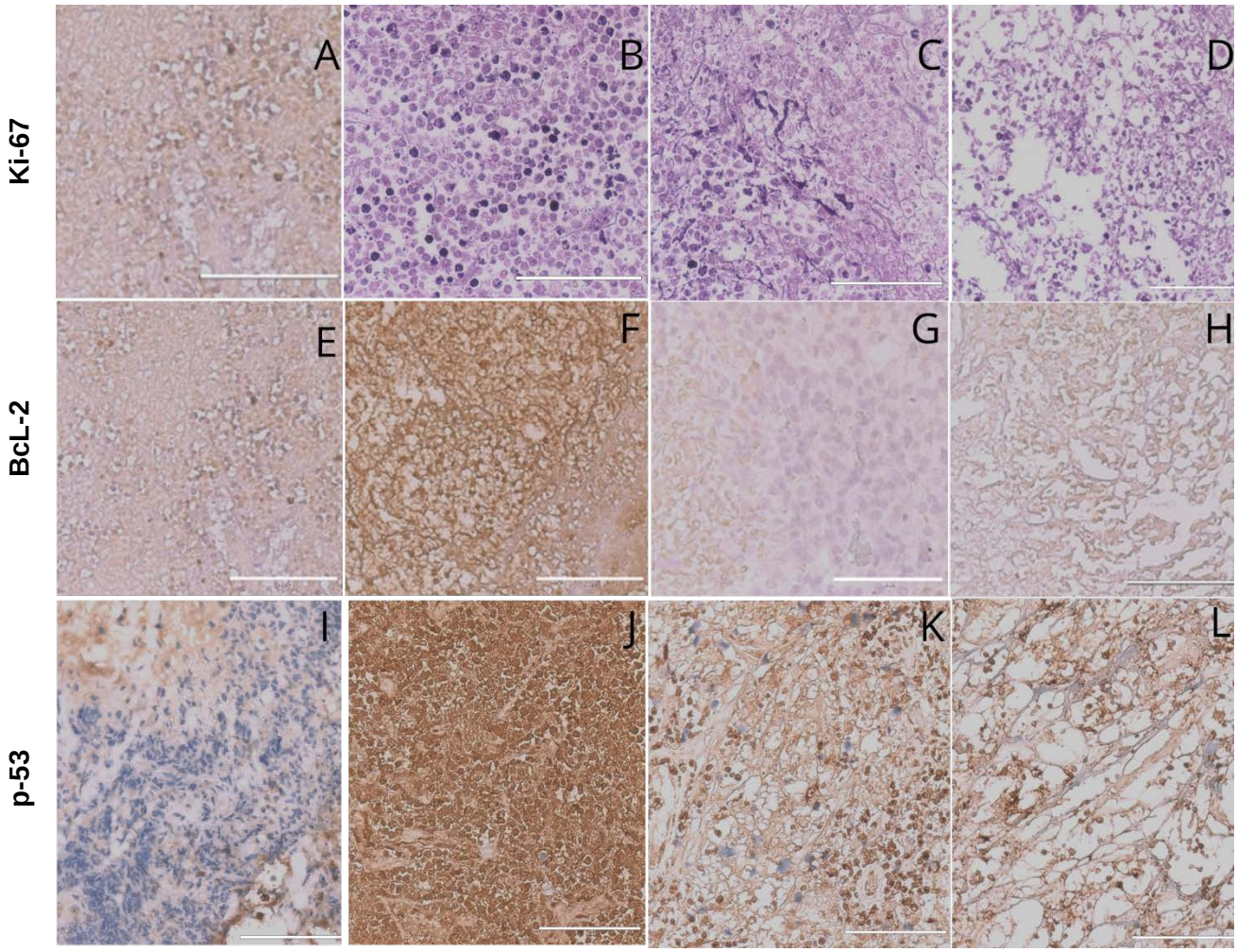


Figura 5-25 Análise imuno-histoquímica do tumor do ensaio de estudo de eficácia com marcação Ki67, BCL-2 e p-53. As células marcadas de marrom indicam células positivas. (A,E,I) Grupo PBS; (B,F,J) Grupo RF; (C,G,K) Grupo NANO; (D,H,L) Grupo RF + NANO (aumento de 40x).

6 DISCUSSÃO

A ablação por radiofrequência (ARF) destaca-se como uma estratégia terapêutica notável no cenário da oncologia clínica, em virtude de sua eficácia e mínima invasividade (LI et al., 2022). A natureza minimamente invasiva da ablação por RF não apenas preserva a integridade anatômica circundante, mas também contribui para a redução substancial do tempo de internação hospitalar, aliviando, assim, a carga física e psicológica sobre os pacientes (RIM et al., 2023). Além disso, a rápida recuperação pós-procedimento permite uma pronta reinserção do paciente em sua rotina diária, minimizando as interrupções na qualidade de vida (SUN et al., 2022). Essa vantagem tem resgatado na literatura e no contexto clínico, uma valorização da ARF, como a instituição pelo SUS do “Dia da Conscientização da Cirurgia Sem Cortes: Ablação” em

13 de dezembro de 2023. Nesse contexto, essa tese buscou superar limites clássicos dessa técnica com a nanotecnologia.

Tumores de grandes dimensões podem não ser completamente tratados, dada a área de tratamento efetiva limitada, sendo menos eficaz em lesões próximas a estruturas críticas. Além disso, a condução térmica limitada em tecidos vasculares representa outra limitação, pois a presença de grandes vasos sanguíneos pode resfriar a região-alvo, reduzindo a temperatura necessária para a destruição efetiva do tumor, aumentando assim o risco de recorrência local nos 2,5 a 5 anos seguintes à ablação (LTP - Local Tumor Progression) (TAN et al., 2021). Assim, um nanocompósito foi modelado para superar essas especificidades.

A proposta dessa tese envolveu a construção de uma plataforma com nanopartículas de ouro que possuem alta condutividade térmica e capacidade de converter eficientemente energia eletromagnética em calor, melhorando assim a eficácia da ablação. O óxido de grafeno, por sua vez, apresenta excelente condutividade elétrica e propriedades de aquecimento rápidas, contribuindo para um aumento na temperatura localizada durante a ablação além de biocompatibilidade e características de nanocarreador para a nanopartícula de ouro sintetizados como nanocompósito utilizando fotoquímica como agente externo de controle no processo de síntese o que permitiu maior precisão no controle da síntese. Também se observou a importância da polietilenoimina como vetor não-viral, fato já conhecido na literatura, no ensaio de internalização celular por MET em que houve uma redução de 24h (YANG; CHITHRANI, 2015), para a chegada do nanomaterial no núcleo celular para 6h, além de ser possível sugerir um processo de endocitose via lisossomos.

Observou-se que pelos resultados obtidos com as linhagens tumoral LLC-WRC-256 (Walker 256) e fibroblastos normais NIH-3T3 que a toxicidade do nanocompósito GO-PEI-Au foi aumentada na ordem de magnitude. Utilizando-se o modelo de Hill, sem aplicação de RF, os valores da BMD (20 µg/mL) e DL50 (23 µg/mL) são os maiores quando comparados aos nanomateriais de referência (GO, GO-PEI e Au-cit) para a linhagem celular LLC-WRC-256. Na verdade, estes valores mostram a biocompatibilidade melhorada da amostra GO-PEI-Au. No entanto, sob aplicação de RF, os valores de BMD e DL50 caem para 0,08 µg/mL e 0,10 µg/mL, respectivamente. Esta é uma redução que indica um enorme aumento na citotoxicidade, com uma redução de cerca de 99,6% na dose necessária para fornecer o mesmo nível de toxicidade celular (BMD e DL50).

O tempo de internalização de nanomateriais com ouro em células tumorais pode variar significativamente dependendo de vários fatores, incluindo o tipo específico de nanomaterial, suas propriedades físico-químicas, o tipo de célula tumoral e as condições experimentais. A internalização de nanomateriais por células geralmente envolve processos complexos, como endocitose, que podem levar algum tempo. Alguns estudos indicam que a internalização de nanomateriais com ouro em células tumorais pode ocorrer em um período de horas a dias, dependendo das condições experimentais (FAN et al., 2020). Por exemplo, a funcionalização da superfície dos nanomateriais, o tamanho das partículas, a presença de ligantes específicos nas nanopartículas e a resposta do ambiente celular podem influenciar o tempo de internalização, incluindo possibilidade de vetorização para o núcleo. Além disso, é importante considerar que a taxa de internalização pode variar entre diferentes tipos de células tumorais devido às diferenças em sua biologia, expressão de receptores de superfície e capacidade de endocitose (FERREIRA et al., 2020).

A análise combinada de microscopia de luz e ensaios de colônia em células tumorais após tratamentos antitumorais proporciona insights fundamentais sobre a resposta terapêutica. A observação microscópica revela alterações morfológicas, incluindo a presença de células apoptóticas, que não foram observadas nas terapias individuais e combinadas, além de uma redução evidente na densidade celular. Os ensaios de colônia, por sua vez, permitem a avaliação direta da capacidade proliferativa das células tratadas, evidenciando uma significativa inibição dessa capacidade, especialmente sob terapia combinada, em comparação com tratamentos individualizados (CHEHELGERDI et al., 2023). Notavelmente, a terapia com RF demonstrou uma redução na formação estruturada de novas colônias, indicando uma interferência marcante na capacidade proliferativa especialmente na terapia combinada que praticamente não conseguiu formar uma nova colônia com células aderidas entre si. Adicionalmente, na microscopia eletrônica de varredura, observou-se interferência nas zonas de adesão celular, quantidades significativas de debris ao redor das células e fragmentos celulares consistentes com danos térmicos substanciais.

Nos ensaios *ex vivo* por sua vez, houve uma confirmação da importância da polietilenoimina estar associada ao óxido de grafeno na forma do nanocompósito (GO-PEI-Au) para favorecer a condutividade elétrica reduzindo a impedância em 10 Ω quando comparado ao nanomaterial (AuNP-PEI) e em 7 Ω quando comparado à aplicação da RF somente. Ensaios *ex vivo* são fundamentais para avaliação de equipamentos biomédicos para simular condições fisiológicas específicas como a validação de desempenho, avaliando o impacto do equipamento

em diferentes condições e ajustando o *design* para otimizar sua funcionalidade e eficácia. Nesse quesito, observou-se que a suspensão de nanomaterial interfere também na formação da área de ablação reduzindo-a significativamente de 12,5 mm^3 a 2,5 mm^3. Esse resultado quando comparado ao resultado *in vitro*, demonstra que a presença de células vivas favorece a absorção desse nanomaterial, reduzindo sua presença no meio extracelular sugerindo sua provável intensificação no fluxo da corrente elétrica de tal maneira que no caso do ensaio *ex vivo* não permite que haja tempo suficiente para a ablação do tecido.

Por fim, nos resultados dos ensaios com ratos Wistar com o modelo tumoral Walker 256 observou-se que houve uma redução de até 10 dias no tempo para a remissão tumoral do grupo da terapia combinada com RF (RF NANO), além de observação macroscópica e clínica de menos sintomas de inflamação no local da ablação. Evidencia-se o aumento na taxa de sobrevivência comparando-se a terapia combinada (RF NANO) com as terapias individuais (RF e NANO) de 80% para 100% de sobrevivência. Também foi possível observar danos indicativos de massas amorfas típicas de necrose no tumor do grupo da terapia combinada com RF (RF NANO) pela histologia realizada com H&E.

Tem-se observado na literatura diversas opções de terapias combinadas com nanomateriais e RF (FANG et al, 2019; BEYK et al,2019; YIN et al,2021; FAN et al,2022) e em alguns desses estudos há uma proposta de obtenção da morte celular, na ablação, por apoptose. A técnica de ablação por radiofrequência utilizando os equipamentos biomédicos tradicionais como o sistema RITA (Boston Scientific), Cool-tip (Medtronic), STARmed (STARmed) já conhecidos do mercado e da literatura, pressupõe a temperatura mínima de 50°C alcançando até 80°C e, portanto, não há mais como haver apoptose e sim necrose por coagulação. Aspecto confirmado quando da observação das lâminas de HE e imuno-histoquímica do tumor com os dois tratamentos aplicados com RF (RF e RF-NANO). A lesão térmica é evidente havendo destruição das células ao ponto de ocorrer uma marcação inespecífica nas análises de imuno-histoquímicas.

Esse dado corrobora a tese de que a necrose por coagulação já bem consolidada na literatura (AHMED et al., 2011; KIM et al., 2011; GALLUZZI et al., 2018; GEOGHEGAN et al., 2022; ZULKIFLI et al., 2023) é a via de maior probabilidade na faixa de temperatura esperada para uma ablação por radiofrequência. Sabe-se que as células respondem a variações de temperatura de diferentes maneiras, e tanto a apoptose quanto a necrose podem ocorrer em diferentes faixas de temperaturas (PARK et al., 2023). No entanto, é importante notar que essas faixas podem variar dependendo do tipo celular, do tempo de exposição à temperatura elevada,

da presença de outros fatores e das condições experimentais específicas (HADIAN; STOCKWELL, 2023) .

A apoptose é desencadeada em temperaturas relativamente moderadas. A faixa típica de temperatura associada à indução de apoptose varia entre 37°C (temperatura corporal normal) e 42°C (SMITH. J, 2013). A necrose geralmente está associada a temperaturas mais elevadas e prolongadas, a faixa de temperatura que pode induzir necrose varia, mas geralmente está acima de 45°C (HADIAN; STOCKWELL, 2023). No entanto, a necrose pode ocorrer em temperaturas mais baixas, especialmente se a exposição à temperatura for prolongada (MATTHEE et al., 2023).

Em procedimentos médicos, como a ablação por radiofrequência, onde o calor é aplicado a tecidos para induzir a morte celular, é crucial controlar cuidadosamente a temperatura para atingir o objetivo terapêutico desejado, minimizando ao mesmo tempo danos aos tecidos circundantes (RIVAS et al., 2021). O monitoramento preciso da temperatura é essencial para otimizar os resultados clínicos (LI et al., 2016).

O objetivo da ablação térmica por radiofrequência é criar uma área de necrose no tecido-alvo, geralmente um tumor, enquanto minimiza o dano aos tecidos circundantes saudáveis. A eficácia desse procedimento depende da capacidade de alcançar temperaturas letais para as células-alvo, mas também da capacidade de controlar a distribuição do calor para evitar danos excessivos aos tecidos normais (ZHANG et al., 2016).

7 CONCLUSÃO

Considerando os dados apresentados a partir dos objetivos propostos, esse estudo avaliou a terapia combinada de ablação por radiofrequência (ARF) com o nanocompósito GO-PEI-Au em três abordagens: ensaios *in vitro, ex vivo* e *in vivo*. As conclusões obtidas foram:

- O nanocompósito GO-PEI-Au é uma formulação promissora para terapia combinada com RF e sua rota de síntese por UV permite maior controle do produto final além de reduzir o impacto ambiental e de toxicidade características das rotas de síntese química favorecendo uma patente;
- A presença do PEI no nanocompósito favoreceu sua biocompatibilidade *in vitro*, ainda, em presença da RF favoreceu a toxicidade em células tumorais;

- O modelo adaptado de placa de cultivo de 24 poços para ensaios *in vitro* com RF foi validado com os resultados obtidos favorecendo uma patente;
- As curvas de calibração com o GO-PEI-Au e as nanoestruturas de referência mostraram que a curva de temperatura *in vitro* tem característica assintótica alcançando um platô a partir de 3 minutos de ablação;
- As curvas de calibração com o GO-PEI-Au e as nanoestruturas de referência mostraram que os resultados biológicos não sofreram interferência do meio de cultivo ou de outras variáveis que não sejam biológicas;
- As curvas de calibração também mostraram que a temperatura aumenta em menor tempo na presença de células no cultivo *in vitro*;
- Pode-se inferir que a presença do PEI no nanocompósito tenha acelerado o tempo de internalização do nanomaterial de 24h para 6h;
- No estudo *ex vivo*, ficou evidente a interferência dos nanomateriais na impedância do tecido e a importância do GO no favorecimento da transferência de energia no tecido biológico reduzindo a impedância em 10 Ω quando comparado ao nanomaterial (AuNP-PEI) e em 7 Ω quando comparado à aplicação da RF somente;
- No estudo de sobrevida *in vivo*, a terapia combinada com o nanocompósito GO-PEI-Au, mostrou uma antecipação da remissão tumoral com antecipação de 10 dias em comparação ao tempo das terapias individuais e um aumento da taxa de sobrevida de 80% para 100%;
- No estudo de sobrevida *in vivo*, a terapia combinada com o nanocompósito GO-PEI-Au (grupo RF+NANO) indicou melhor captação do nanomaterial pelas células tumorais na presença de RF;
- No estudo de eficácia, a imunomarcação se mostrou inespecífica e inadequada para avaliação de terapias combinadas, sugerindo que na literatura há propostas de terapias combinadas com lesão térmica que não podem ser denominadas ablação, mesmo que utilize RF. Considerando essa diversidade de conceitos para ARF na literatura, sugere-se um estudo da avaliação do tipo de morte pré e pós-ablação no microambiente tumoral para definição de planejamento experimental com protocolo clínico mínimo que permita que a temperatura inicial alcance de 50ºC a 60ºC.

8 PERSPECTIVAS

Considerando a terapia combinada promissora proposta nesse estudo, algumas perspectivas são indicadas:

- Investigar as implicações da terapia combinada e da terapia com RF em um painel de citocinas indicando os marcadores mais importantes no processo de remissão tumoral e as implicações para uma tumorigênese como recidiva;
- Identificar mais marcadores de necrose na terapia combinada e da terapia com RF e avaliar a variação de temperatura intratumoral com sensores de temperatura;
- Considerando os resultados obtidos com a imuno-histoquímica, a internalização do nanocompósito por MET e as características do PEI já indicadas pela literatura, um estudo sobre a possibilidade desse nanomaterial estar favorecendo uma morte celular imunogênica é indicado;
- Considerando os resultados obtidos com a linhagem B16 no artigo "**Radiofrequency driving antitumor effect of graphene oxide-based nanocomposites: A Hill model analysis" (em anexo)** um novo estudo de avaliação antitumoral em animais com a mesma terapia combinada para melanoma é fortemente indicada;
- Considerando o sucesso da plataforma GO-PEI com o ouro em formato esférico, abre perspectivas para outros formatos de ouro a serem testados com a mesma plataforma;
- Considerando os resultados *ex vivo* e *in vivo* indicando uma provável interferência na condução elétrica da RF, um estudo aprofundado nessa linha de trabalho é recomendada;
- Considerando os resultados *ex vivo* e *in vivo* mostrando a diferença da interferência de nanomateriais na impedância de um equipamento de RF na célula viva em um tecido pertencente a um sistema dinâmico e um sistema ex vivo *post mortem*, uma reavaliação no formato da análise de dados dos estudos *ex vivo* para estudos translacionais são pertinentes.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDALLA, M. et al. Surgical approach to microwave and radiofrequency liver ablation for hepatocellular carcinoma and colorectal liver metastases less than 5 cm: a systematic review and meta-analysis. **Surgical Endoscopy**, v. 37, n. 5, p. 3340–3353, maio 2023.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA - ANVISA. **Avaliação de Segurança Biológica de Materiais de Uso em Saúde de Base Nanotecnológica**. , 25 jul. 2023. Disponível em: <https://pesquisa.anvisa.gov.br/index.php/868311?lang=pt-BR>

AHMAD, H.; FAN, M.; HUI, D. Graphene oxide incorporated functional materials: A review. **Composites Part B**, 2018.

AHMED, M. et al. Principles of and Advances in Percutaneous Ablation. **Radiology**, v. 258, n. 2, p. 351–369, fev. 2011.

AMARAL, L. A. D. et al. Walker-256 Tumor: Experimental Model, Implantation Sites and Number of Cells for Ascitic and Solid Tumor Development. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 62, p. e19180284, 2019.

ANDERSEN, K. J. et al. The natural history of liver regeneration in rats: Description of an animal model for liver regeneration studies. **International Journal of Surgery**, v. 11, n. 9, p. 903–908, nov. 2013.

APOLINÁRIO, A. et al. ABRINDO A CAIXA DE PANDORA DOS NANOMEDICAMENTOS: HÁ REALMENTE MUITO MAIS 'ESPAÇO LÁ EMBAIXO. **Química Nova**, 2020.

ASADI, L. et al. Cytotoxic Effect of 5-Fluorouracil-loaded Polymer-coated Magnetite Nanographene Oxide Combined with Radiofrequency. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**, v. 18, p. 1148–1155, 2018.

ASHIKBAYEVA, Z. et al. Green-Synthesized Silver Nanoparticle–Assisted Radiofrequency Ablation for Improved Thermal Treatment Distribution. **Nanomaterials**, v. 12, n. 3, p. 426, 27 jan. 2022.

BARATA-SILVA, C. et al. Nanomedicamentos: regulamentação e controle de qualidade. **Vigilância Sanitária em Debate: Sociedade, Ciência & Tecnologia**, p. 138–151, 31 maio 2021.

BATISTA NAPOTNIK, T.; POLAJŽER, T.; MIKLAVČIČ, D. Cell death due to electroporation – A review. **Bioelectrochemistry**, v. 141, p. 107871, out. 2021.

BELLO, S. R. DE B. et al. Nutrition and Cancercapsaicin Treatment Reduces Tumor Growth , Tumor Cell Proliferation Ex Vivo and Partially Reverses Cancer Cachexia in Walker 256 Tumor-Bearing Rats. **Nutrition and Cancer**, v. 71, n. 1, p. 111–117, 2019.

BESLER, E. et al. Real-time monitoring radiofrequency ablation using tree-based ensemble learning models. **International Journal of Hyperthermia**, v. 36, n. 1, p. 428–437, 2019.

BEYK, J.; TAVAKOLI, H. Selective radiofrequency ablation of tumor by magnetically targeting of multifunctional iron oxide – gold nanohybrid. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, v. 145, n. 9, p. 2199–2209, 2019a.

BEYK, J.; TAVAKOLI, H. Selective radiofrequency ablation of tumor by magnetically targeting of multifunctional iron oxide–gold nanohybrid. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, v. 145, n. 9, p. 2199–2209, set. 2019b.

BORODAY, N. V.; CHEKHUN, V. F. MORPHOLOGICAL FEATURES OF DOXORUBICIN-RESISTANT WALKER 256 CARCINOSARCOMA AND RESPONSE OF MAST CELLS. **Experimental Oncology**, v. 40, n. 1, p. 42–47, 22 mar. 2018.

BRIGATTE, P. et al. Walker 256 Tumor-Bearing Rats as a Model to Study Cancer Pain. **The Journal of Pain**, v. 8, n. 5, p. 412–421, maio 2007.

BURDÍO, F. et al. RF tumor ablation with internally cooled electrodes and saline infusion: What is the optimal location of the saline infusion? **BioMedical Engineering Online**, v. 6, p. 1–9, 2007.

CARNEIRO, M. L. B. et al. Acute and subchronic toxicity of the antitumor agent rhodium (II) citrate in Balb/c mice after intraperitoneal administration. **Toxicology Reports**, v. 2, p. 1086–1100, 2015.

CAVALCANTE, G. C. et al. Development of radiofrequency ablation device for surgical hepatocellular carcinoma treatment in agreement with Brazilian standards. **Research on Biomedical Engineering**, v. 34, n. 2, p. 115–126, 17 maio 2018.

CAVALCANTI, P. V. **Guia para a implementação de Ponto Final Humanitário**. First ed. São Paulo: UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO, 2020.

CHANG, W. et al. No-touch radiofrequency ablation using multiple electrodes: An in vivo comparison study of switching monopolar versus switching bipolar modes in porcine livers. **PLOS ONE**, v. 12, n. 4, p. e0176350, 26 abr. 2017.

CHEHELGERDI, M. et al. Exploring the promising potential of induced pluripotent stem cells in cancer research and therapy. **Molecular Cancer**, v. 22, n. 1, p. 189, 28 nov. 2023.

CHOWDHURRY, I.; THARAKAN, B.; BHAT, G. K. Current Concepts in Apoptosis: The physiological suicide program revisited. **CELLULAR & MOLECULAR BIOLOGY LETTERS**, v. 11, n. February, p. 506–525, 2006.

CHUGH, H. et al. Role of gold and silver nanoparticles in cancer. **Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology**, v. 46, n. S1, p. S1210–S1220, 2018.

COLLINS, C. B. et al. Radiofrequency Heating Pathways for Gold Nanoparticles. **Nanoscale**, v. 6, n. 15, p. 8459–8472, 2015.

CONITEC. **Diretrizes Diagnósticas Terapêuticas do carcinoma hepatocelular no adulto**. [s.l.] Ministério da Saúde, maio 2022. Disponível em: <https://www.gov.br/conitec/pt-br/midias/consultas/relatorios/2022/20220520_relatorio_ddt_chc_cp_31.pdf>.

DA FONSECA, R. D. et al. Roll-Off Displacement in Ex Vivo Experiments of RF Ablation with Refrigerated Saline Solution and Refrigerated Deionized Water. **IEEE Transactions on Biomedical Engineering**, v. 66, n. 5, p. 1390–1401, 2019.

DA FONSECA, R. D. et al. Parametric evaluation of impedance curve in radiofrequency ablation: A quantitative description of the asymmetry and dynamic variation of impedance in bovine ex vivo model. **PLOS ONE**, v. 16, n. 1, p. e0245145, 15 jan. 2021.

DARABDHARA, G. et al. Ag and Au nanoparticles/reduced graphene oxide composite materials: Synthesis and application in diagnostics and therapeutics. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 271, p. 101991, 2019.

DENG, Q. et al. Radiofrequency ablation in the treatment of hepatocellular carcinoma. **International Journal of Hyperthermia**, v. 39, n. 1, p. 1052–1063, 31 dez. 2022.

DOS SANTOS, M. S. C. **ENTREGA DE FOTOSSENSIBILIZADORES MEDIADA POR NANOFOLHAS DE OXIDO DE GRAFENO PARA TERAPIAS FOTODINAMICA E FOTOTERMICA COMBINADAS NO TRATAMENTO DE CARCINOMA MAMÁRIO IN VITRO E IN VIVO**. [s.l.] Universidade de Brasília, 2017.

ERÖS DE BETHLENFALVA-HORA, C. et al. Radiofrequency ablation suppresses distant tumour growth in a novel rat model of multifocal hepatocellular carcinoma. **Clinical Science**, v. 126, n. 3, p. 243–252, 1 fev. 2014.

FAN, M. et al. Ultrasmall gold nanoparticles in cancer diagnosis and therapy. **Theranostics**, v. 10, n. 11, p. 4944–4957, 2020.

FANG, Y. et al. Radiofrequency-Sensitive Longitudinal Relaxation Tuning Strategy Enabling the Visualization of Radiofrequency Ablation Intensified by Magnetic Composite. **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 11, n. 12, p. 11251–11261, 27 mar. 2019.

FERREIRA, D. et al. Gold Nanoparticles for Vectorization of Nucleic Acids for Cancer Therapeutics. **Molecules**, v. 25, n. 15, p. 3489, 31 jul. 2020.

FIOR, R. Cancer - when Cells Break the Rules and Hijack Their Own Planet. Em: FIOR, R.; ZILHÃO, R. (Eds.). **Molecular and Cell Biology of Cancer**. Learning Materials in Biosciences. Cham: Springer International Publishing, 2019. p. 1–20.

GALLUZZI, L. et al. Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. **Cell Death & Differentiation**, v. 25, n. 3, p. 486–541, mar. 2018.

GEOGHEGAN, R. et al. Methods of monitoring thermal ablation of soft tissue tumors – A comprehensive review. **Medical Physics**, v. 49, n. 2, p. 769–791, fev. 2022.

GERDES, J. Ki-67 and other proliferation markers useful for immunohistological diagnostic and prognostic evaluations in human malignancies. **Seminars in Cancer Biology**, v. 1, n. 3, p. 199–206, jun. 1990.

GERMANI, G. et al. Clinical outcomes of radiofrequency ablation, percutaneous alcohol and acetic acid injection for hepatocelullar carcinoma: A meta-analysis. **Journal of Hepatology**, v. 52, n. 3, p. 380–388, 2010.

GIOVANNINI, M.; MARX, M. Radiofrequency Ablation of Pancreatic Solid Tumors. **Gastrointestinal Endoscopy Clinics of North America**, v. 33, n. 4, p. 855–865, out. 2023.

GLASSBERG, M. B. et al. Microwave ablation compared with radiofrequency ablation for treatment of hepatocellular carcinoma and liver metastases: a systematic review and meta-analysis. **OncoTargets and Therapy**, v. Volume 12, p. 6407–6438, ago. 2019.

GOLDBERG, S. N. et al. Tissue ablation with radiofrequency using multiprobe arrays. **Academic Radiology**, v. 2, n. 8, p. 670–674, ago. 1995.

GOLDBERG, S. N.; GAZELLE, G. S. Radiofrequency tissue ablation: physical principles and techniques for increasing coagulation necrosis. **Hepato-Gastroenterology**, v. 48, n. 38, p. 359–367, 2001.

GROSSI, M.; RICCÒ, B. Electrical impedance spectroscopy (EIS) for biological analysis and food characterization : a review. **Journal of sensors and sensor systems**, v. 6, p. 303–325, 2017.

HABIBI, M.; BERGER, R. D.; CALKINS, H. Radiofrequency ablation: technological trends, challenges, and opportunities. **EP Europace**, v. 23, n. 4, p. 511–519, 6 abr. 2021.

HADIAN, K.; STOCKWELL, B. R. The therapeutic potential of targeting regulated non-apoptotic cell death. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 22, n. 9, p. 723–742, set. 2023.

HAEMMERICH, D. BIOPHYSICS OF RADIOFREQUENCY ABLATION. v. 38(1), p. 53–63, [s.d.].

HANAHAN, D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. **Cancer Discovery**, v. 12, n. 1, p. 31–46, 1 jan. 2022.

HAO, Y. et al. Rate of local tumor progression following radiofrequency ablation of pathologically early hepatocellular carcinoma. **World Journal of Gastroenterology**, v. 23, n. 17, p. 3111, 2017.

IBRAHIM, K. et al. Histopathology of the Liver, Kidney, and Spleen of Mice Exposed to Gold Nanoparticles. **Molecules**, v. 23, n. 8, p. 1848, 25 jul. 2018.

IKEMOTO, T.; SHIMADA, M.; YAMADA, S. Pathophysiology of recurrent hepatocellular carcinoma after radiofrequency ablation. **Hepatology Research**, v. 47, n. 1, p. 23–30, 2017.

INCA. **INCA - Instituto Nacional do Câncer/Ministério da Saúde**.

INCA. **Estimativa 2023: incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro, RJ: Instituto Nacional De Câncer, 2023.

IZZO, F. et al. Radiofrequency Ablation and Microwave Ablation in Liver Tumors: An Update. **The Oncologist**, v. 24, n. 10, p. e990–e1005, 1 out. 2019.

JANSEN, M. C. et al. Cryoablation induces greater inflammatory and coagulative responses than radiofrequency ablation or laser induced thermotherapy in a rat liver model. **Surgery**, v. 147, n. 5, p. 686–695, 2010.

JIANG, H.-L. et al. Degradable Polyethylenimine-Based Gene Carriers for Cancer Therapy. **Topics in Current Chemistry**, v. 375, n. 2, p. 34, abr. 2017.

JUN, H. Y. et al. Combined radiofrequency ablation and double anti-angiogenic protein therapy to increase coagulation efficacy: An experimental study in a murine renal carcinoma model. **Korean Journal of Radiology**, v. 16, n. 4, p. 776–782, 2015.

KALONI, D. et al. BCL-2 protein family: attractive targets for cancer therapy. **Apoptosis**, v. 28, n. 1–2, p. 20–38, fev. 2023.

KARI, S. et al. Programmed cell death detection methods: a systematic review and a categorical comparison. **Apoptosis**, v. 27, n. 7–8, p. 482–508, ago. 2022.

KIM, D.; ERINJERI, J. P. Postablation Immune Microenvironment: Synergy between Interventional Oncology and Immuno-oncology. **Seminars in Interventional Radiology**, v. 36, n. 04, p. 334–342, out. 2019.

KIM, Y. et al. Coagulation Necrosis Induced by Radiofrequency Ablation in the Liver: Histopathologic and Radiologic Review of Usual to Extremely Rare Changes. **RadioGraphics**, v. 31, n. 2, p. 377–390, mar. 2011.

KOGA, H. et al. Clinical practice guidelines and real-life practice in hepatocellular carcinoma: A Japanese perspective. **Clinical and Molecular Hepatology**, v. 29, n. 2, p. 242–251, 1 abr. 2023.

KUS-LIŚKIEWICZ, M.; FICKERS, P.; BEN TAHAR, I. Biocompatibility and Cytotoxicity of Gold Nanoparticles: Recent Advances in Methodologies and Regulations. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 20, p. 10952, 11 out. 2021.

LI, X. et al. Prediction of tissue thermal damage. **Technology and Health Care**, v. 24, n. s2, p. S625–S629, 13 jun. 2016.

LI, X. et al. Rigorous radiofrequency ablation can completely treat low-risk small papillary thyroid carcinoma without affecting subsequent surgical management. **European Radiology**, v. 33, n. 6, p. 4189–4197, 20 dez. 2022.

LIAO, M. et al. Radiofrequency ablation using a 10-mm target margin for small hepatocellular carcinoma in patients with liver cirrhosis: A prospective randomized trial. **Journal of Surgical Oncology**, v. 115, n. 8, p. 971–979, jun. 2017.

LIN, Y. et al. A network meta-analysis on the efficacy and prognosis of different interventional therapies for early-stage hepatocellular carcinoma. **International Journal of Hyperthermia**, v. 35, n. 1, p. 450–462, 2018.

MACKEYEV, Y. et al. The influence of cell and nanoparticle properties on heating and cell death in a radiofrequency field. **Acta Biomaterialia**, v. 53, p. 619–630, abr. 2017.

MARKEZANA, A. et al. Incomplete thermal ablation of tumors promotes increased tumorigenesis. **International Journal of Hyperthermia**, v. 38, n. 1, p. 263–272, 2021a.

MARKEZANA, A. et al. Incomplete thermal ablation of tumors promotes increased tumorigenesis. **International Journal of Hyperthermia**, v. 38, n. 1, p. 263–272, 1 jan. 2021b.

MARQUES, M. P. Eletrodo De Níquel-Titânio Guiado Por Imagem Eletrodo De Níquel-Titânio Guiado Por Imagem. 2016.

MARTINS, C. G. et al. Consumption of latex from Euphorbia tirucalli L. promotes a reduction of tumor growth and cachexia, and immunomodulation in Walker 256 tumor-bearing rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 255, p. 112722, jun. 2020.

MARTINSEN, O. G.; GRIMNES, S.; SCHWAN, H. P. Interface phenomena and dielectric properties of biological tissue. **Encyclopedia of surface and Colloid Science**, n. 7, p. 2643–2652, 2002.

MATTHEE, A. et al. Power-Controlled, Irrigated Radio-Frequency Ablation of Gastric Tissue: A Biophysical Analysis of Lesion Formation. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 68, n. 10, p. 3953–3962, out. 2023.

MELOROSE, J.; PERROY, R.; CAREAS, S. No Title No Title. **Statewide Agricultural Land Use Baseline 2015**, v. 1, 2015.

MIKLAVČIČ, D.; PAVŠELJ, N.; HART, F. X. Electric Properties of Tissues. Em: AKAY, M. (Ed.). **Wiley Encyclopedia of Biomedical Engineering**. 1. ed. [s.l.] Wiley, 2006.

MILLER, M. A.; ZACHARY, J. F. Mechanisms and Morphology of Cellular Injury, Adaptation, and Death. Em: **Pathologic Basis of Veterinary Disease**. [s.l.] Elsevier, 2017. p. 2-43.e19.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Protocolos clínicos e diretrizes terapêuticas em oncologia. **Ministério Da Saúde**, v. I, p. 356, 2014.

MIRONAVA, T. et al. Gold Nanoparticles and Radio Frequency Field Interactions: Effects of Nanoparticle Size, Charge, Aggregation, Radio Frequency, and Ionic Background. **Langmuir**, v. 33, n. 45, p. 13114–13124, 2017.

MONTEIRO, M. S. **Avaliação da biocompatibilidade e eficácia terapêutica da ablação térmica utilizando um eletrodo de níquel-titânio em modelo de carcinossarcoma hepático**. [s.l.] University of Brasilia, 2018.

MONTEIRO, M. S. et al. Radiofrequency driving antitumor effect of graphene oxide-based nanocomposites: a Hill model analysis. **Nanomedicine**, p. nnm-2023-0312, 19 dez. 2023.

MOSSMANN, T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, p. 55–63, 1983.

NAULT, J. et al. Percutaneous treatment of hepatocellular carcinoma : State of the art and innovations. **Journal of Hepatology**, v. 68, n. 4, p. 783–797, 2018.

NGUYEN, D. T. et al. Effect of Irrigant Characteristics on Lesion Formation after Radiofrequency Energy Delivery Using Ablation Catheters with Actively Cooled Tips. **Journal of Cardiovascular Electrophysiology**, v. 26, n. 7, p. 792–798, 2015.

NGUYEN, D. T. et al. Enhanced Radiofrequency Ablation With Magnetically Directed Metallic Nanoparticles. **Circ Arrhythm Electrophysiol**, v. 9, n. e003820, 2016.

OMS. **GLOBAL CANCER OBSERVATORY**. Disponível em: <https://gco.iarc.fr/>. Acesso em: 11 out. 2022.

PANDEY, A. P.; SAWANT, K. K. Polyethylenimine: A versatile, multifunctional non-viral vector for nucleic acid delivery. **Materials Science and Engineering: C**, v. 68, p. 904–918, nov. 2016.

PARK, W. et al. Diversity and complexity of cell death: a historical review. **Experimental & Molecular Medicine**, v. 55, n. 8, p. 1573–1594, 23 ago. 2023.

PATEL, V. et al. Radiofrequency Ablation , Where It Stands in Interventional Radiology Today. **Seminars in Interventional Radiology**, v. 36, n. 5, p. 398–404, 2019a.

PATEL, V. et al. Radiofrequency Ablation, Where It Stands in Interventional Radiology Today. **Seminars in Interventional Radiology**, v. 36, n. 05, p. 398–404, dez. 2019b.

PEIXOTO, R. C. A. et al. Antitumor effect of free rhodium (II) citrate and rhodium (II) citrate-loaded maghemite nanoparticles on mice bearing breast cancer: a systemic toxicity assay. **Tumor Biology**, v. 36, n. 5, p. 3325–3336, 2015.

PERAFÁN, D. C. **Modelagem térmica e elétrica de tecido hepático em resposta a um sinal de radiofrequência para tratamento de carcinoma hepático por ablação**. [s.l.] Universidade de Brasília, 2018.

PINTO, T. M. **Nanopartículas de Ouro para Radioterapia com Energia Modulada Nanopartículas de Ouro para Radioterapia com Energia Modulada**. [s.l.] Universidade de São Paulo, 2013.

PULUMATI, A. et al. Technological advancements in cancer diagnostics: Improvements and limitations. **Cancer Reports**, v. 6, n. 2, p. e1764, fev. 2023.

RAFAEL, R. et al. Reutilização de cateteres cardíacos de eletrofisiologia. v. 24, n. 3, p. 151–160, 2011.

REIF-ACHERMAN, S. Jacques Arsene d'Arsonval: his life and contributions to electrical instrumentation in physics and medicine.part iii: high-frequency experiences and the beginnings of diathermy [scanning our past]. **Proceedings of the IEEE**, v. 105, n. 2, p. 394–404, fev. 2017.

REJINOLD, N. S.; JAYAKUMAR, R.; KIM, Y. C. Radio frequency responsive nano-biomaterials for cancer therapy. **Journal of Controlled Release**, v. 204, p. 85–97, 2015.

RICARDO DE BRITO BELLO, S. et al. Nutrition and Cancercapsaicin Treatment Reduces Tumor Growth, Tumor Cell Proliferation Ex Vivo and Partially Reverses Cancer Cachexia in Walker 256 Tumor-Bearing Rats. **Nutrition and Cancer**, v. 71, n. 1, p. 111–117, 2 jan. 2019.

RIM, C. H. et al. Comparison of radiofrequency ablation and ablative external radiotherapy for the treatment of intrahepatic malignancies: A hybrid meta-analysis. **JHEP Reports**, v. 5, n. 1, p. 100594, jan. 2023.

RIVAS, R. et al. Effects of control temperature, ablation time, and background tissue in radiofrequency ablation of osteoid osteoma: A computer modeling study. **International Journal for Numerical Methods in Biomedical Engineering**, v. 37, n. 9, p. e3512, set. 2021.

SANJAI, C. et al. A comprehensive review on anticancer evaluation techniques. **Bioorganic Chemistry**, v. 142, p. 106973, jan. 2024.

SANTOS, A. C.; SALES, M. J. A.; PATERNO, L. G. Santos, Amanda Costa; Paterno, Leonardo Giordano; Sales, Maria Jose Araujo. **Physica Status Solidi A**, v. 214, n. 9, p. 1700096, 2017.

SHAO, Y. L. et al. A computational theoretical model for radiofrequency ablation of tumor with complex vascularization. **Computers in Biology and Medicine**, v. 89, p. 282–292, 2017.

SHI, L. et al. Inflammation induced by incomplete radiofrequency ablation accelerates tumor progression and hinders PD-1 immunotherapy. **Nature Communications**, v. 10, n. 1, p. 5421, 28 nov. 2019.

SIEGEL, R. L.; MILLER, K. D.; JEMAL, A. Cancer statistics, 2019. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 69, n. 1, p. 7–34, jan. 2019.

SMITH, T. A. O.; J, C. Principles And Application of RF System for Hyperthermia Therapy. **Hyperthermia**, p. 171–184, 2013.

SOBECKI, M. et al. The cell proliferation antigen Ki-67 organises heterochromatin. **eLife**, v. 5, p. e13722, 7 mar. 2016.

SUN, Y. et al. A systematic review and meta-analysis comparing tumor progression and complications between radiofrequency ablation and thyroidectomy for papillary thyroid carcinoma. **Frontiers in Oncology**, v. 12, p. 994728, 30 nov. 2022.

SUNG, H. et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 71, n. 3, p. 209–249, 2021.

TAN, J. et al. Initial Incomplete Thermal Ablation Is Associated With a High Risk of Tumor Progression in Patients With Hepatocellular Carcinoma. **Frontiers in Oncology**, v. 11, p. 760173, 18 out. 2021.

TEIXEIRA, P. R. et al. Colloids and Surfaces B : Biointerfaces Photochemically-assisted synthesis of non-toxic and biocompatible gold nanoparticles. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 148, p. 317–323, 2016a.

TEIXEIRA, P. R. et al. Photochemically-assisted synthesis of non-toxic and biocompatible gold nanoparticles. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 148, p. 317–323, dez. 2016b.

TEO, P. S. et al. Room temperature in situ chemical synthesis of Fe 3 O 4 / graphene. **Ceramics International**, v. 38, n. 8, p. 6411–6416, 2012.

VAN DEN BIJGAART, R. J. E. et al. Immune Modulation Plus Tumor Ablation: Adjuvants and Antibodies to Prime and Boost Anti-Tumor Immunity In Situ. **Frontiers in Immunology**, v. 12, n. April, p. 1–14, 2021.

WAN, J. et al. Incomplete radiofrequency ablation accelerates proliferation and angiogenesis of residual lung carcinomas via HSP70/HIF-1α. **Oncology Reports**, v. 36, n. 2, p. 659–668, ago. 2016.

WANG, F. et al. Incomplete radiofrequency ablation induced chemoresistance by up-regulating heat shock protein 70 in hepatocellular carcinoma. **Experimental Cell Research**, v. 409, n. 2, p. 112910, dez. 2021.

WANI, W. A. et al. Nanostructured materials functionalized with metal complexes : In search of alternatives for administering anticancer metallodrugs. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 312, p. 67–98, 2016.

WEINBERG, R. A. **The Biology of Cancer**. [s.l: s.n.]. v. 53

YANG, C.; CHITHRANI, D. Nuclear Targeting of Gold Nanoparticles for Improved Therapeutics. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 16, n. 3, p. 271–280, 8 out. 2015.

YANG, Z. et al. Tumor-killing nanoreactors fueled by tumor debris can enhance radiofrequency ablation therapy and boost antitumor immune responses. **Nature Communications**, v. 12, n. 1, p. 1–12, 2021.

YI, L. et al. Recent progress of functionalised graphene oxide in cancer therapy. **Journal of Drug Targeting**, v. 27, n. 2, p. 125–144, 7 fev. 2019.

YIN, Y. et al. *In Situ* Transforming RNA Nanovaccines from Polyethylenimine Functionalized Graphene Oxide Hydrogel for Durable Cancer Immunotherapy. **Nano Letters**, v. 21, n. 5, p. 2224–2231, 10 mar. 2021.

ZHANG, B. et al. A review of radiofrequency ablation: Large target tissue necrosis and mathematical modelling. **Physica Medica**, v. 32, n. 8, p. 961–971, 2016a.

ZHANG, B. et al. A review of radiofrequency ablation: Large target tissue necrosis and mathematical modelling. **Physica Medica**, v. 32, n. 8, p. 961–971, ago. 2016b.

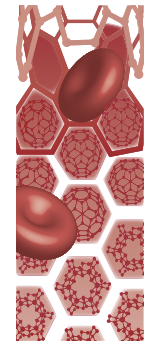
ZIEGLE, J. et al. Correction to: RF-ablation pattern shaping employing switching channels of dual bipolar needle electrodes: ex vivo results. **International Journal of Computer Assisted Radiology and Surgery**, p. 1, 2018.

ZULKIFLI, D. et al. The Applications of High-Intensity Focused Ultrasound (HIFU) Ablative Therapy in the Treatment of Primary Breast Cancer: A Systematic Review. **Diagnostics**, v. 13, n. 15, p. 2595, 4 ago. 2023.

Research Article

For reprint orders, please contact: reprints@futuremedicine.com

Nanomedicine



Radiofrequency driving antitumor effect of graphene oxide-based nanocomposites: a Hill model analysis

Melissa S Monteiro[1], Marina S Mesquita[1], Leidiane M Garcia[1], Paulo R dos Santos[2], Cássia C de Marangoni de Viveiros[3], Ronei D da Fonseca[4], Mary A Xavier[5], Gabriel WS de Mendonça[6], Suélia SRF Rosa[6], Saulo LP Silva[7], Leonardo G Paterno[7], Paulo C Morais[8,9] & Sônia N Báo*[,1]

[1]Department of Cell Biology, Institute of Biological Sciences, University of Brasília, Brasília, Distrito Federal, 70910-900, Brazil
[2]Porto Velho Calama Campus, Federal Institute of Rondônia, Porto Velho, Rondônia, 76820-441, Brazil
[3]Aparício Carvalho University Center /FIMCA, Rondônia, 76811-678, Brazil
[4]PRC/DIMAT, University of Brasília, Brasília, Distrito Federal, 70910-900, Brazil
[5]Faculty of Agronomy & Veterinary, University of Brasília, Brasília, Distrito Federal, 70910-900, Brazil
[6]Faculty of Gama, University of Brasília, Brasília, Distrito Federal, 72444-240, Brazil
[7]Institute of Chemistry, University of Brasília, Brasília, Distrito Federal, 70910-900, Brazil
[8]Institute of Physics, University of Brasília, Brasília, Distrito Federal, 70910-900, Brazil
[9]Biotechnology & Genomic Sciences, Catholic University of Brasília, Brasília, Distrito Federal, 70790-160, Brazil
*Author for correspondence: Tel.: +55 619 909 5005; snbao@unb.br

Aim: This report proposes using the Hill model to assess the benchmark dose, the 50% lethal dose, the cooperativity and the dissociation constant while analyzing cell viability data using nanomaterials to evaluate the antitumor potential while combined with radiofrequency therapy. **Materials & methods:** A nanocomposite was synthesized (graphene oxide–polyethyleneimine–gold) and the viability was evaluated using two tumor cell lines, namely LLC-WRC-256 and B16-F10. **Results:** Our findings demonstrated that while the nanocomposite is biocompatible against the LLC-WRC-256 and B16-F10 cancer cell lines in the absence of radiofrequency, the application of radiofrequency enhances the cell toxicity by orders of magnitude. **Conclusion:** This result points to prospective studies with the tested cell lines using tumor animal models.

First draft submitted: 27 October 2023; Accepted for publication: 5 December 2023; Published online: 19 December 2023

Keywords: b16 • breast cancer • cell viability • gold • graphene oxide • Hill equation • melanoma • nanomaterial • Walker 256

Cancer is still the leading cause of death in western society and the research community invests resources to discover new therapies and drugs or to enhance the delivery of known anticancer agents. Some cancer types are rapidly increasing worldwide, and melanoma skin cancer is one on the list. Actually, in the western population, melanoma is the fifth most common type of cancer in men and the sixth most common in women; 1 out of 50 individuals will develop melanoma [1,2]; as for breast cancer, the estimated number of deaths in 2020 was 6.9% worldwide [3]. Nanomedicine uses materials such as gold or graphene at the nanoscale, from which new properties arise; for instance, allowing enhanced tumor killing while reducing systemic toxicity [4–6]. The new desirable materials' characteristics, which can be tuned with appropriate changes, open up perspectives of new hypotheses to be tested and interpreted within complex biological systems. Thus, modeling mathematically the interaction and behavior of nanomaterials within biological models (*in vitro* as well as *in vivo*) represents a paradigm shift promising better outcomes from cancer research [7,8].

Mathematical models applied to biological systems pose a significant challenge in accurately capturing the complexity of these systems, primarily because of the numerous parameters involved and, additionally, the nonlinear relationship among many of them. Nonetheless, such models enable the development of realistic frameworks that

Future Medicine

are capable of evaluating hypotheses within biological models [9]. In recent years, there has been a growing emphasis on assessing mathematical models in *in vitro* assays, encompassing both 2D and 3D cultures, as well as tissue culture [10,11]. These advancements aim to establish mathematical modeling as a predictive tool in studies centered around living systems. In 2019 Dogra *et al.* proposed a classification system for mathematical models in nanomedicine, emphasizing three main categories; namely, continuous models, hybrid models and models focused on nanoparticle–cell interaction [12]. Their research not only delved into the biophysical processes occurring in the systemic environment but also explored their application in enhancing nanodrug delivery efficacy [13]. Regarding the third category in the classification, namely the nanoparticle–cell interaction, it is worth mentioning a recent report describing an extension of the Hill model accounting for the description of nanotoxicity in terms of the morphology of the challenging nanomaterial [14]. Moreover, existing mathematical models for biophysical processes in *in vitro* assays have already been established, as highlighted by Li *et al.*, who specifically mentioned the use of the Hill equation in their study [15].

Within the scope of the Hill model, the derived equation employs the dissociation constant (K) and the Hill exponent (E) as parameters to depict the connection between ligand concentration (dose) and the corresponding biological response (e.g., cell viability). The Hill model finds frequent application in enzymatic systems and the binding processes of materials' structures to cell receptors [16]. When it comes to metallic nanoparticles (e.g., Au and Ag), the cooperative response between ligands and receptors relies on distinctive properties of these nanostructures, the specific type of ligand employed and the biological system under investigation. These nanoparticles possess unique characteristics due to their small size and high surface-to-volume ratio, enabling interactions with biomolecules like proteins and receptors, thereby initiating specific biological responses. Such interactions can be influenced by the affinity of the ligand for the nanoparticle and the surface properties of the nanoparticle itself [17–19].

Under appropriate conditions, positive cooperativity can be observed between metallic nanoparticles and receptors wherein the presence of external inputs on these nanostructures, such as electromagnetic waves, enhances the affinity of the ligand for the cell receptor or boosts their biological activity. For instance, gold nanoparticles (AuNPs) functionalized with specific ligands have shown an increased cellular uptake or heightened activity of signaling molecules [20–22]. However, negative cooperativity is also observed, where the presence of nanoparticles quenches the affinity toward the receptor or reduces its biological activity. Such effects can be influenced by the presence of protective crowns surrounding the nanoparticles, which can interfere with the ligand–receptor interaction [23–25].

In this report, a nanohybrid system comprising AuNPs associated with graphene oxide (GO) sheets functionalized with low-molar-mass polyethyleneimine (LPEI) was used in *in vitro* assays to evaluate the antitumor potential while combined with radiofrequency (RF) therapy. Actually, this is a classical *in vitro* assay already reported in experiments for drug selection [4]. The antitumor action of GO with PEI has been explored as a promising strategy for drug delivery and targeted therapies in cancer treatments (Yin *et al.*, 2021 [26]). The use of radiofrequency ablation (RFA) for treatment of different types of tumors of up to 3 cm in size is a well-established therapeutic option [27–29]. However, the state of the art of RFA currently involves a set of limitations such as a tumor size of around 3 cm [30–32] and incomplete ablation [33]. Alterations in the biological characteristics of the tumor microenvironment may stimulate proliferation and angiogenesis pathways, resulting in a recurrence at the ablation site [34–36].

The as-synthesized nanocomposite (labeled GO-PEI-Au) was herein evaluated using two tumor cell lines, namely LLC-WRC-256 and B16-F10. The parameters for evaluating the combined therapy were a nanocomposite concentration up to 15 μg/ml in a specific ablation time (3 min) and fixed RF parameters (500 kHz, 5 W) [37–39]. The cell viability was evaluated using 3-(4,5-dimethythiazol 2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) for colorimetric analysis by spectrophotometry. The MTT assay is considered a classical assay in cytotoxicity studies and has been used as a standard approach for decision-making processes in experimental planning. There are several other techniques that allow the known limitations of MTT to be overcome, but its low cost and technical simplicity still guarantee its ubiquity in the daily *in vitro* research [40]. To carry out the tests, a well-to-well ablation protocol was employed in traditional culture plates with needle-point electrodes in a bipolar arrangement connected to the RF generator. With this approach, it was possible not only to map a pattern of performance of the nanocomposite used for the *in vitro* assays of 2D cultivation, but also to create predictive models, using statistical tools, on which to base other studies with metallic nanostructures (Figure 1).

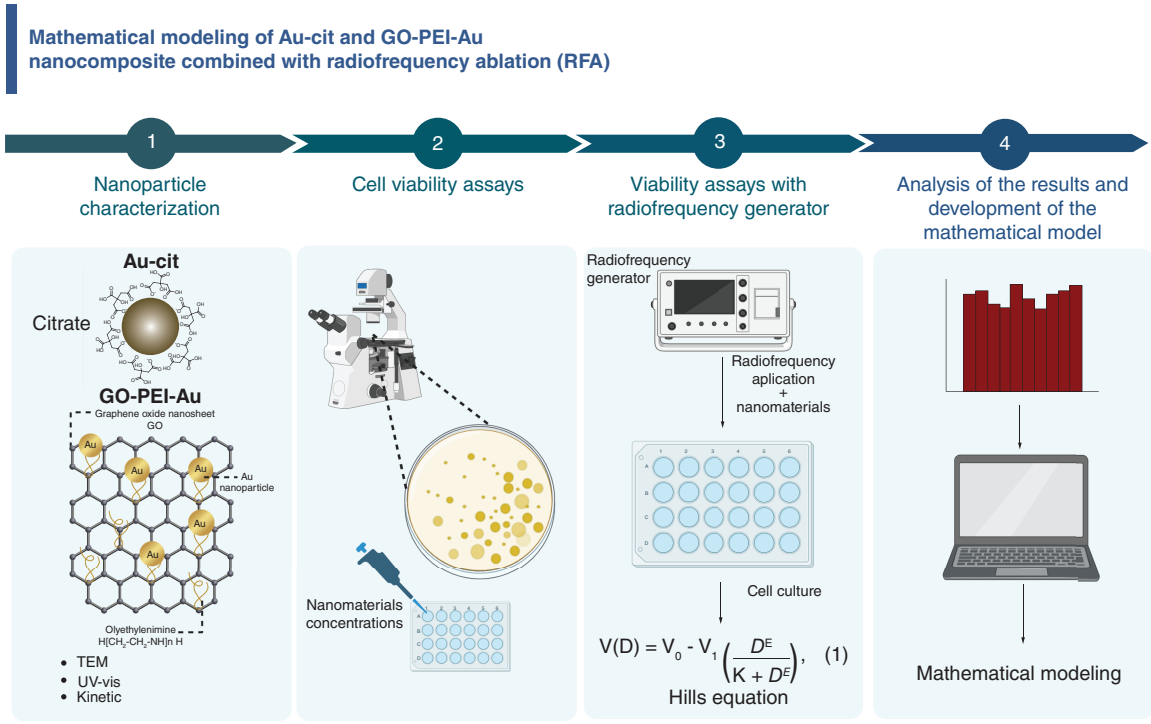


Figure 1. The experimental design of the present study.
Cit: Citrate; GO: Graphene oxide; PEI: Polyethylenimine; TEM: Transmission electron microscope.

Materials & methods

Chemicals & reagents

The following reagents were purchased from Sigma-Aldrich (MO, USA) and were used as received without further purification: gold(III) chloride hydrate (99.995%), branched LPEI (MW 1800 g/mol), monochloroacetic acid, sodium hydroxide, N-hydroxysuccinimide and N-(3-dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide hydrochloride (EDC). DMEM was purchased from Life Technologies Corporation (NY, USA); Roswell Park Memorial Institute (RPMI-1640) medium, fetal bovine serum and phosphate-buffered saline (pH 7.4) were purchased from Gibco/Life Technologies (NY, USA). Aqueous GO suspension (2 g/l) was produced according to the literature [41] and purified using regenerated cellulose dialysis bags (molar mass cutoff: 12,000 g/mol).

Synthesis of the GO-PEI-Au nanocomposite

For the synthesis of the GO-PEI-Au nanocomposite, GO was first carboxylated, then functionalized with LPEI and finally decorated with AuNPs via photochemical reaction. For the carboxylation reaction, GO (1 g/l, 60 ml) was mixed with NaOH (0.03 mol) and monochloroacetic acid (0.01 mol) in a round-bottomed flask (125 ml) and kept under moderate magnetic stirring at 50°C for 4 h. The reaction mixture was then cooled down to room temperature and dialyzed against double distilled water for 24 h. In the second step, carboxylated GO (1 g/l, 40 ml) was mixed with EDC (2 mmol, 384 mg), N-hydroxysuccinimide (2 mmol, 232 mg) and LPEI (160 mg) in a round-bottomed flask (125 ml) and kept under magnetic stirring at room temperature for 24 h. The reaction mixture was then dialyzed against double distilled water for 24 h. In the last step, as schematically illustrated in Supplementary Figure 1, the GO-PEI intermediate sample (0.045 g/l, 5 ml) was mixed with 500 µl of $HAuCl_4$ aqueous solution (8 mM), and the volume was completed to 20 ml with ultrapure water. The reaction mixture was then submitted to UV irradiation (254 nm, 16 W) for 30 min at room temperature inside a lab-made chamber as reported elsewhere [42]. This time was chosen based on a previous kinetic study, which is reported in the Results and Discussion sections. Additionally, other GO-PEI:$HAuCl_4$ proportions were tested, although not they did not produce a sizable amount of GO-PEI-Au or stable suspension. The GO-PEI-Au sample was used for biological tests as produced, without any further purification procedure. For comparison purposes, a reference sample of AuNPs functionalized with citrate and labeled Au-cit was produced according to the method reported in the literature [43].

The photochemical reaction was monitored (*ex situ*) by UV-Vis spectroscopy using a Varian Cary 5000 spectrophotometer (Molecular Devices Corporation, CA, USA). For that purpose, the reaction mixture was placed in a quartz cuvette (1 cm optical path, two polished windows) and irradiated inside the UV chamber. At different time intervals (from 0 to 60 min) the cuvette was removed from the UV chamber and placed in the spectrophotometer, where UV-Vis spectra were recorded in the range of 200–800 nm, at 1 nm/min and 0.5-nm resolution. The data was further processed in the Origin 8.0 software (OriginLab, MA, USA) to build the isotherm, in which the absorbance of the localized surface plasmon resonance (LSPR) band of AuNPs was plotted against the photoreaction time.

Transmission electron microscopy

The size and morphology of the GO-PEI-Au and Au-cit samples were assessed using transmission electron microscopy (TEM: 80 kV, JEOL 1011, Tokyo, Japan). Samples were prepared by placing a drop (5 µl) onto a 400-mesh copper grid coated with Formvar® film (Electron Microscopy Sciences, PA, USA), then left to dry in open air. Grids were kept at room temperature until analysis. A minimum of 400 particles were measured using the ImageJ software (NIH, MD, USA).

Determination of hydrodynamic diameter, polydispersity index & ζ-potential

The hydrodynamic mean diameter, polydispersity index and ζ-potential of the GO-PEI-Au, GO-PEI and Au-cit samples were assessed respectively by dynamic light scattering and electrophoretic mobility using a Zetasizer Nano ZS instrument (Malvern Instruments, Malvern, UK). All measurements were carried out at 25°C using ultrapure water as the solvent.

Set-up for RFA

Using an RF generator with electrodes adapted for bipolar arrangement in 24-well culture plates, ablations were performed with the instrument operating at a power of 5 W and frequency of 500 KHz. A 72 Ω series resistor (16 W) was added in order to limit maximum input current to the wells, to prevent generator shorting and to improve load matching. The RFA equipment used for this study was developed by the Laboratory of Biomedical Engineering (LaB) at the University of Brasilia [44].

Choice of tumor cell line models

The B16-F10 tumor model is a well-established tool for translational studies of human melanoma driving the understanding of disease mechanisms. This model allows testing new treatments and developing more the choices of tumor cell models, using their characteristics as a reference for experimental planning, allowing a set of research questions to be answered. Several of the animal tumor models used to answer those questions are initially evaluated *in vitro*, favoring a leaner *in vivo* stage with a reduction in experimental groups. The more information one can obtain with the *in vitro* models, the fewer animals will be used, as recommended (for instance) by the US FDA in its predictive toxicology plan [40]. Two cell lines were selected for the *in vitro* studies: LLC-WRC-256 and B16-F10. The cell lines were obtained from Sigma-Aldrich and from the Cell Bank of Rio de Janeiro, and were maintained in RPMI and DMEM culture media, respectively.

The Walker 256 (LLC-WRC-256) tumor model allows the study of tumor progression, from the initial development of the primary tumor up to the formation of metastases in distant organs, providing an understanding of tumor evolution and the process of typical symptoms very similar to those of a human being, such as cachexia in advanced patients. Its use in planning allows the provision of an efficacy response for combined therapies, such as the one proposed in this study, and obtaining a set of responses regarding the tumor microenvironment and biological mechanisms [45,46].

In terms of effective therapeutic strategies, the cell line behaves in a very similar way to human melanoma., It has a highly aggressive and metastatic development, with rapid dissemination to other organs, such as lungs and liver, replicating the invasive nature of advanced melanoma in humans. This cell line allows the study of metastases, one of the main clinical challenges in the treatment of melanoma [47].

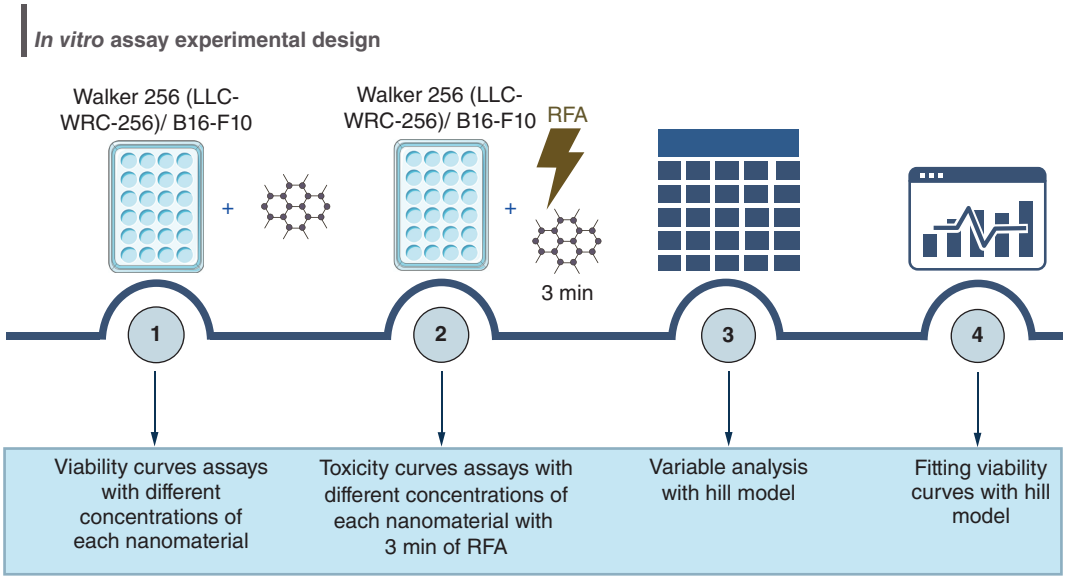


Figure 2. *In vitro* experimental design with both LLC-WRC-256 and B16-F10 cell lines plus the combined radiofrequency therapy.
B16-F10: Mouse melanoma cell line; LLC-WRC 256: Rat Walker carcinoma cell line; RFA: Radiofrequency ablation.

Cell viability & cell toxicity assays

The cell viability was evaluated using the MTT assay for each cell line with sample concentrations varying from 3.125 to 50 µg/ml for the GO-PEI-Au nanocomposite and from 0.78125 to 12.5 µg/ml for the Au-cit nanoparticle. Three independent events were examined.

The cell toxicity was evaluated using the MTT assay for each cell line, with sample concentrations varying from 0.78125 to 15 µg/ml for both the GO-PEI-Au nanocomposite and the Au-cit nanoparticle. The nanomaterials were applied 24 h before the ablation procedure for both cell lines (LLC-WRC-256 and B16-F10). Then, the RFA was applied for 3 min at a fixed RF parameter (500 kHz, 5 W). The cell lines remained in culture media for 48 h after application of the RFA protocol. Three independent events were examined for each treatment (Figure 2).

Calibration curves

Because the temperature changes during the *in vitro* RFA protocol, it was necessary to produce a temperature versus time calibration curve with both culture media (DMEM and RPMI) used for each cell line. The calibration curve allows one to evaluate the performance of the RFA procedure in relation to equipment variables such as impedance, voltage, current and temperature variation. Temperature data were obtained with a Fluke VT 04A thermal camera (Fluke Corporation, WA, USA), in triplicate data sets. In order to choose the best treatment protocol while using the RFA, a second calibration curve assay was carried out with RF application from 1 to 6 min with each cell line, measuring in triplicate, assessing the temperature curves for the reference Au-cit nanoparticle and the nanocomposite (GO-PEI-Au).

The calibration curves related to the DMEM and RPMI culture media, while under the RF excitation, were obtained every 10 s by recording temperature, impedance, voltage and current parameters. The temperature was recorded with a thermal camera, taking the highest observed value. From these records, it was possible to build calibration curves with only the culture media to validate the experimental protocol and use them as a reference for the data obtained in the RF ablation equipment (Supplementary Figure 2). Additionally, it was possible to identify the RF time exposure required (3 min) to obtain the minimum ablation temperature of 50°C [48]. It was verified that the equipment operation was stable (current and voltage) keeping the constant delivering power of 5 W.

In order to choose the best treatment protocol with RF, an initial assay was carried out with the application of RF from 1 to 6 min, with each cell line, measuring the temperature for incubation with the Au-cit and GO-PEI-Au samples. It was observed that after 2 min of RF operation there was a tendency toward a temperature plateau and after 3 min this plateau was established (Supplementary Figure 3). For this reason, the application of RF was set for a duration of 3 min while evaluating the cytotoxicity.

The mathematical model

The collected experimental data from the *in vitro* assays were curve-fitted using the standard Hill equation, as widely reported in the literature, including while using nanomaterials [7,8,49]. The Hill model parameters extracted from the fittings were the scaling parameters (V_0 and V_1), the dissociation constant (K) and the Hill exponent (E). From these values, the 'benchmark dose' (BMD) and the 50% lethal dose (LD_{50}) were estimated.

The experimental data were curve-fitted using the following expression:

$$V(D) = V_0 - V_1\left(\frac{D^E}{K + D^E}\right) \quad \text{(Equation 1)}$$

where V and D represent cell viability and dose (concentration) of the nanomaterial, respectively. From Equation 1, the values of the BMD and the LD_{50} – meaning, respectively, the dose required to reduce the cell viability by 10 and 50% – were calculated as:

$$BMD = \left[\frac{K}{10\left(\frac{V_0}{V_1}\right) - 1}\right]^{1/E} \quad \text{(Equation 2)}$$

and

$$DL50 = \left[\frac{K}{2\left(\frac{V_0}{V_1}\right) - 1}\right]^{1/E} \quad \text{(Equation 3)}$$

Results

Morphological features of GO-PEI-Au

Figure 3 shows the morphological, structural and optical features of the GO-PEI-Au samples assessed by TEM, high-resolution TEM and UV-Vis spectroscopy. In Figure 3A, the low-resolution TEM image shows the GO-PEI-Au sample supporting spherical-like AuNPs. Prismatic shapes are also detected in the sample, although in reduced amounts. Additionally, it is seen that the AuNPs are spread all over the GO-PEI template instead of being located in specific sites (basal plane or edges), suggesting that the functionalization of the GO with PEI is homogenous. It is worth mentioning that attempts to synthesize GO-Au nanocomposites (without PEI) using the herein applied photochemical method were unsuccessful. Indeed, our findings reveal that the presence of PEI is essential for successful production of the GO-PEI-Au nanocomposite, likely because the amine as well as imine groups in PEI are capable of adsorbing $AuCl_4^-$ anions by coordination and electrostatic interactions, which serve as nucleation sites for the first Au^0 atoms and further for well-formed AuNPs, as reported elsewhere [42]. In Figure 3B & C, the high-resolution TEM image and a selected area electron diffraction pattern indicate that the AuNPs are highly crystalline, whereas the inset highlights the regular interplanar distances of about 0.235 nm (assessed by the ImageJ software), which is compatible with the (111) Miller index for Face Centered Cubic (FCC) gold. The size-distribution histogram for the GO-PEI-Au nanocomposite is shown in Figure 3D and gives an average diameter of 26.6 ± 0.3 nm after log-normal fitting. The GO-PEI-Au complex is relatively larger than the Au-cit nanoparticles (Supplementary Figure 4), which display an average diameter of 15.3 ± 0.3 nm. Finally, Figure 3E provides the UV-Vis spectra recorded at different time intervals (0–60 min) during the photochemical reaction. The typical LSPR band of AuNPs is evident at 533 nm in the very first minutes of the reaction.

An isotherm featuring the asymptotic behavior for the reaction is provided in the inset of Figure 3E, where it is seen that the LSPR absorbance at 533 nm increases steeply in the first minutes and levels off at about 15 min. Indeed, 30 min of reaction are more than enough for the reaction to reach equilibrium and this was the time chosen for the preparation of the GO-PEI-Au sample. Differential pulse voltammetry experiments (results not shown) performed with the GO-PEI-Au sample did not show any significant amount of Au ions, suggesting the photochemical reaction reaches completion in the time period chosen for sample preparation. Table 1 shows important morphological and electric parameters regarding water suspensions of the Au-cit, GO-PEI and GO-PEI-Au samples, namely the hydrodynamic size, the polydispersity index and the ζ-potential.

Modeling results

Figures 4 & 5 show the cell viability data (vertical columns) obtained from the MTT assays while using, respectively,

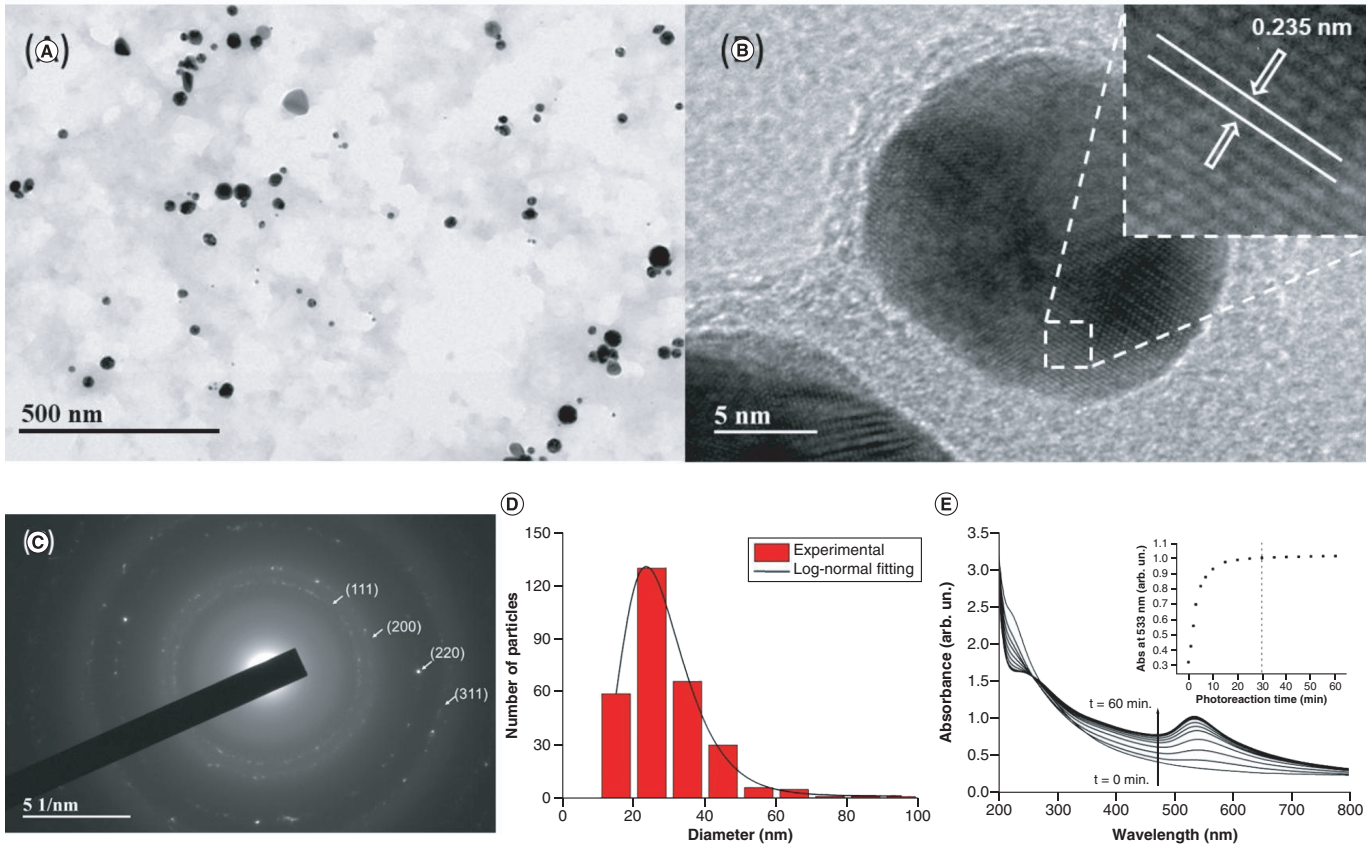


Figure 3. Morphology and electronic structure of graphene oxide-polyethylenimine-gold nanocomposite. (A) Representative transmission electron microscopy (100 kV) of the GO-PEI-Au nanocomposite (scale bar = 500 nm). **(B)** Representative high-resolution transmission electron microscopy of the Au-cit nanoparticle, showing the characteristic (111) Au interplanar distance (0.235 nm) (scale bar = 5 nm). Measurements of individual particles' diameter were performed using the ImageJ software. **(C)** Selected area electron diffraction pattern registered from a gold nanoparticle dispersed within the GO-PEI matrix. **(D)** The GO-PEI-Au nanocomposite particle size histogram, with a mean size of 26.6 ± 0.3 nm. **(E)** GO-PEI-Au kinetic curve formation.
AU-cit: Citrate-functionalized gold nanoparticle; GO: Graphene oxide; PEI: Polyethyleneimine.

Table 1. Nanomaterials' morphological and electric parameters.

Sample/solvent	HD (nm)	PDI	ζ-Potential (mV)
Au-cit/water	48 ± 1	0.55 ± 0.01	-37.6 ± 0.8
GO-PEI/water	40.8 ± 0.3	0.43 ± 0.02	-29.1 ± 0.7
GO-PEI-Au/water	157 ± 3	0.24 ± 0.01	+23.9 ± 0.2

AU-cit: Citrate-functionalized gold nanoparticle; GO: Graphene oxide; HD: Hydrodynamic diameter; PDI: Polydispersity index; PEI: Polyethyleneimine.

the LLC-WRC-256 and B16-F10 cell lines incubated (48 h) with both the GO-PEI-Au and Au-cit samples, with and without application of RF. The solid blue lines in the plots presented in Figures 4 & 5 represent the best curve fitting (Levenberg–Marquardt algorithm) using Equation 1. Figure 4 shows the cell viability data using the LLC-WRC-256 cell line. The upper panels in Figure 4A & B show the cell viability using the Au-cit sample without (panel A) and with (panel B) application of RF. The lower panels in Figure 4C & D show the cell viability using the GO-PEI-Au sample without (panel C) and with (panel D) application of RF. Regarding the influence of RF application on the cell viability, the trends observed while assessing the cell viability of the LLC-WRC-256 cell line were also replicated in the MTT assays carried out with the B16-F10 cell line (Figure 5).

10.2217/nnm-2023-0312

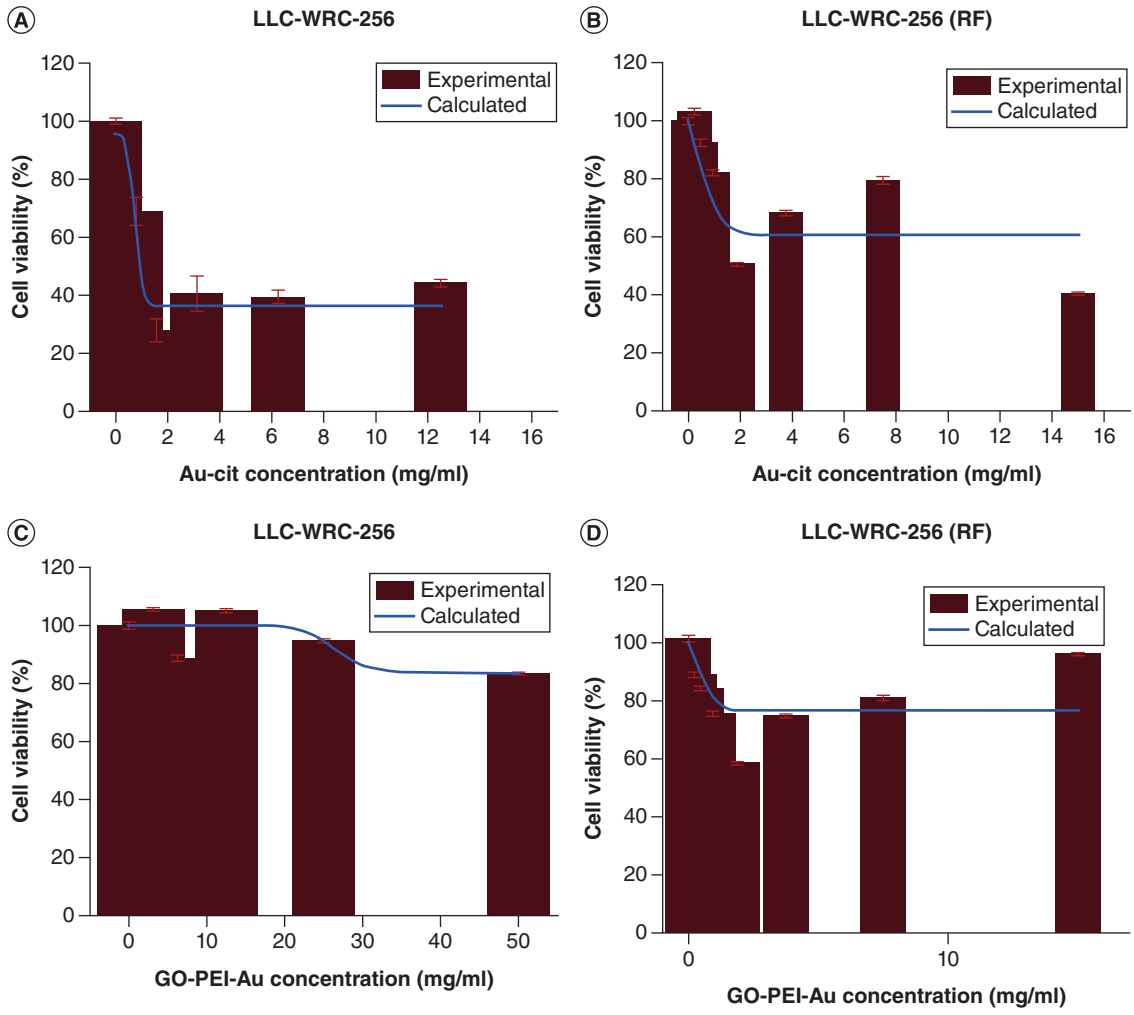


Figure 4. Cell viability data for the LLC-WRC-256 cell line. MTT cell viability data (vertical gray bars) and fittings were obtained while using the Hill model via Equation 1 (solid blue lines), without and with radiofrequency application (3 min) using the LLC-WRC-256 cell line incubated (48 h) with **(A)** Au-cit nanoparticles, **(B)** Au-cit nanoparticles plus RF, **(C)** GO-PEI-Au nanoparticles and **(D)** GO-PEI-Au nanoparticles plus RF.
AU-cit: Citrate-functionalized gold nanoparticle; GO: Graphene oxide; MTT: 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide; PEI: Polyethyleneimine; RF: Radiofrequency.

Discussion

A quick visual inspection of the data presented in Figure 4 reveals a tendency toward enhanced toxicity under the application of RF. This finding is more evident while using the GO-PEI-Au sample (Figure 4C & D), although the Au-cit sample (Figure 4A & B) also presents higher toxicity under RF application. The cell toxicity findings extracted from the visual inspection of the data presented in Figure 4 are fully corroborated while analyzing the parameters (V_0, V_1, K and E) extracted from the curve fittings using Equation 1 (Table 2). Without application of RF, the calculated values of BMD (Equation 2) and LD_{50} (Equation 3) for the Au-cit sample are about the same (1.3 μg/ml), as shown in Table 2 (last two columns). Importantly, under RF application, the values (about the same) of BMD (Equation 2) and LD_{50} (Equation 3) for the Au-cit sample drop down to 0.9 μg/ml (last two columns in Table 2), representing a reduction of about 30% in the dose required to provide the same level of cell toxicity (BMD and LD_{50}). More impressive are the BMD and LD_{50} values found for the GO-PEI-Au sample, calculated from the fitting parameters collected in Table 2 (LLC-WRC-256 cell line). Without application of RF, the BMD (20 μg/ml) and LD_{50} (23 μg/ml) values (GO-PEI-Au sample) are the largest among all findings collected in Table 2 and related to the LLC-WRC-256 cell line. Actually, these values show the enhanced biocompatibility of the GO-PEI-Au sample. However, under RF application the BMD and LD_{50} values (GO-PEI-Au sample) drop

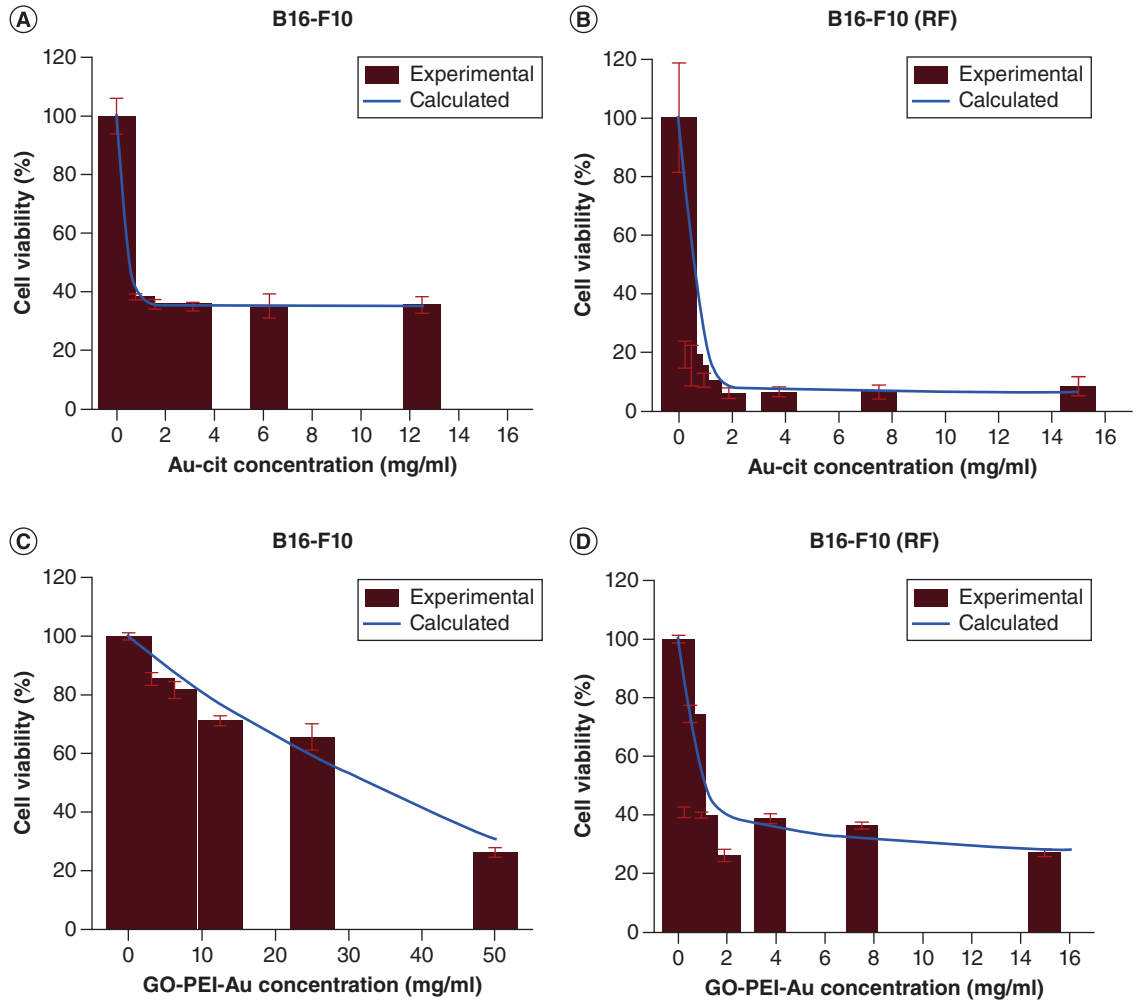


Figure 5. Cell viability data for the B16-F10 cell line. MTT cell viability data (vertical gray bars) and fittings were obtained while using the Hill model via Equation 1 (solid blue lines), without and with radiofrequency application (3 min) using the B16-F10 cell line incubated (48 h) with **(A)** Au-cit nanoparticles, **(B)** Au-cit nanoparticles plus RF, **(C)** GO-PEI-Au nanoparticles and **(D)** GO-PEI-Au nanoparticles plus RF.
AU-cit: Citrate-functionalized gold nanoparticle; GO: Graphene oxide; MTT: 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide; PEI: Polyethyleneimine; RF: Radiofrequency.

Table 2. Collected Hill model parameters for each cell line and proposed treatments.

Sample	V_0	V_1	K	E	BMD (μg/ml)	LD_{50} (μg/ml)
LLC-WRC-256						
Au-cit	100 ± 0.1	64.7 ± 0.1	0.023 × 0.002	3.1 ± 0.3	1.3	1.3
Au-cit + RF	3.2 ± 0.1	1.3 ± 0.2	0.2 ± 0.2	34 ± 20	0.9	0.9
GO-PEI-Au	98 ± 2	16 ± 6	4×10^{19}	13.7 ± 0.5	20	23
GO-PEI-Au + RF	4.5 ± 0.2	1.0 ± 0.2	0.02 ± 0.03	3 ± 1	0.08	0.1
B16-F10						
Au-cit	100.0 ± 0.1	64.7 ± 0.1	1.6 ± 0.1	3.06 ± 0.07	0.5	0.9
Au-cit + RF	64.8 ± 0.3	60.6 ± 0.3	0.041 ± 0.004	0.99 ± 0.08	0.004	0.03
GO-PEI-Au	96 ± 2	333 ± 20	139 ± 10	0.90 ± 0.02	119	625
GO-PEI-Au + RF	12.7 ± 0.5	12 ± 1	0.7 ± 0.1	0.3 ± 0.1	0.0002	0.2

The scale parameters (V0, V1), the dissociation constant, the Hill exponent, the benchmark dose and the 50% lethal dose are listed.
AU-cit: Citrate-functionalized gold nanoparticle; BMD: Benchmark dose; E: Hill exponent; GO: Graphene oxide; K: Dissociation constant; LD_{50}: 50% lethal dose; PEI: Polyethyleneimine; RF: Radiofrequency.

10.2217/nnm-2023-0312

down to 0.08 and 0.10 μg/ml, respectively. This is a remarkable BMD and LD_{50} reduction, indicating a huge enhancement in cytotoxicity, with a reduction of about 99.6% in the dose required to provide the same level of cell toxicity (BMD and LD_{50}).

Likewise, visual inspection of the data presented in Figure 5 (MTT with the B16-F10 cell line) reveals the same trend of enhanced toxicity under application of RF. Again, the calculated values of BMD and LD_{50} using the parameters (V_0, V_1, K and E) extracted from the curve fittings (Table 2) corroborate the visual inspection of the data presented in Figure 5. Without RF application, the calculated values of BMD and LD_{50} for the Au-cit sample are about 0.5 and 0.9 μg/ml, respectively (last two columns in Table 2). However, under RF application, the values of BMD and LD_{50} for the Au-cit sample drop down to 0.004 and 0.03 μg/ml (last two columns in Table 2), representing impressive reductions of about 99.2 and 96.7%, respectively, in the dose required to provide the same level of cell toxicity (BMD and LD_{50}). Even more impressive are the calculated values of BMD and LD_{50} for the GO-PEI-Au sample using Equations 2 & 3 and the fitted parameters (V_0, V_1, K and E). In this case, without RF application, the calculated values (GO-PEI-Au sample and B16-F10 cell line) of BMD and LD_{50} are impressively high, reaching 119 and 625 μg/ml, respectively (Table 2). These findings reveal the improved biocompatibility of the GO-PEI-Au sample while challenging the B16-F10 cell line. In deep contrast, under RF application, the calculated values of BMD and LD_{50} for the GO-PEI-Au sample (B16-F10 cell line) drop down to impressively low values, respectively equal to 0.0002 and 0.2 μg/ml (last two columns in Table 2), representing a reduction of about 99.9% in the dose required to provide the same level of cell toxicity (BMD and LD_{50}). This impressively high enhancement of cell toxicity provided by RF application while using the GO-PEI-Au sample to challenge the B16-F10 cell line, namely by a factor of about 6×10^5 in BMD and about 3×10^3 in LD_{50}, is even more significant given the high malignancy of the tested melanoma cell line (B16-F10) [50]. It is worth mentioning the enhanced biocompatibility of the GO-PEI-Au sample without RF application.

In addition to the BMD and LD_{50} evaluations presented in the two previous paragraphs, it is worth mentioning the impact of RF application on the dissociation constant (K) and Hill exponent (E), as collected in Table 2. The dissociation constant (K), meaning the reversible dissociation trend of the complex comprising the nanomaterial–cell membrane, is impressively impacted by RF application, regardless of the cell line tested (LLC-WRC-256 or B16-F10) or the nanomaterial employed (GO-PEI-Au or Au-cit). The dissociation constant (K) systematically reduces by orders of magnitude under RF application, as can be observed in the third column of Table 2. Likewise, the Hill exponent (E) is also sensitive to RF application, as can be observed in the data presented in the fourth column of Table 2. Moreover, cooperativity is reduced by RF application, although it does not change abruptly, such as from negative cooperativity ($E < 1$) to positive cooperativity ($E > 1$) and vice versa. Interestingly, the LLC-WRC-256 cell line presents positive cooperativity ($E > 1$) whereas the B16-F10 cell line presents mostly negative cooperativity ($E < 1$). It is worth mentioning that these two key parameters (K and E) are indeed proportionally correlated while RF is applied, meaning that, upon RF application, reduction of one parameter leads to reduction of the other one, as can be observed in the data collected in Table 2.

Table 3 collects relevant data regarding the systematic effect resulting from the RF application, using the two cell lines (LLC-WRC-256 and B16-F10) and the two MTT tested nanomaterials (GO-PEI-Au and Au-cit). The data in Table 3 emphasize the quenching of key parameters, such as the dissociation constant (K), the Hill coefficient (E), the BMD and the LD_{50}. The data were organized in terms of the ratio of each key parameter under RF application (RF) and no RF application (nRF). In this way, four ratio values were collected, namely K(RF/nRF), E(RF/nRF), BMD(RF/nRF) and LD_{50}(RF/nRF). Note that the ratios were intentionally organized in terms of the (RF/nRF) ratio, meaning that the lower the BMD(RF/nRF) and LD_{50}(RF/nRF) values, the higher the cell toxicity. A strong correlation was observed among all collected ratios, meaning that reduction of K(RF/nRF) and E(RF/nRF) was directly reflected in reduction of BMD(RF/nRF) and LD_{50}(RF/nRF). Actually, this finding is expected while expanding Equations 2 & 3 in terms of K and E and assuming first-order approximation. Indeed, as observed from the data collected in Table 3, the lower the K(RF/nRF) and E(RF/nRF) ratios, the lower the BMD(RF/nRF) and LD_{50}(RF/nRF) values. Moreover, this trend is systematically observed for the two tested cell lines (LLC-WRC-256 and B16-F10). Impressively, it is observed that the B16-F10 cell line is more sensitive to RF application than the LLC-WRC-256 cell line, regardless of the nanomaterial employed (GO-PEI-Au or Au-cit), although while under RF application the nanocomposite (GO-PEI-Au sample) promotes substantially higher cytotoxicity than the nanoparticle (Au-cit).

Another important aspect derived from the assessed MTT data is the highest biocompatibility of the GO-PEI-Au sample for both cell lines under no RF treatment; that is, comparatively the highest BMD (20 μg/ml) and LD_{50}

Table 3. Comparative Hill model parameters for each cell line, showing the ratio between the values with and without radiofrequency application.

Sample	K (RF/nRF)	E (RF/nRF)	BMD (RF/nRF)	LD_{50} (RF/nRF)
LLC-WRC-256				
Au-cit	6.7×10^{-6}	1.0	0.69	0.69
Au-cit + RF				
GO-PEI-Au	5.0×10^{-22}	0.2	4.0×10^{-3}	4.3×10^{-3}
GO-PEI-Au + RF				
B16-F10				
Au-cit	2.6×10^{-2}	0.3	4.0×10^{-3}	3.3×10^{-2}
Au-cit + RF				
GO-PEI-Au	5.0×10^{-3}	0.3	1.7×10^{-6}	3.2×10^{-4}
GO-PEI-Au + RF				

Four parameters were selected for comparison, namely K(RF/nRF), E(RF/nRF), BMD(RF/nRF) and LD_{50}(RF/nRF). The collected data show the positive impact of using the radiofrequency treatment.
AU-cit: Citrate-functionalized gold nanoparticle; BMD: Benchmark dose; E: Hill exponent; GO: Graphene oxide; K: Dissociation constant; LD_{50}: 50% lethal dose; nRF: No radiofrequency; PEI: Polyethyleneimine; RF: Radiofrequency.

(23 μg/ml) for the LLC-WRC-256 cell line and the highest BMD (119 μg/ml) and LD_{50} (625 μg/ml) for the B16-F10 cell line (Table 2). This behavior is repeated after 24 and 72 h of treatment (Supplementary Table 1). Conversely, under RF treatment, the GO-PEI-Au sample showed the highest cytotoxicity for both cell lines; that is, the lowest BMD (0.08 μg/ml) and LD_{50} (0.1 μg/ml) for the LLC-WRC-256 cell line and the lowest BMD (0.0002 μg/ml) and LD_{50} (0.2 μg/ml) for the B16-F10 cell line. Under RF treatment, the exceptional performance of the GO-PEI-Au sample while incubated with the B16-F10 cell line points to a significant promising direction to be explored in future animal assays using the RF therapy. This direction is particularly important as the B16-F10 cell line is a mouse melanoma model typically used in the study of antitumor therapy. The aggressiveness and limited successful therapies for melanoma cases worldwide strengthen the case for the exploration of the GO-PEI-Au nanocomposite platform in combination with RF therapy. This approach can be explored as an alternative therapy for aggressive and metastatic tumors. Likewise, LLC-WRC-256 is a rat breast carcinoma cell line commonly used to induce secondary brain tumors. Therefore, the observed superior performance of the GO-PEI-Au sample while incubated with this cell line under RF treatment also points to an important direction to be explored in future animal assays using RF therapy. In addition, the successful use of the GO-PEI-Au nanocomposite platform combined with RF therapy can be used to investigate important and typical neoplastic cell lines, such as 4T1 and Ehrlich, commonly used to carry out investigations in cancer preclinical models [51].

As far as the cytotoxicity is concerned, one should emphasize the superior performance of the GO-PEI-Au nanocomposite, either presenting very high biocompatibility under no RF application or else revealing exceptional enhancement in cytotoxicity while under RF application. The presence of PEI in the nanocomposite (GO-PEI-Au sample) is likely responsible for its improved biocompatibility (no RF application). PEI is a cationic polymer, widely used in drug delivery due to its ability to condense and protect therapeutic molecules. When GO is functionalized with PEI, producing the GO-PEI nanostructure, the created nanoplatform can encapsulate and deliver therapeutic agents directly to tumor cells [38]. Moreover, when PEI is used as nanomaterials' surface coating, electrostatic interaction with tumor cells is favored. This electrostatic driving adsorption can facilitate internalization of nanostructures by tumor cells, increasing antitumor efficacy [52]. Its role as a nonviral vector for nucleic acid is also known, being frequently used to deliver genetic material into cells [53]. The antitumor activity of the GO-PEI nanostructure may involve several mechanisms, including cellular internalization and interaction with tumor cells to induce cytotoxic or apoptotic effects [26]. The choice of AuNPs as a therapeutic agent to be delivered by the GO-PEI nanoplatform proved to be promising due to its performance in inhibiting the signaling of several important pathways for cancer biology, showing that AuNPs specifically target cancer cells. It has been shown that when inside cancer cells, AuNPs target tumor suppressor genes and oncogenes [54–56].

GO-PEI is planned to be a delivery platform for Au-NPs, while AuNPs are responsible for converting the incoming RF energy into heat. As a delivery platform, GO-PEI plays different roles. First, it prevents Au-NPs from flocculation. This is made possible by the relatively small size of GO sheets (around 100 nm) and their functionalization with PEI, which makes the GO sheets' stability less dependent on the medium's pH and ionic

strength. Second, PEI amine/imine groups coordinate to Au-NP surface atoms, thereby making AuNPs firmly attached to the platform. Simple physical mixing of GO, PEI and AuNPs synthesized independently would not ensure the colloidal stability needed to withstand the physiological medium.

Indeed, it is important to stress that the main driver in carrying out the present analysis, which is essentially based on the Hill model, resides in working toward reducing the number of *in vitro* assays while simultaneously providing a high degree of accuracy in the outcome data, both aspects being of ultimate importance for designing future experiments. Remarkably, the implementation of the Hill model allows one to assess the lethal doses, specifically the BMD and the LD_{50}, thus yielding precise indicators of the antitumor toxicity associated with each cell line under examination.

In the literature, it is observed that gold nanomaterials smaller than 10 nm are internalized in the form of clusters and enclosed in vesicles, indicating that the entry mechanism is mediated by endocytosis, reaching the cellular nucleus within 24 h [57]. It can be assumed that the presence of PEI, already known in the literature as a nonviral DNA vector [53], promotes the entry of GO-PEI-Au, accelerating the time of reach to the cellular nucleus. The repetitive ethylenimine units of PEI confer high aqueous solubility to these polymers, and their effectiveness lies in the ability to perform pH buffering, where in acidic environments, it promotes osmotic swelling of the endosome, leading to its rupture [26]. This unique property protects transferred nucleic acids from lysosomal degradation, thereby increasing *in vivo* transfection efficiency. Considering the nanosystem proposed in this study, the use of GO associated with PEI enhances its biocompatibility and carrier ability, accelerating the transfer of gold [58].

Inorganic nanoparticles have seen significant growth due to the versatile properties of nanosystems. While cationic polymer nanoparticles enhance cell transfection and demonstrate adjuvant immunomodulatory effects, concerns arise about the immunotropic characteristics of nanoparticles, especially metallic ones. AuNPs offer diverse effects on the immune response, depending on size and coatings, allowing for unique applications like photothermal therapy and drug delivery. Despite these advancements, the combined effects of AuNPs and cationic polymers within the tumor immunological microenvironment have been synthesized and tested [59]. Supplementary Table 2 shows recent studies with different types of nanocomposites, with gold, silver, GO and PEI.

In Supplementary Table 2, some synthesis methods using an external emission source, such as microwaves and green light-emitting diode, can be observed, but a significant portion of syntheses involves chemical agents [60,61]. The biological performance is also noteworthy, indicating that focuses on antimicrobial activity or blood and protein separation are quite viable [61–63]. Regarding antitumor activity, a promising trend is evident, particularly in breast cancer, aligning with one of the choices made in this study, specifically with the LLC-WRC 256 (Walker 256) cell line. Finally, from an innovative perspective, the use of GO in a modified form has also been proposed for wound healing [64].

A noteworthy observation pertains to the cell lines and the proposed combination therapy involving RF, the latter a well-established approach in oncology. The innovative proposition demonstrates significant promise, utilizing existing medical devices for localized thermal tumor ablation, alongside the nanomaterial evaluated within the dataset generated in this study [65]. Previous studies have introduced combined therapies involving percutaneous ablation, such as cryoablation with nanomaterials designed to encapsulate gallium nanoparticles, yielding notable outcomes. In a recent review of novel treatments encompassing photodynamic and photothermal therapies, Lara-Vega and Vega-López highlighted the limited assessment of their long-term effectiveness in preventing metastasis and recurrence or enhancing survival rates [66]. Another recent study explored the potential for hyperthermia protocols utilizing readily available devices in the market, particularly for breast cancer and melanoma [67]. The substantial advantage of these combined therapies lies in the availability of hyperthermia equipment and the presence of clinically trained professionals proficient in performing these procedures.

Conclusion

As a conclusion of this study, we observed that the parameters extracted while using the Hill model to analyze classical MTT cellular toxicity data provided important and robust information not revealed by simple qualitative observations as they are traditionally evaluated. In addition, the MTT assays employing seven concentrations of each nanomaterial allowed us to infer a set of information about the toxicity with precise determination of BMD and LD_{50} numbers, as well as data on the behavior of nanomaterials in terms of biocompatibility – in this case, the positive collaboration of the presence of PEI-, interaction with the cell membrane (cooperativity – Hill coefficient) and its binding characteristics (dissociation constant). The use of classical tumor cells to evaluate antitumor activity results in a remarkable benefit, thus allowing us to infer how promising the GO-PEI-Au nanocomposite is for

combined therapy with RF application. Impressively, this latter aspect of the present study opens up the way for a deeper investigation of the B16-F10 cell line in animal models, raising a huge expectation regarding melanoma therapy.

Summary points

- A nanocomposite was synthesized using graphene oxide, low-molecular-mass polyethyleneimine and gold (GO-PEI-Au).
- The viability was evaluated using two tumor cell lines, namely LLC-WRC-256 and B16-F10.
- We used the Hill model to assess the benchmark dose, the 50% lethal dose, the cooperativity and the dissociation constant while analyzing cell viability data.
- The nanomaterials were used to evaluate the antitumor potential while combined with radiofrequency therapy.
- The GO-PEI-Au nanocomposite alone is biocompatible against the LLC-WRC-256 and B16-F10 cancer cell lines.
- The application of radiofrequency enhanced the cell toxicity by orders of magnitude.
- The study points to prospective studies with the tested cell lines using tumor animal models.
- The use of the Hill model suggested in the article to evaluate the information obtained with viability curves enhances the translation of data verified in *in vitro* assays.

Supplementary data

To view the supplementary data that accompany this paper please visit the journal website at: www.futuremedicine.com/doi/suppl/10.2217/nnm-2023-0312

Author contributions

M Monteiro conceived and designed the analysis, collected the data, contributed data or analysis tools, performed the analysis and wrote the paper. M Mesquita collected the data, contributed data or analysis tools and performed the analysis. L Garcia collected the data, contributed data or analysis tools and performed the analysis. PR dos Santos collected the data, contributed data or analysis tools and performed the analysis. C Viveiros collected the data and contributed data or analysis tools. R da Fonseca collected the data, contributed data or analysis tools and performed the analysis. M Xavier collected the data, contributed data or analysis tools and performed the analysis. G de Mendonça contributed data or analysis tools, performed the analysis and revised the manuscript. S Rosa performed the analysis and revised the manuscript. S Silva contributed data or analysis tools and performed the analysis. L Paterno contributed data or analysis tools, performed the analysis and revised the manuscript. P Morais contributed data or analysis tools, performed the analysis and wrote the paper. S Bao performed the analysis and revised the manuscript.

Financial disclosure

The authors received financial support from the Brazilian agencies CNPq (grant no. 303557/2021-4), CAPES (grant no. 0001), FINEP (grant no. 01.08.0457.00) and FAPDF (grant no. 00193.00001066/2021-1; 00193.00000847/2021-71). The financial support was used to buy all the materials used in the experiments. The funding agencies also paid the first author scholarship. The authors have no other relevant affiliations or financial involvement with any organization or entity with a financial interest in or financial conflict with the subject matter or materials discussed in the manuscript apart from those disclosed. This includes employment, consultancies, honoraria, stock ownership or options, expert testimony, grants or patents received or pending, or royalties.

Competing interests discloure

The authors have no competing interests or relevant affiliations with any organization or entity with the subject matter or materials discussed in the manuscript. This includes employment, consultancies, honoraria, stock ownership or options, expert testimony, grants or patents received or pending, or royalties.

Writing disclosure

No writing assistance was utilized in the production of this manuscript.

References

Papers of special note have been highlighted as: • of interest; •• of considerable interest

1. Ahmed B, Qadir MI, Ghafoor S. Malignant melanoma: skin cancer-diagnosis, prevention, and treatment. *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.* 30(4), 291–297 (2020).
2. Gastman BR, Neumeister MW. A melanoma update. *Clin. Plast. Surg.* 48(4), xiii–xiv (2021).
3. Sung H, Ferlay J, Siegel RL *et al.* Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J. Clin.* 71(3), 209–249 (2021).

4. Lim M-H, Jeung IC, Jeong J *et al.* Graphene oxide induces apoptotic cell death in endothelial cells by activating autophagy via calcium-dependent phosphorylation of c-Jun N-terminal kinases. *Acta Biomater.* 46, 191–203 (2016).
5. Mohammadinejad R, Moosavi MA, Tavakol S *et al.* Necrotic, apoptotic and autophagic cell fates triggered by nanoparticles. *Autophagy* 15(1), 4–33 (2019).
6. Achawi S, Pourchez J, Feneon B, Forest V. Graphene-based materials *in vitro* toxicity and their structure–activity relationships: a systematic literature review. *Chem. Res. Toxicol.* 34(9), 2003–2018 (2021).
7. Byrne HJ, Maher MA. Numerically modelling time and dose dependent cytotoxicity. *Comput. Toxicol.* 12, 100090 (2019).
8. Wen M, Li J, Zhong W *et al.* High-throughput colorimetric analysis of nanoparticle–protein interactions based on the enzyme-mimic properties of nanoparticles. *Anal. Chem.* 94(24), 8783–8791 (2022).
9. Ayensa-Jiménez J, Pérez-Aliacar M, Randelovic T *et al.* Mathematical formulation and parametric analysis of *in vitro* cell models in microfluidic devices: application to different stages of glioblastoma evolution. *Sci. Rep.* 10(1), 21193 (2020).
10. Sengers BG, Please CP, Oreffo ROC. Experimental characterization and computational modelling of two-dimensional cell spreading for skeletal regeneration. *J. R. Soc. Interface* 4(17), 1107–1117 (2007).
11. Montes-Olivas S, Marucci L, Homer M. Mathematical models of organoid cultures. *Front. Genet.* 10, 873 (2019).
12. Dogra P, Butner JD, Chuang Y *et al.* Mathematical modeling in cancer nanomedicine: a review. *Biomed. Microdevices* 21(2), 40 (2019).

•• **Shows the new frontiers that can be solved with mathematical models.**

13. Dogra P, Butner JD, Ruiz Ramírez J *et al.* A mathematical model to predict nanomedicine pharmacokinetics and tumor delivery. *Comput. Struct. Biotechnol. J.* 18, 518–531 (2020).
14. Morais PC, Silva DC. Mathematical modeling for an MTT assay in fluorine-containing graphene quantum dots. *Nanomaterials* 12(3), 413 (2022).

•• **Shows the new frontiers that can be solved with mathematical models.**

15. Li J, Wang C, Yue L, Chen F, Cao X, Wang Z. Nano-QSAR modeling for predicting the cytotoxicity of metallic and metal oxide nanoparticles: a review. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 243, 113955 (2022).
16. Hill AV, Hill A, Paganini-Hill A. The possible effects of the aggregation of the molecules of hemoglobin on its dissociation curves. *J. Physiol.* 40, 4–7 (1910).

• **The mathematical model used in our study.**

17. Albanese A, Tang PS, Chan WCW. The effect of nanoparticle size, shape, and surface chemistry on biological systems. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 14(1), 1–16 (2012).
18. Sun X, Shi J, Zou X, Wang C, Yang Y, Zhang H. Silver nanoparticles interact with the cell membrane and increase endothelial permeability by promoting VE-cadherin internalization. *J. Hazard. Mater.* 317, 570–578 (2016).
19. Sabourian P, Yazdani G, Ashraf SS *et al.* Effect of physico-chemical properties of nanoparticles on their intracellular uptake. *Int. J. Mol. Sci.* 21(21), 8019 (2020).
20. Shi T, Sun X, He Q-Y. Cytotoxicity of silver nanoparticles against bacteria and tumor cells. *Curr. Protein Pept. Sci.* 19(6), 525–536 (2018).
21. Hanan N, Chiu H, Ramachandran M *et al.* Cytotoxicity of plant-mediated synthesis of metallic nanoparticles: a systematic review. *Int. J. Mol. Sci.* 19(6), 1725 (2018).
22. Kus-Liśkiewicz M, Fickers P, Ben Tahar I. Biocompatibility and cytotoxicity of gold nanoparticles: recent advances in methodologies and regulations. *Int. J. Mol. Sci.* 22(20), 10952 (2021).
23. Bhatti R, Shakeel H, Malik K *et al.* Inorganic nanoparticles: toxic effects, mechanisms of cytotoxicity and phytochemical interactions. *Adv. Pharm. Bull.* 12(4), 757–762 (2021).
24. Kawakami T, Miyajima A, Komoriya K, Kato R, Isama K. Effect of secondary particle size of nickel oxide nanoparticles on cytotoxicity in A549 cells. *J. Toxicol. Sci.* 47(4), 151–157 (2022).
25. Min Y, Suminda GGD, Heo Y, Kim M, Ghosh M, Son Y-O. Metal-based nanoparticles and their relevant consequences on cytotoxicity cascade and induced oxidative stress. *Antioxidants* 12(3), 703 (2023).
26. Yin Y, Li X, Ma H *et al. In situ* transforming RNA nanovaccines from polyethylenimine functionalized graphene oxide hydrogel for durable cancer immunotherapy. *Nano Lett.* 21(5), 2224–2231 (2021).

• **Shows the the advantages of polyethylenimine.**

27. Fiorillo M, Verre AF, Iliut M *et al.* Graphene oxide selectively targets cancer stem cells, across multiple tumor types: implications for non-toxic cancer treatment, via 'differentiation-based nano-therapy'. *Oncotarget* 6(6), 3553–3562 (2015).
28. Chugh H, Sood D, Chandra I, Tomar V, Dhawan G, Chandra R. Role of gold and silver nanoparticles in cancer nano-medicine. *Artif. Cells Nanomed. Biotechnol.* 46(Suppl.), 1210–1220 (2018).
29. Fan M, Han Y, Gao S *et al.* Ultrasmall gold nanoparticles in cancer diagnosis and therapy. *Theranostics* 10(11), 4944–4957 (2020).

30. Maeda M, Saeki I, Sakaida I *et al.* Complications after radiofrequency ablation for hepatocellular carcinoma: a multicenter study involving 9411 Japanese patients. *Liver Cancer* 9(1), 50–62 (2020).

31. Muhammad H, Santhanam P, Russell JO. Radiofrequency ablation and thyroid nodules: updated systematic review. *Endocrine* 72(3), 619–632 (2021).

32. He YZ, He K, Huang RQ *et al.* A clinical scoring system for predicting tumor recurrence after percutaneous radiofrequency ablation for 3 cm or less hepatocellular carcinoma. *Sci. Rep.* 11(1), 8275 (2021).

33. Markezana A, Goldberg SN, Kumar G *et al.* Incomplete thermal ablation of tumors promotes increased tumorigenesis. *Int. J. Hyperthermia* 38(1), 263–272 (2021).

•• **Shows the risks of incomplete radiofrequency ablation.**

34. Beyk J, Tavakoli H. Selective radiofrequency ablation of tumor by magnetically targeting of multifunctional iron oxide–gold nanohybrid. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 145(9), 2199–2209 (2019).

• **Shows the importance of the combined therapy with radiofrequency.**

35. Wang F, Xu C, Li G, Lv P, Gu J. Incomplete radiofrequency ablation induced chemoresistance by up-regulating heat shock protein 70 in hepatocellular carcinoma. *Exp. Cell Res.* 409(2), 112910 (2021).

36. Yang Z, Zhu Y, Dong Z *et al.* Tumor-killing nanoreactors fueled by tumor debris can enhance radiofrequency ablation therapy and boost antitumor immune responses. *Nat. Commun.* 12(1), 4299 (2021).

37. Yi L, Zhang Y, Shi X *et al.* Recent progress of functionalised graphene oxide in cancer therapy. *J. Drug Target.* 27(2), 125–144 (2019).

• **Shows the use of graphene oxide in cancer therapy.**

38. Sharma H, Mondal S. Functionalized graphene oxide for chemotherapeutic drug delivery and cancer treatment: a promising material in nanomedicine. *Int. J. Mol. Sci.* 21(17), 6280 (2020).

39. Dash BS, Jose G, Lu Y-J, Chen J-P. Functionalized reduced graphene oxide as a versatile tool for cancer therapy. *Int. J. Mol. Sci.* 22(6), 2989 (2021).

40. Ghasemi M, Turnbull T, Sebastian S, Kempson I. The MTT assay: utility, limitations, pitfalls, and interpretation in bulk and single-cell analysis. *Int. J. Mol. Sci.* 22(23), 12827 (2021).

41. Costa ÍA, Maciel AP, Sales MJA *et al.* Photocatalytic method for the simultaneous synthesis and immobilization of Ag nanoparticles onto solid substrates. *J. Phys. Chem. C* 122(42), 24110–24119 (2018).

42. Teixeira PR, Santos MSC, Silva ALG *et al.* Photochemically-assisted synthesis of non-toxic and biocompatible gold nanoparticles. *Colloids Surf. B Biointerfaces* 148, 317–323 (2016).

43. Wang F, Liu X, Lu C-H, Willner I. Cysteine-mediated aggregation of Au nanoparticles: the development of a H_2O_2 sensor and oxidase-based biosensors. *ACS Nano* 7(8), 7278–7286 (2013).

44. Da Fonseca RD, Santos PR, Monteiro MS *et al.* Parametric evaluation of impedance curve in radiofrequency ablation: a quantitative description of the asymmetry and dynamic variation of impedance in bovine *ex vivo* model. *PLOS ONE* 16(1), e0245145 (2021).

• **Show the parameters of radiofrequency ablation.**

45. Brigatte P, Sampaio SC, Gutierrez VP *et al.* Walker 256 tumor-bearing rats as a model to study cancer pain. *J. Pain* 8(5), 412–421 (2007).

46. Amaral LAD, Souza GHOD, Santos MR *et al.* Walker-256 tumor: experimental model, implantation sites and number of cells for ascitic and solid tumor development. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 62, e19180284 (2019).

47. Patton EE, Mueller KL, Adams DJ *et al.* Melanoma models for the next generation of therapies. *Cancer Cell* 39(5), 610–631 (2021).

48. Abdalla M, Collings AT, Dirks R *et al.* Surgical approach to microwave and radiofrequency liver ablation for hepatocellular carcinoma and colorectal liver metastases less than 5 cm: a systematic review and meta-analysis. *Surg. Endosc.* 37(5), 3340–3353 (2023).

49. Goutelle S, Maurin M, Rougier F *et al.* The Hill equation: a review of its capabilities in pharmacological modelling. *Fundam. Clin. Pharmacol.* 22(6), 633–648 (2008).

50. Nakamura K, Yoshikawa N, Yamaguchi Y, Kagota S, Shinozuka K, Kunitomo M. Characterization of mouse melanoma cell lines by their mortal malignancy using an experimental metastatic model. *Life Sci.* 70(7), 791–798 (2002).

51. De Oliveira JV, Oliveira Da Rocha MC, De Sousa-Junior AA *et al.* Tumor vascular heterogeneity and the impact of subtumoral nanoemulsion biodistribution. *Nanomedicine* 17(27), 2073–2088 (2022).

52. Yunus MA, Ramli MM, Osman NH, Mohamed R. Stimulation of innate and adaptive immune cells with graphene oxide and reduced graphene oxide affect cancer progression. *Arch. Immunol. Ther. Exp.* 69(1), 20 (2021).

53. Pandey AP, Sawant KK. Polyethylenimine: a versatile, multifunctional non-viral vector for nucleic acid delivery. *Mater. Sci. Eng. C* 68, 904–918 (2016).

54. Raoof M, Corr SJ, Zhu C *et al.* Gold nanoparticles and radiofrequency in experimental models for hepatocellular carcinoma. *Nanomed. Nanotechnol. Biol. Med.* 10(6), 1121–1130 (2014).

55. Tiloke C, Phulukdaree A, Anand K, Gengan RM, Chuturgoon AA. *Moringa oleifera* gold nanoparticles modulate oncogenes, tumor suppressor genes, and caspase-9 splice variants in A549 cells. *J. Cell. Biochem.* 117(10), 2302–2314 (2016).

56. Ferreira D, Fontinha D, Martins C, Pires D, Fernandes AR, Baptista PV. Gold nanoparticles for vectorization of nucleic acids for cancer therapeutics. *Molecules* 25(15), 3489 (2020).
57. Mellor RD, Uchegbu IF. Ultrasmall-in-nano: why size matters. *Nanomaterials* 12(14), 2476 (2022).
58. Jiang H-L, Islam MA, Xing L *et al.* Degradable polyethylenimine-based gene carriers for cancer therapy. *Top. Curr. Chem.* 375(2), 34 (2017).
59. Mulens-Arias V, Nicolás-Boluda A, Carn F, Gazeau F. Cationic polyethyleneimine (PEI)–gold nanocomposites modulate macrophage activation and reprogram mouse breast triple-negative MET-1 tumor immunological microenvironment. *Pharmaceutics* 14(10), 2234 (2022).
60. Taheri-Ledari R, Zhang W, Radmanesh M *et al.* Multi-stimuli nanocomposite therapeutic: docetaxel targeted delivery and synergies in treatment of human breast cancer tumor. *Small* 16(41), 2002733 (2020).
61. Zhao R, Kong W, Sun M *et al.* Highly stable graphene-based nanocomposite (GO-PEI-Ag) with broad-spectrum, long-term antimicrobial activity and antibiofilm effects. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 10(21), 17617–17629 (2018).
62. Jiang B, Liang Y, Wu Q *et al.* New GO-PEI-Au-L-Cys ZIC-HILIC composites: synthesis and selective enrichment of glycopeptides. *Nanoscale* 6(11), 5616–5619 (2014).
63. Deng N, Chen Y, Jiang B *et al.* A robust and effective intact protein fractionation strategy by GO/PEI/Au/PEG nanocomposites for human plasma proteome analysis. *Talanta* 178, 49–56 (2018).
64. Eivazzadeh-Keihan R, Radinekiyan F, Madanchi H, Aliabadi HAM, Maleki A. Graphene oxide/alginate/silk fibroin composite as a novel bionanostructure with improved blood compatibility, less toxicity and enhanced mechanical properties. *Carbohydr. Polym.* 248, 116802 (2020).
65. Wang X, Liang X-J, Zhang J, Chen J, Liu J. Protocol for designing and preparing gallium particles using cell membrane encapsulation for applications in melanoma cryoablation therapy. *STAR Protoc.* 3(4), 101826 (2022).
66. Lara-Vega I, Vega-López A. Combinational photodynamic and photothermal-based therapies for melanoma in mouse models. *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* 43, 103596 (2023).
67. Crezee J, Bakker A, Zweije R *et al.* Combined use of wIRA and microwave or radiofrequency hyperthermia. In: *Water-Filtered Infrared A (wIRA) Irradiation.* Vaupel P (Ed.). Springer International Publishing, Cham, Switzerland, 97–106 (2022).