

2.06.01 – Citologia e Biologia Celular.

AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA E DA CITOTOXICIDADE DAS NANOFOLHAS DE ÓXIDO DE GRAFENO ASSOCIADAS AO CLORETO DE ALUMÍNIO-FTALOCIANINA COMO AGENTES PARA TERAPIAS FOTODINÂMICA E FOTOTÉRMICA *IN VIVO*

Ana Luísa de G. da Silva^{1*}, Mayara Simonelly C. dos Santos², Ludmilla David de Moura³, Leonardo G. Paterno⁴, Paulo Eduardo N. de Souza⁵, Ricardo B. de Azevedo⁶, Sônia N. Bábó⁷

1. Estudante de IC do Instituto de Biologia do Departamento de Biologia Celular da UnB
2. Doutora em Biologia Molecular pela UnB
3. Doutoranda do Departamento de Biomembranas pela da Unicamp
4. Professor Adjunto do Instituto de Química da UnB
5. Docente do Instituto de Física da UnB
6. Professor Titular em Nanobiotecnologia da UnB
7. Professora Titular da UnB. Departamento de Biologia Celular/ Orientador

Resumo:

O câncer de mama é o segundo tipo de neoplasia mais incidente entre as mulheres brasileiras. Observando a invasividade dos tratamentos utilizados para o seu combate, o trabalho sugere a síntese de um nanossistema composto por nanofolhas de óxido grafeno e cloreto de alumínio-ftalocianina para a utilização em terapias fotodinâmicas e fototérmicas combinadas no tratamento do adenocarcinoma mamário murino *in vivo*.

O nanossistema (NanoGO-AIFtCl) foi obtido pelo método de exfoliação de Hummer's e apresentou um diâmetro hidrodinâmico de $128,5 \pm 2,2$ nm com um índice de polidispersão de 0,2. Sua ultraestrutura pôde ser observada por microscopia eletrônica de varredura e de transmissão. Os ensaios de viabilidade celular mostram uma redução de 65% das células tumorais quando comparadas ao controle. Já no ensaio *in vivo*, o tratamento não demonstrou efetividade na ablação tumoral. É possível concluir que o nanossistema possui um potencial, porém, observa-se a necessidade de novos ensaios *in vivo*.

Autorização legal: Autorização para os experimentos com animais pelo Comitê de Ética da Universidade de Brasília-UnB: Protocolo nº 9/2017.

Palavras-chave: Nanotecnologia; Câncer; Fototerapias.

Apoio financeiro: CNPq, CAPES, FAPDF, FINEP, FINATEC.

Trabalho selecionado para a JNIC pela instituição: UnB.

Introdução:

O adenocarcinoma mamário é o segundo tipo de câncer mais comum entre mulheres no mundo, contribuindo com 28% de novos casos a cada ano [1]. Os tratamentos utilizados para o seu combate são invasivos e com alta toxicidade sistêmica [2]. Nesse contexto, terapia fotodinâmica (TFD) e terapia fototérmica (TFT), têm ganhado destaque no tratamento de diversos tipos de cancer [3,4]. O Cloreto de Alumínio-Ftalocianina (AIFtCl), agente que exibe alta eficiência fotodinâmica, apresenta elevada hidrofobicidade em solventes biológicos, dificultando a sua administração sistêmica. Para contornar isso, sugere-se sua associação a plataformas nanoestruturadas, como o óxido de grafeno (GO), que oferecem extensa área superficial, biocompatibilidade e baixa citotoxicidade, funcionando como um excelente entregador de drogas [5,6]. Com isso, o presente trabalho sugere a associação de AIFtCl à nanofolhas de óxido de grafeno (NanoGO) para a utilização em TFD e TFT combinadas no tratamento do adenocarcinoma mamário murino *in vivo*.

Metodologia:

As NanoGO foram obtidas por meio de uma reação de carboxilação do óxido de grafeno e sua posterior sonicação. Após essas etapas, houve a adsorção do surfactante Pluronic F127 e o AIFtCl foi adicionado à solução de NanoGO sob agitação magnética. Em ambos os ensaios sugeridos, foram utilizadas células murinas de carcinoma mamário bioluminescentes (4T1-Luc) e realizou-se primeiramente a irradiação por LED (660 nm) seguido de laser (808 nm). Para a análise da viabilidade celular *in vitro* utilizou-se o método do MTT e foram estudados 5 diferentes grupos considerando a composição do nanossistema e as terapias sugeridas. No estudo *in vivo*, os animais foram implantados ortotopicamente com células 4T1-Luc e, após o tumor atingir o tamanho de ~ 100 mm³, os camundongos foram randomicamente divididos em 8 grupos (5 animais/grupo) para a iniciação dos tratamentos. A progressão tumoral foi analisada com o auxílio do equipamento IVIS Lumina XR *In Vivo* Imaging System (Caliper LifeSciences, USA).

Resultados e Discussão:

In vitro, NanoGO-AIFtCl apresentou diâmetro hidrodinâmico de $128,5 \pm 2,2$ nm com um índice de polidispersão de 0,2 e um potencial zeta de $-19,7 \pm 0,5$ mV. A ultraestrutura foliar de NanoGO-AIFtCl pôde ser visualizada por microscopia eletrônica de varredura (MEV) e de transmissão (MET). Na avaliação do efeito fototérmico do nanossistema, a amostra de água deionizada apresentou uma variação de temperatura de 4 °C, enquanto que, o NanoGO-AIFtCl obteve uma variação de 30 °C. As células 4T1-Luc, após o tratamento, mostraram uma redução da viabilidade celular estatisticamente significativa de 25%, quando comparadas ao controle, fato não observado em células de fibroblasto murino (NIH-3T3). No ensaio *in vivo*, optou-se pela inoculação intratumoral de 25 µL da solução de NanoGO-AIFtCl (0,71 mg/mL de GO, 0,7 mg/mL de AIFtCl). Nas concentrações utilizadas, o tratamento com NanoGO-AIFtCl e as terapias associadas não demonstraram efetividade, apresentando ausência na regressão do tamanho tumoral.

Conclusões:

Analisando o potencial zeta, observa-se que a adsorção do Pluronic à amostra, além de melhorar a estabilidade das nanofolhas, aumenta sua solubilidade em sistemas biológicos. Os ensaios *in vitro*, mostram que, o tratamento com NanoGO-AIFtCl associado as TFD e TFT combinadas [7], levou à produção de espécies reativas de oxigênio e ao aumento da temperatura, respectivamente, provocando um dano celular irreversível e uma diminuição da viabilidade celular como foi observado. Na análise *in vivo*, a ausência da redução tumoral mesmo após a realização de três tratamentos, pode ser justificada pela baixa concentração de AIFtCl utilizada e pelo ensaio de FTIR feito posteriormente, onde se observa uma intensa redução da fluorescência de AIFtCl em suspensão de NanoGO. Portanto, os dados obtidos *in vitro*, demonstram que o nanossistema possui um potencial no tratamento do câncer de mama, porém, o ensaio *in vivo*, sugere a necessidade de uma elevada concentração de AIFtCl para a redução do tamanho tumoral.

Referências bibliográficas

- [1]INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. Disponível em: <<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/inca/portal/home>>. Data de acesso: 03 de junho de 2017.
- [2]Gonzalez-Ângulo, A. M.; Morales-Vasquez, F.; Hortobagyi, G. N. Overview of resistance to systemic therapy in patients with breast cancer. **Adv. Exp. Med. Biol.**, 7(608):1-22,2007.
- [3]Sahu, A.; Choi, W. I.; Hyun, L.; Tae, G. Graphene oxide mediated delivery of methylene blue for combined photodynamic and photothermal therapy. **Biomaterials**, pp. 6239-6248, 2013.
- [4]Allison, R. R.; Sibata, C. H. Oncologic photodynamic therapy photosensitizer: **A clinical review. Science Direct**, pp. 61-75, 2010.
- [5]Li, Y.; Dong, H; Li, Y.; Shi, D. Graphene-based nanovehicles for phodynamic medical therapy. *International Journal of Nanomedicine*, pp. 2451-2458, 2015.
- [6]Wang, M.; Thanou, M. Targeting nanoparticles to cancer. *Pharmacological Research*, vol. 62, no. 2, pp. 90-99, 2010. [11] Dreyer, D. R.; Park, S.; Bielawsky, C. W.; Rouff, R. S. The chemistry of graphene oxide, **Chem. Soc. Rev.**, vol. 39, pp. 228-240, 2010.
- [7]Santos, M. S. C.; Gouvêa, A. L.; Moura, L. D.; Paterno, L. G.; Souza, P. E. N; Bastos, A. P.; Damasceno, E. A. M.; Veiga-Souza, F. H.; Azevedo, R. B.; Bão, S. N. Nanographene oxide-methylene blue as phototherapies platform for breast tumor ablation and metastasis prevention in syngeneic orthotopic murine model. **Journal of Nanobiotechnology**, 2018