



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**  
**FACULDADE DE CEILÂNDIA**  
**CURSO DE FARMÁCIA**

Wellington Tavares de Sousa Junior

**Avaliação *in vitro* de potenciais novos fotossensibilizantes  
para terapia fotodinâmica em células de câncer de mama  
murino**

Brasília  
2017

Wellington Tavares de Sousa Junior

**Avaliação *in vitro* de potenciais novos fotossensibilizantes para terapia  
fotodinâmica em células de câncer de mama murino**

Monografia de conclusão de curso  
apresentada como requisito parcial  
para obtenção do grau de  
Farmacêutico na Universidade de  
Brasília, Faculdade de Ceilândia.

Orientador: Prof. Dr. Luis Alexandre  
Muehlmann

Brasília

2017

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Sousa Junior, Wellington Tavares

SSO725 Avaliação in vitro de potenciais novos fotossensibilizantes para terapia fotodinâmica em células de câncer de mama murino. / Wellington Tavares Sousa Junior; orientador Luis Alexandre Muehlmann. -- Brasília, 2017.

52 p.

Monografia (Graduação - Farmácia) – Universidade de Brasília, 2017.

1. TFD. 2. Oxigênio Singlete. 3. Adenocarcinoma de Mama. 4. Células 4T1. I. Muehlmann, Luis Alexandre, orient. II. Título.

Wellington Tavares de Sousa Junior

**Avaliação *in vitro* de potenciais novos fotossensibilizantes para terapia  
fotodinâmica em células de câncer de mama murino**

**BANCA EXAMINADORA**

---

Orientador: Prof. Dr. Luis Alexandre Muehlmann  
(FCE/Universidade de Brasília)

---

Profa. Dra. Carine Royer  
(FCE/Universidade de Brasília)

---

Profa. Dra. Claire Nain Lunardi Gomes  
(FCE/Universidade de Brasília)

Brasília

2017

Dedico esse trabalho aos meus pais,  
Wellington e Inez, por tanto se  
esforçarem para que eu hoje pudesse  
realizar este sonho.

## **AGRADECIMENTOS**

Gostaria de agradecer primeiramente a Deus, pois sem ele nada é possível. Aos meus pais, por sempre apoiarem minhas decisões e por todo esforço para que eu pudesse ter uma educação de qualidade.

Gostaria de agradecer ao Dr. Luis Alexandre por ter me dado à oportunidade de estagiar no laboratório de Nanobiotecnologia sob sua orientação, onde pude desenvolver e aprimorar minhas práticas de laboratório, além de entender e aprender mais sobre o meio científico. Que o senhor continue com o seu ótimo trabalho, tanto na pesquisa quanto no ensino. Aos grandes mestres Mosar e Rayane, por toda paciência e por tudo que me ensinaram, e fico muito feliz em poder dizer eu aprendi com os melhores. A Janes por todos os conselhos e as boas conversas. Aos meus companheiros de iniciação científica, Victor, Thayná e Carine, por toda a ajuda e os bons momentos que tivemos no laboratório, sempre aprendendo e errando juntos.

E claro, a minha namorada, Deborah Morais, que foi essencial durante a minha jornada nesses cinco anos de faculdade, todos os conselhos, carinhos e incentivos, que você continue sempre com esse sorriso lindo e brilhando na sua carreira. Gostaria de agradecer as professoras Carine e Claire pelo aceite da banca, bem como a todos os professores da FCE, que foram essenciais para minha formação.

Não há estrada longa quando há  
algo que se busca.

Autor desconhecido.

## RESUMO

Sousa Junior, W. T. **Avaliação *in vitro* de potenciais novos fotossensibilizantes para terapia fotodinâmica em células de câncer de mama murino.** 2017. Monografia – Faculdade de Ceilândia, Universidade de Brasília, Brasília, 2017.

Diante das limitações do tratamento convencional do câncer de mama, outras modalidades terapêuticas têm sido propostas e, dentre elas, pode ser listada a terapia fotodinâmica (TFD). A TFD tem se apresentado como uma alternativa segura e eficaz no tratamento do câncer, no entanto, os principais fármacos fotossensibilizantes (FS) utilizados para esta terapia apresentam algumas desvantagens que interferem negativamente na eficácia e na segurança do tratamento. Desta maneira, o presente estudo teve como objetivo avaliar cinco novos compostos sintéticos como possíveis FS para a terapia fotodinâmica. Dos cinco compostos estudados, o composto 1 mostrou-se um bom candidato a FS, com boas características fotofísicas, pico de absorção de luz em 670 nm, capacidade de gerar oxigênio singlete e de reduzir a viabilidade de células 4T1 (câncer de mama murino) *in vitro*, quando fotoativado por luz vermelha e baixa citotoxicidade no escuro tanto em células 4T1 quanto em NIH-3T3 (fibroblasto murino). Após 15 minutos de exposição, o composto concentra-se principalmente nas organelas lisossomo, mitocôndria e retículo endoplasmático, que são componentes celulares chaves no mecanismo citotóxico da TFD.

**Palavras-chave:** TFD, oxigênio singlete, adenocarcinoma de mama, células 4T1.



---

## ABSTRACT

Sousa Junior, W. T. ***In vitro* evaluation of potential new photosensitizers for photodynamic therapy in murine breast cancer cells.** 2017. Monograph – Faculdade de Ceilândia, Universidade de Brasília, Brasília, 2017

In view of the limitations of the conventional treatment of breast cancer, others therapeutic modalities have been proposed and, among them, the photodynamic therapy (PDT) is listed. The PDT has been proven to be a safe and effective alternative in the treatment of cancer. However, the main photosensitizers (PS) used in this therapy have some disadvantages that negatively affect the efficacy and safety of the treatment. In this context, the present study aimed to evaluate five new synthetic compounds as possible PS for PDT. The compound 1 showed to be a good candidate as PS, with good photophysical characteristics, absorption in 670 nm, ability to generate singlet oxygen and to reduce cancer cell 4T1 viability under photoactivation and low cytotoxicity in the dark in both 4T1 and NIH-3T3 cells. After 15 minutes of exposure, the compound is mainly concentrated in organelles such as lysosome, mitochondria and endoplasmic reticulum, which are important cellular targets in PDT.

**Keywords:** PDT, singlet oxygen, breast adenocarcinoma, 4T1 cells.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Mecanismo de ação da terapia fotodinâmica, após fotoativação do fotossensibilizante. Adaptado de RAGHAVENDRA; KOREGOL; BHOLA, 2009 e PAULA, 2010. \_\_\_\_\_ 7
- Figura 2.** Estruturas dos compostos testados. **(A)** Composto 1. **(B)** Composto 2. **(C)** Composto 3. **(D)** Composto 4. **(E)** Composto 5. \_\_\_\_\_ 14
- Figura 3.** Esquema de tratamento com LED. RODRIGUES, 2014 (adaptado). 18
- Figura 4.** Espectro de Absorção dos compostos 1, 2, 3, 4, 5 e controle. \_\_\_\_\_ 20
- Figura 5.** Degradação do DBF em diferentes concentrações do fotossensibilizante (composto 1). Os dados estão representados como média  $\pm$  E. P. M. para triplicatas. \_\_\_\_\_ 21
- Figura 6.** **(A)** Viabilidade de células 4T1 tratadas com LED e **(B)** Viabilidade de células NIH-3T3 tratadas com LED por 30 minutos. Em vermelho, o grupo tratado e em preto, grupo de células controles mantidas ao abrigo da luz. Os dados estão representados como média  $\pm$  E. P. M. para quintuplicatas. \_\_\_\_\_ 21
- Figura 7.** **(A)** Viabilidade Celular de células 4T1, tratadas por 15 minutos, no escuro (preto) e irradiadas (vermelho) por LED, por 30 minutos. **(B)** Viabilidade Celular de células NIH-3T3, tratadas por 15 minutos, no escuro (preto) e irradiadas (vermelho) por LED, por 30 minutos. Os dados estão representados como média  $\pm$  E. P. M. para quintuplicatas. \*  $p < 0,05$  para TFD vs Escuro. \_\_\_ 22
- Figura 8.** Imagens de microscopia de fluorescência de células 4T1 tratadas com composto 1 na concentração de 6,25  $\mu\text{g/mL}$  por 15 minutos. **(A)** Núcleo marcado. **(D)** Mitocôndria marcada. **(G)** Lisossomo marcado. **(J)** Retículo Endoplasmático marcado. **(B), (E), (H) e (K)** Em vermelho, FS. **(C), (F), (I) e (L)** Sobreposição das imagens. \_\_\_\_\_ 24

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1.** Lista de materiais e reagentes utilizados nos experimentos \_\_\_\_\_ 12

**Tabela 2.** Lista de equipamentos utilizados nos experimentos \_\_\_\_\_ 13

---

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

4T1	Adenocarcinoma mamário murinho
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
CC 50 %	Concentração que reduz em 50 % a viabilidade celular
DAPI	4,6-Diamidino-2-Phenylindole, Dihydrochloride
DBF	1,3-difenil-isobenzofurano
DMSO	Dimetilsulfóxido
DMEM	<i>Meio Eagle modificado por Dulbecco</i>
E.P.M.	Erro Padrão da Média
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FDA	Food and drug administration
FS	Fotossensibilizante
LED	Diodo emissor de luz
MCI	Morte Celular Imunogênica
MTT	3-(4,5-Dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolio brometo
PBS	Tampão fosfato salina
pH	potencial Hidrogeniônico
RPMI	<i>Meio do Instituto Memorial Park Roswell</i>

---

## LISTA DE SÍMBOLOS

$\lambda$	comprimento de onda
$^{\circ}\text{C}$	Graus Celsius
$\text{J}/\text{cm}^2$	Joule por centímetro quadrado
$\mu\text{L}$	Microlitros
$\mu\text{g}$	Microgramas
$\mu\text{g}/\text{mL}$	Micrograma por mililitro
$\text{mg}$	Miligramas
$\text{mL}$	Mililitros
$\text{nm}$	Nanômetros

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	i
<b>ABSTRACT</b> .....	ii
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	iii
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	iv
<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS</b> .....	v
<b>LISTA DE SÍMBOLOS</b> .....	vi
<b>SUMÁRIO</b> .....	vii
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>2. REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	2
<b>2.1. Câncer de Mama</b> .....	2
2.1.1. Sinais e Sintomas .....	2
2.1.2. Fatores de Risco .....	3
2.1.3. Principais Tratamentos .....	3
<b>2.2. Terapia Fotodinâmica</b> .....	5
2.2.1. Mecanismo de Ação .....	6
2.2.2. Fonte de Luz .....	7
2.2.3. Fotossensibilizantes .....	8
<b>3. JUSTIFICATIVA</b> .....	10
<b>4. OBJETIVOS</b> .....	11
<b>4.1. Objetivo Geral</b> .....	11
<b>4.2. Objetivos específicos</b> .....	11
<b>5. MÉTODOS</b> .....	12
<b>5.1. Materiais</b> .....	12
<b>5.2. Compostos</b> .....	13
<b>5.3. Caracterização fotofísica</b> .....	14
<b>5.4. Capacidade de produção de Oxigênio Singlete</b> .....	14
<b>5.5. Avaliações <i>in vitro</i></b> .....	15
5.5.1. Linhagens celulares .....	15
5.5.2. Cultivo Celular .....	15
5.5.3. Ensaio de viabilidade celular pelo método MTT .....	17
5.5.4. Tratamento com o LED .....	17
5.5.5. Distribuição intracelular .....	18
5.5.6. Análises Estatística .....	19

---

<b>6. RESULTADOS</b> .....	20
<b>6.1. Características Fotofísicas</b> .....	20
<b>6.2. Capacidade de Produção de Oxigênio Singlete</b> .....	20
<b>6.3. Tratamento com LED</b> .....	21
<b>6.4. Terapia Fotodinâmica</b> .....	22
<b>6.5. Distribuição Intracelular</b> .....	23
<b>7. DISCUSSÃO</b> .....	25
<b>8. CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	28
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	29

## 1. INTRODUÇÃO

O câncer é uma das causas mais importantes de mortalidade e morbidade no mundo, sendo observados cerca de dez milhões de novos casos e mais de seis milhões de mortes por ano. De todos os tipos de câncer, com exceção do câncer de pele não melanoma, o câncer de mama é o mais incidente nas mulheres no mundo (US, 2007a), sendo a segunda causa de morte relacionada ao câncer em todo o mundo (JEMAL et al, 2011). A metástase é a principal causa de mortalidade em pacientes com câncer de mama e, apesar dos avanços nas opções terapêuticas, aproximadamente 30% dos pacientes com câncer de mama, evoluem para o estabelecimento de metástases (O'SHAUGHNESSY, 2005).

Os três tratamentos tradicionalmente usados contra o câncer são a quimioterapia, a radioterapia e a cirurgia. No entanto, a quimioterapia e radioterapia apresentam inúmeros efeitos colaterais negativos, além de nem sempre serem eficazes. Diante disso, alternativas vêm sendo propostas para o tratamento do câncer, dentre as quais pode ser citada a terapia fotodinâmica. (SIMPLICIO; MAIONCHI; HIOKA, 2002).

A terapia fotodinâmica (TFD) tem se apresentado como uma alternativa segura e eficaz no tratamento de diversos tipos de cânceres. A TFD baseia-se na ativação de substâncias fotossensibilizantes (FS) que, após internalizadas pelas células tumorais, são excitadas por luz em um comprimento de onda específico, passando para um estado eletrônico excitado. O FS excitado pode interagir com o oxigênio molecular formando o oxigênio singlete, o qual é altamente oxidante e citotóxico para a célula tumoral (WIEDER et al, 2006).

Dentre as características ideais de um FS, podem ser listadas: pureza química, o acúmulo preferencial em tecidos tumorais, a ativação em comprimentos de onda na região do vermelho e infravermelho próximo, a capacidade de produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), rápida eliminação tecidual e baixa toxicidade no escuro (PLAETZER et al, 2009; BERLANDA; VERCELLINI; FEDELE, 2010).



---

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1. Câncer de Mama

O câncer de mama é uma doença maligna que acomete as mamas e que, como outros tipos de câncer, apresenta algumas características que o diferenciam do tecido normal, como por exemplo, distúrbios na maturação e mecanismos de morte celular, e perda de inibição da proliferação por contato, que levam a um crescimento desordenado e descontrolado das células. Essa patologia é uma doença multifatorial, provocada por mutações genéticas nas células mamárias, levando à formação de células atípicas (CÂNDIDO et al, 2016).

O câncer de mama pode ser classificado como carcinoma *in situ* ou invasivo, sendo o primeiro caracterizado por células malignas restritas à membrana basal dos ductos e lóbulos. Já os carcinomas invasivos ou infiltrantes são aqueles em que as células neoplásicas penetram a membrana basal espalhando-se pelo organismo (AGUILLAR; BAUAB; MARANHÃO, 2009), podendo ser ductal ou lobular (CÂNDIDO et al, 2016). O carcinoma ductal invasivo é o tipo mais comum de câncer de mama, inicia-se em um duto de leite e, após o seu rompimento, cresce no tecido adiposo da mama, podendo se espalhar para outras partes do corpo através do sistema linfático e da circulação sanguínea. Em contraponto, o lobular invasivo começa nas glândulas produtoras de leite (lobos), podendo também se espalhar para outras partes do corpo (CÂNDIDO et al, 2016).

#### 2.1.1. Sinais e Sintomas

O sinal físico mais comum do câncer de mama é a presença do nódulo indolor. Por vezes, o câncer de mama se espalha para linfonodos axilares com a presença de um caroço ou inchaço, antes mesmo que o tumor primário apresente um tamanho suficiente para ser sentido. Outros sinais e sintomas comuns incluem: dor ou peso no peito, alterações persistentes da mama, tais como inchaço, espessamento ou vermelhidão da pele da mama e

---

anormalidades no mamilo, como corrimento espontâneo de sangue ou outros fluidos, erosão ou retração (US, 2015b).

### 2.1.2. Fatores de Risco

Entre os principais fatores de risco para o desenvolvimento de câncer de mama estão: a idade avançada, características reprodutivas, história familiar, hábitos de vida e influências ambientais (SILVA; RIUL, 2011).

Com relação às características reprodutivas, o risco se dá porque o câncer de mama é estrogênio-dependente, fator que está relacionado ao maior número de incidência em mulheres (CANTINELLI et al, 2006), e compreendem eventos como menarca precoce (aos 11 anos ou menos), menopausa tardia (aos 55 anos ou mais), primeira gestação após os 30 anos e a nuliparidade (BRASIL, 2002a).

A história familiar está relacionada à presença de um ou mais parentes de primeiro grau com a doença antes dos 50 anos, um ou mais parentes de primeiro grau com câncer de mama bilateral ou câncer ovariano em qualquer idade, parente com câncer de mama masculina, câncer de mama e/ou doença mamária benigna prévia (BRASIL, 2002a; BRASIL, 2008b).

A obesidade é considerada um dos fatores de risco relacionados aos hábitos de vida (CIBEIRA; GUARAGNA, 2006), pois está associado ao estado inflamatório no qual facilita o desenvolvimento tumoral (MENDES et al, 2011). O uso regular de álcool, acima de 60 g por dia também é considerado um hábito de vida que apresenta riscos, pois o metabólito acetaldeído do álcool é carcinogênico, mutagênico, estimulador da produção de estrogênio e imunodepressor (CANTINELLI et al, 2006). A principal influência ambiental é a exposição prévia às radiações ionizantes, sendo proporcional à dose e à frequência de exposição (BRASIL, 2002a).

### 2.1.3. Principais Tratamentos

O tratamento do câncer de mama é dividido em duas classes: sistêmico, realizado por hormonioterapia e quimioterapia, e locorregional, feito através de

procedimento cirúrgico e radioterapia. A escolha da modalidade terapêutica depende de fatores como o tipo do câncer e seu estadiamento (WHO, 2008).

O tratamento primário para a patologia é a intervenção cirúrgica, chamada de mastectomia, com objetivo de retirada do tumor. Esse procedimento também pode atingir outros locais próximos ao tumor, como tecidos circundantes, linfonodos da região axilar ou até mesmo a retirada completa da mama. O procedimento cirúrgico mais utilizado é a mastectomia radical modificada, onde se tem a retirada total da mama juntamente com os linfonodos axilares (SILVA L, 2008). Um dos problemas enfrentados neste procedimento é o desenvolvimento de linfedema no membro superior após a remoção de linfonodos axilares que pode levar a alterações físicas e funcionais (CANTINELLI et al, 2006).

A radioterapia é um tratamento realizado através da aplicação de radiação ionizante em células cancerosas, danificando a estrutura do seu DNA, interferindo desta forma no crescimento tumoral e na metástase (SEPAH; BOWER, 2009). A radioterapia pode curar o câncer, quando é usado com objetivo de eliminar um tumor; ser paliativo, atuando na redução de sintomas como dor, sangramentos e desconfortos respiratórios; e adjuvante, quando o objetivo é eliminar células malignas que possam levar à recidiva do câncer (RATH, 2002). A radioterapia apresenta vários efeitos adversos, dentre os quais podem ser citados lesões de pele, falta de apetite, queda de cabelo, náuseas, diarreia, dificuldades para engolir e desidratação de mucosas (CANCER COUNCIL VICTORIA, 2009).

Dentre os tratamentos sistêmicos temos a hormonoterapia, geralmente usada em pacientes que têm tumores que superexpressam receptores hormonais para estrógeno e progesterona. Outras formas de tratamento sistêmico do câncer de mama são a imunoterapia, que geralmente consiste na utilização do anticorpo anti-Her-2/neu que age contra o fator de crescimento epitelial Her-2-neu, e a quimioterapia, que é indicada para pacientes com chance de reincidência e em pacientes com tumores que não expressam receptores hormonais (CANTINELLI et al, 2006).

Para o tratamento do câncer de mama, os agentes quimioterápicos mais utilizados são os agentes alquilantes, como a ciclofosfamida; os antimetabólitos, como fluorouracil e o metotrexato; os antraciclícos, como a

doxorubicina, e, mais recentemente, os taxanos, como o paclitaxel e docetaxel (ROCHÉ et al, 2006).

No entanto, esses fármacos apresentam vários efeitos adversos devido a sua usualmente baixa especificidade para células tumorais, podendo causar efeitos citotóxicos tanto nas células cancerosas quanto nas células normais do organismo, com afinidade pelas células que estão em divisão celular (MAROSOTICA, 2011). Esses fármacos apresentam também efeitos adversos importantes no trato gastrointestinal, tais como náuseas, vômitos, diarreia, constipação e anorexia (KALEY; DEANGELIS, 2009).

## **2.2. Terapia Fotodinâmica**

A TFD pode ser definida como um processo que envolve reações fotoquímicas que causam destruição seletiva de um tecido. É uma técnica terapêutica que envolve de duas principais etapas: utilização de uma molécula FS, por via tópica ou sistêmica, seguida da irradiação do tecido alvo com luz de comprimento que ative o FS (KURWA; BARLOW, 1999; KALKA; MERK; MUKHTAR, 2000).

Clinicamente, a TFD já é utilizada no tratamento de alguns tipos de câncer, tais como os de pulmão, intestino, trato digestivo superior, bexiga, dentre outros (MACHADO, 2000). Ainda, numerosas pesquisas investigam a aplicação da TFD atualmente para controle, prevenção e cura do câncer de pele do tipo não melanoma (BROWN; BROWN; WALKER, 2004; BRAATHEN; SZEIMIES; SEGUIN, 2007). Este tratamento tem-se mostrado uma modalidade clínica promissora para o tratamento do câncer, oferecendo a possibilidade de remissão ou mesmo ação paliativa em alguns tipos de câncer, tendo ainda outras aplicações, tais como em terapias antimicrobianas (MACHADO, 2000).

Dentre as vantagens do uso desta terapia podem ser citados a baixa probabilidade de desenvolvimento de resistência ao fármaco FS nas células cancerosas, a possibilidade de associação com outras terapias e redução do desfiguramento quando comparada à cirurgia, devido ao fato da destruição tecidual ser mais seletiva (MERKEL; BIEL, 2001). Ainda, a TFD apresenta dupla seletividade, conferida pela seletividade do FS às células cancerosas,

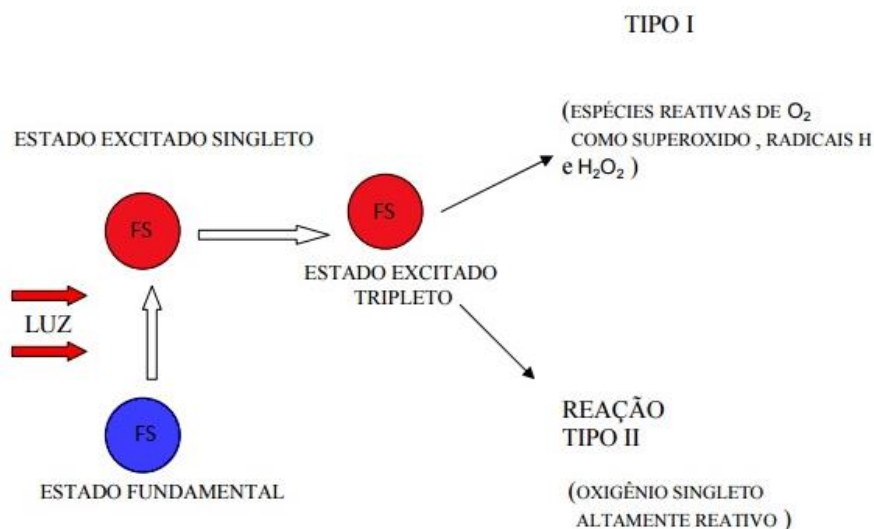
---

bem como pelo uso da luz que pode ser focalizada sobre o tecido alvo (PERUSSI, 2007).

### 2.2.1. Mecanismo de Ação

A TFD baseia-se na administração do FS, seguida da irradiação do tecido tumoral com luz. O FS é excitado pela luz e transfere energia e/ou elétrons para o oxigênio molecular, levando à formação de espécies reativas de oxigênio (EROs), gerando um estresse oxidativo no tecido tumoral e conseqüentemente, morte da célula cancerosa, por apoptose e/ou necrose (BONNETT, 1995; KANEKO et al, 2004).

A produção de EROs pode ocorrer através de dois mecanismos chamados de tipo I e tipo II (Figura 1). O FS é excitado pela luz passando de seu estado singlete fundamental ( $S_0$ ) para o estado singlete excitado ( $S_1$ ). A partir deste estado, o FS pode retornar ao estado fundamental  $S_0$  por fluorescência, ou através do cruzamento intersistema, atingir o estado triplete excitado ( $T_1$ ). A partir do estado  $T_1$ , dois tipos de reações podem ocorrer. O FS pode liberar energia por fosforescência ou transferir elétrons (mecanismo tipo I), gerando radical superóxido, e/ou transferir energia para o oxigênio no estado fundamental (mecanismo tipo II), promovendo a conversão do oxigênio triplete fundamental a oxigênio no estado singlete (FOOTE, 1976). O oxigênio singlete é considerado o componente citotóxico principal na TFD (YANO et al, 2011). As EROs formadas reagem com biomoléculas celulares, levando eventualmente à morte do tecido tumoral (VIA; MAGNO, 2001). A citotoxicidade da TFD depende principalmente das propriedades físico-químicas do FS utilizado, da presença de oxigênio no tecido alvo, e das doses de FS e de luz empregadas (MA, 2012).



**Figura 1.** Mecanismo de ação da terapia fotodinâmica, após fotoativação do fotossensibilizante. Adaptado de RAGHAVENDRA; KOREGOL; BHOLA, 2009 e PAULA, 2010.

### 2.2.2. Fonte de Luz

As primeiras fontes de luz a serem utilizadas nesta modalidade terapêutica foram as lâmpadas convencionais, com luz não coerente e policromática. Com o surgimento dos equipamentos a lasers, esta nova fonte de luz se mostrou mais eficiente que as lâmpadas convencionais (ACKROYD et al, 2001).

O laser apresenta vantagens como monocromaticidade, coerência, e direcionalidade, devido à capacidade da luz de se propagar em uma única direção (SOUSA, 2001). A policromaticidade da fonte faz com que grande parte da energia fora da faixa de absorção do FS seja depositada no tecido, levando a reações adversas, como aquecimento e diminuição da sua eficiência (FERREIRA, 2003).

Devido ao alto custo da aquisição, manutenção e treinamento para uso dos lasers, foram desenvolvidas novas fontes, baseadas em dispositivos de LEDs (diodos emissores de luz- *Light Emitting Diode*) (MACHADO, 2000). Os LEDs são uma fonte de luz alternativa para a terapia fotodinâmica, que também podem ser utilizados para ativação do fotossensibilizante e assim como os

---

lasers, é monocromático (WALSH, 2003). Ainda, estes equipamentos podem ser projetados para emitir luz com comprimentos de ondas específicos, e podem ser de baixo custo, portáteis, e de fácil manuseio (MACHADO, 2000).

### 2.2.3. Fotossensibilizantes

Além da luz, a TFD depende também de uma substância fotossensibilizante, que é o principal ativador dos processos fotofísicos e fotodinâmicos (KONOPKA; GOSLINSKI, 2007). Os FS são compostos atóxicos no escuro ou de baixa toxicidade, que em seu estado fundamental são inativos e possuem a características fotosíficas que permitem a absorção da luz (JORI, 2006). Em função da habilidade de absorverem luz com alta eficiência em alguma região do espectro, alguns desses compostos (colorantes, pigmentos, corantes ou fotossensibilizantes), possuem a capacidade de induzir ou de participar de mecanismos fotoquímicos (MACHADO, 2000; PERUSSI, 2007).

Quanto às características fotofísicas favoráveis, um ponto importante é o comprimento de onda da luz necessária para a excitação do composto. Na região visível, quanto maior o comprimento de onda da luz incidente maior será a penetração no tecido. Desta maneira, fármacos desenvolvidos para TFD devem ser corantes, cromóforos que absorvam na região próxima ao infravermelho (LEVY, 1995). Além destas características fotosíficas, os FS considerados ideais precisam ter alguns requisitos importantes, tais como: baixa toxicidade no escuro, capacidade de produção de ERO, acúmulo preferencial em células cancerosas e rápida eliminação pelo organismo (STERNBERG; DOLPHIN; BRÜCKNER, 1998).

Os derivados de hematoporfirina (HpD) compõem o primeiro grupo de FS produzidos para TFD e são chamados de FS de primeira geração. Estes são produzidos a partir da hematoporfirina IX, presente no sangue (DOUGHERTY, 1987; MIRONOV; NIZHNIK; NOCKEL, 1990). Esta classe apresenta algumas desvantagens como o acúmulo em células epiteliais, necessitando que o paciente evite luz solar de 4 a 6 semanas após seu uso, além de baixa absorção da luz no comprimento de onda ideal para TFD (CARVALHO, 2001).

Devido às desvantagens dos fotossensibilizantes de 1ª geração, têm-se desenvolvido novos derivados mais seletivos e ativos, surgindo então os FS de

segunda geração. Alguns destes fotossensibilizantes de 2ª geração são as clorinas, bacterioclorinas e ftalocianinas. Estas substâncias apresentam algumas propriedades fotofísicas desejáveis, como é o caso das clorinas, com absorção entre 660 e 690 nm, e apresentam a vantagem de se localizarem rapidamente nas células cancerosas (CALVETE; GOMES; MOURA, 2009).

Apesar destas características ideais, as ftalocianinas e os outros FS apresentam um caráter hidrofóbico, dificultando sua aplicação em soluções aquosas devido à formação de agregados, interferindo na sua eficácia, além de outras desvantagens tais como baixa seletividade tumoral e a necessidade de altas doses de medicamentos para sua eficácia (SCHNEIDER et al, 2005). Diante de tais desvantagens, foram desenvolvidos os FS de terceira geração por meio da associação dos FSs de segunda geração a sistemas de carreadores tais como lipossomas, nanopartículas, micelas e anticorpos (SOBOLEV; JANS; ROSENKRANZ, 2000; MALAM; LOIZIDOU; SEIFALIAN, 2009).



### 3. JUSTIFICATIVA

Um dos primeiros FS baseados em porfirina é o *Photofrin*®, aprovado pelo FDA (*Food and Drug Administration*) para uso na TFD no tratamento do câncer, sendo o FS mais utilizado até agora (YANO et al, 2011). No entanto não é o mais adequado, já que entre os seus efeitos colaterais está à indução de prolongada fotosensibilidade dérmica devida à sua eliminação lenta pelo organismo. Além disto, este FS absorve luz em um comprimento de onda com baixo poder de penetração nos tecidos, o que diminui a sua eficácia em camadas mais profundas de tecidos, e apresenta baixa seletividade pelo tecido tumoral e constituição complexa, o que dificulta o seu isolamento e purificação (MACHADO, 2000; SILVA, A., 2003). Nesse contexto, surge a necessidade do desenvolvimento de novos fotossensibilizantes para TFD para tratamento do câncer.

## **4. OBJETIVOS**

### **4.1. Objetivo Geral**

Avaliar novos compostos sintéticos como possíveis FS para o uso em TFD anticâncer.

### **4.2. Objetivos específicos**

- Caracterizar fotofisicamente os compostos;
- Avaliar a capacidade de produção de oxigênio singlete dos FS;
- Verificar a atividade dos compostos após a TFD em ensaio de viabilidade em células de adenocarcinoma de mama murino (4T1) e fibroblastos murinos (NIH-3T3) *in vitro*;
- Analisar a distribuição intracelular do FS em células 4T1 *in vitro*.

## 5. MÉTODOS

Os presentes experimentos foram realizados no Laboratório de Nanobiotecnologia – Departamento de Genética e Morfologia, localizado no Instituto de Biologia – Universidade de Brasília (UnB).

### 5.1. Materiais

**Tabela 1.** Lista de materiais e reagentes utilizados nos experimentos

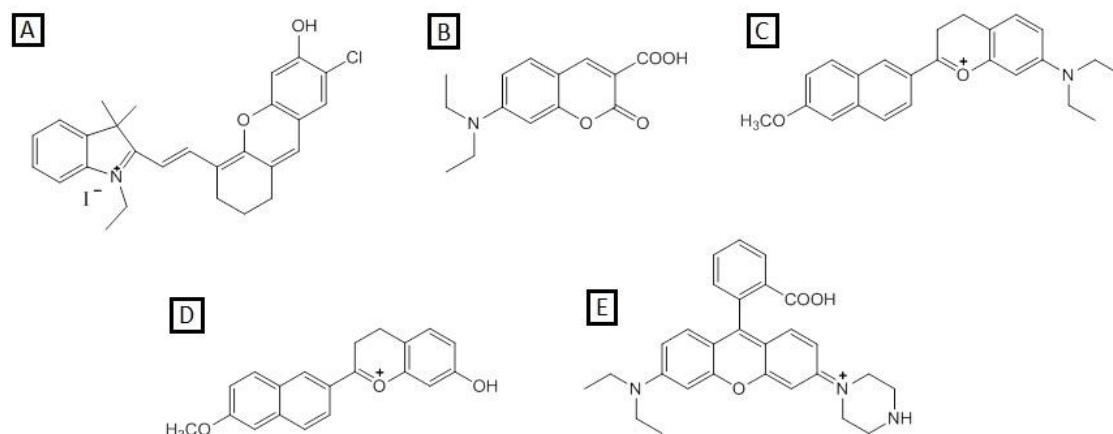
<b>Materiais</b>	<b>Fabricante</b>
Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)- 2,5-difeniltetrazólio (MTT)	Invitrogen, EUA
1,3-difenil-isobenzofurano (DBF)	Sigma-Aldrich Co., USA
Azul de tripan	Sigma, EUA
Dimetilsulfóxido (DMSO) (≥99,5%)	Sigma, EUA
Meio do Instituto Memorial Park Roswell (RPMI)	Gibco, EUA
Meio Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM)	Gibco, EUA
Antibiótico (Penicilina e Estreptomicina)	Gibco, EUA
Soro fetal bovino	Gibco, EUA
Solução salina tamponada com fosfato (PBS)	Laborclin, Brasil
Tripsina	Gibco, EUA
Hemocitômetro de Neubauer	C. A. Hausser & Son, USA
Frascos de Cultura (75 cm <sup>2</sup> )	TPP, CHE
Lamínulas para Microscopia (redondas)	Glasscyto
Microplacas (12 e 96 poços)	TPP, CHE

**Tabela 2.** Lista de equipamentos utilizados nos experimentos

<b>Equipamentos</b>	<b>Modelo</b>	<b>Fabricante</b>
Balança Analítica	AA200	Denver Instrument, USA
Banho Maria	240-2	J. Prolab, BRA
Banho Ultra Sônico	T-14	Thornton, BRA
Centrifuga	Excelsa Baby	Fanem, BRA
Espectrofotômetro	Spectramax M2	Molecular Devices, USA
Fluxo Laminar	CFLV 12	Veco, BRA
Incubadora de CO <sub>2</sub>	3425	Thermo S. Inc., USA
LED 660 nm	XL001WP01NRC660	Shenzhen S. O. Co., CHI
Microscópio de Luz Invertido	Ck 2	Olympus. JPN
Microscópio de Fluorescência	Axioskop 2	Zeiss, DE

## 5.2. Compostos

Para o estudo, foram utilizados cinco compostos sintetizados e gentilmente cedidos pela Universidade de Jinan, China, em parceria com a Universidade de Brasília. Para os testes, as substâncias foram preparadas na concentração de 1 mg/mL em DMSO, devido a sua baixa solubilidade em água, e numerados aleatoriamente de 1 a 5. Os mesmos foram armazenados a -20 °C, ao abrigo de luz, e descongelados previamente às análises em banho-maria a 37 °C.



**Figura 2.** Estruturas dos compostos testados. **(A)** Composto 1. **(B)** Composto 2. **(C)** Composto 3. **(D)** Composto 4. **(E)** Composto 5.

### 5.3. Caracterização fotofísica

As características fotofísicas dos compostos foram avaliadas através dos seus espectros de absorção. Para este teste, os compostos foram diluídos a uma concentração de 0,03125 mg/mL em DMSO. Depois, 200  $\mu$ L das amostras foram dispostos em placas de 96 poços, em triplicata, e seus espectros mensurados em espectrofotômetro, entre 350 e 750 nm.

Após avaliar seus espectros de absorção, foi selecionado o melhor composto para os testes seguintes, de acordo com a capacidade de absorção em comprimentos de onda ideais para TFD.

### 5.4. Capacidade de produção de Oxigênio Singlete

O teste foi realizado de acordo com Spiller e colaboradores (1998). Para avaliar a capacidade das amostras de produzir oxigênio singlete, utilizou-se o método do 1,3-difenil-isobenzofurano (DBF). O DBF possui pico de absorção característico em 414 nm, e na medida em que há geração de oxigênio singlete, esta molécula é degradada e sua absorbância decai em relação diretamente proporcional à geração desta ERO.

Primeiramente, 2,20 mg de DBF foram dissolvidos em etanol absoluto em um béquer. A solução foi transferida para balão volumétrico, o volume foi

completado para 10 mL com etanol, e a solução foi deixada em banho ultrassônico por 10 minutos, para que houvesse melhor solubilização do reagente.

Após o preparo da solução, o composto 1, selecionado pelo seu espectro de absorção, foi disposto em placas de 96 poços em diluições seriada com fator de diluição de 2x, concentração inicial de 25 µg/mL, em triplicata para cada concentração. Adicionaram-se então 10 µL da solução de DBF em cada poço. No grupo controle adicionaram-se 10 µL da solução sem a presença do FS. A placa foi lida inicialmente, sem irradiar, em espectrofotômetro. Na sequência, a placa de 96 poços foi irradiada, de 10 em 10 segundos, utilizando-se LED 660 nm e lida em espectrofotômetro. Este procedimento foi realizado até estabilização da absorbância das amostras em comprimento de onda de 414 nm. Os valores da absorbância dos compostos puros, em suas respectivas concentrações, em 414 nm foram usados como branco. Todo o experimento foi realizado no escuro. Três experimentos independentes foram realizados.

## **5.5. Avaliações *in vitro***

### **5.5.1. Linhagens celulares**

Para estudo *in vitro* do câncer de mama, células de câncer de mama murino (4T1) são interessantes por apresentarem características semelhantes de carcinoma mamário humano, como imunogenicidade, características de crescimento e propriedades metastáticas (WANG et al, 2015). Para os testes *in vitro* utilizou-se células tumorais murinas 4T1 (adenocarcinoma mamário) obtidas do banco de células da *American Type Culture Collection* (ATCC), EUA, e como controle para as células tumorais, utilizou-se células não tumorais murinas NIH-3T3 (fibroblastos), obtidas do banco de células do Rio de Janeiro.

### **5.5.2. Cultivo Celular**

As células de linhagem 4T1 foram cultivadas em meio RPMI (*Meio do Instituto Memorial Park Roswell*), tamponado com bicarbonato de sódio, pH 7,2,

suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino (SFB) e 1% (v/v) de solução de antibiótico (100 unidades/mL de penicilina e 100 mg/mL de estreptomicina). As células NIH-3T3 foram cultivadas em meio DMEM (*Meio Eagle modificado por Dulbecco*), tamponado com bicarbonato de sódio, pH 7,2 e suplementado com 10% de SFB e 1% de antibiótico. As células foram mantidas em incubadora úmida a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub>, cultivadas em garrafas de cultivo celular de 75 cm<sup>2</sup>, contendo 10 mL de meio de cultura.

Para os testes *in vitro*, as placas foram preparadas através do processo de tripsinização. Após atingir aproximadamente 80 % de confluência celular, as células foram incubadas com 4 mL de Tripsina-EDTA por três minutos, para dissociação enzimática das células. Após o desprendimento das células, foram adicionados 4 mL de meio de cultura com objetivo de inativar a tripsina. Todo o conteúdo da garrafa foi transferido para tubo cônico de 15 mL e centrifugado por três minutos. O sobrenadante foi removido e as células ressuspensas em 1 mL de meio de cultivo. Para quantificar as células viáveis, 10 µL da suspensão de células foram adicionados a 90 µL de Azul de Tripán (0,4% em PBS), o qual não é capaz de penetrar em células que apresentam a membrana plasmática viável. Aplicou-se 10 µL em hemocitômetro de Neubauer para a leitura dos quadrantes laterais em microscópio invertido. A concentração de células foi determinada de acordo com a equação;

$$\text{Número de células/mL} = \frac{\text{NCVC} \times \text{FD} \times 10^4}{\text{Q}}$$

onde: NCVC = Número total células viáveis contadas; FD = Fator de diluição; Q = Número de quadrantes.

Após a contagem, 50 a 100 µL da suspensão de células foram transferidos para uma garrafa com objetivo de manter as células, registrando-se o número de tripsinizações e, para os experimentos, as células foram transferidas para placas de cultura. A manutenção celular foi realizada em capela de fluxo laminar previamente limpa com álcool 70% (v:v) e tratada por 15 minutos com luz ultravioleta.

### 5.5.3. Ensaio de viabilidade celular pelo método MTT

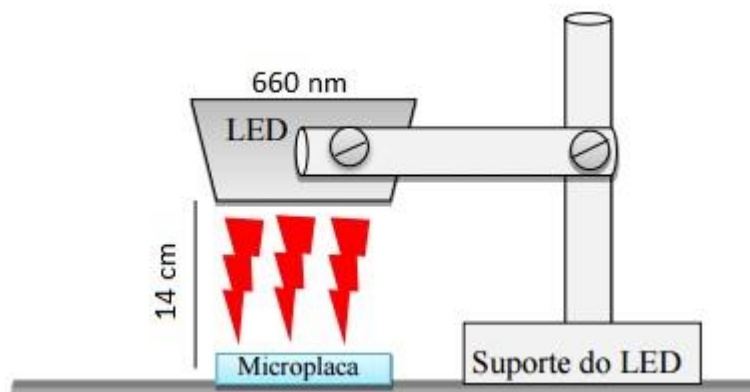
O ensaio de MTT brometo de (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio) foi utilizado para verificar a viabilidade das células 4T1 e NIH-3T3 após o tratamento com os fotossensibilizantes. Este ensaio é baseado na redução do MTT em células viáveis. A quantificação da redução de MTT é um método colorimétrico para avaliar a viabilidade celular. Após redução, o MTT (cor amarela) formam-se os cristais de formazan, que apresentam cor roxa, que ao serem dissolvidos absorvem na região do visível, podendo ser quantificados por espectrofotometria. A redução do MTT é feita através de desidrogenases celulares, principalmente mitocondriais, refletindo desta maneira a viabilidade celular (MOSMANN, 1983).

Em 24 horas após a aplicação do tratamento, as células 4T1 e NIH-3T3 foram incubadas com solução de MTT (0,5 mg/mL) em seus respectivos meio de cultivo por 2 horas. Depois, o formazan foi solubilizado com 200  $\mu$ L de DMSO e as placas foram analisadas em espectrofotômetro utilizando absorbância no comprimento de onda de 595 nm. Três experimentos independentes foram realizados.

### 5.5.4. Tratamento com o LED

Primeiramente, avaliou-se o efeito do LED sobre a viabilidade celular sem a presença do FS, com objetivo de verificar se o LED apresenta alguma citotoxicidade. Para os testes, as células 4T1 e NIH-3T3, em seus respectivos meios de cultura, foram semeadas em placas de 96 poços na densidade de  $1 \times 10^4$  células/poço. Após 24 horas, o meio de cultivo da placa foi removido e as células foram incubadas com 100  $\mu$ L de meio de cultivo novo e sem FS por 15 minutos. Após este tempo, as células foram lavadas duas vezes com PBS, e então adicionado novamente 100  $\mu$ L de meio de cultivo. Em seguida foram irradiadas com LED por 30 minutos, enquanto o grupo controle foi mantido ao abrigo de luz. O LED foi montado em um suporte de metal a uma distância de 14 centímetros da microplaca, dentro da capela de fluxo laminar. O LED utilizado emitia luz com comprimento de onda de 660 nm com fluência de 25,8 J/cm<sup>2</sup> (Figura 3). Experimento realizado em quintuplicata.





**Figura 3.** Esquema de tratamento com LED. RODRIGUES, 2014 (adaptado).

Para o teste de viabilidade do FS, as células 4T1 e NIH-3T3, em seus respectivos meios, foram semeadas em placas de 96 poços na densidade de  $1 \times 10^4$  células/poço. Após 24 horas, as células foram tratadas com 100  $\mu\text{L}$  em oito concentrações diferentes de uma diluição seriada com fator 2x do composto 1, partindo-se da concentração inicial de 25  $\mu\text{g/mL}$ . No grupo controle adicionou-se somente meio de cultivo. Devido à baixa solubilidade em água o FS foi preparado em DMSO e, desta maneira, todos os grupos foram tratados com o mesmo volume de DMSO, inclusive o grupo controle. As células foram expostas por 15 minutos e em seguida lavadas duas vezes com PBS, e então adicionado 100  $\mu\text{L}$  de meio de cultivo. Em seguida, foi irradiada com LED por 30 minutos de acordo com os parâmetros descritos acima (Figura 3). O grupo de células tratadas com o FS, mas não irradiadas, foi mantida ao abrigo da luz. Após os tratamentos as células foram mantidas em incubadora por 24 horas. Experimento realizado em quintuplicata para cada concentração.

#### 5.5.5. Distribuição intracelular

Este procedimento foi realizado de acordo com Dellinger e colaboradores (2010). Células 4T1 foram semeadas com densidade de  $10 \times 10^4$  células/poço em placas de cultivo de 12 poços, contendo lamínula redonda de 18 mm de diâmetro no fundo do poço. Após 24 horas, o meio de cultivo foi removido e então foram adicionados 775  $\mu\text{L}$  de meio de cultivo novo. Na sequência, 200  $\mu\text{L}$  de solução de um dos marcadores de organela – mitocôndria (*MitoTracker*®), retículo endoplasmático (*ER-Tracker*®) e

lisossomos (*LysoTracker*®) – foram adicionados, sendo cada um adicionado em um poço diferente. Após 15 minutos a esta adição, foram adicionados 25 µL do composto 1 a 250 µg/mL, correspondendo a uma concentração final de 6,25 µg/mL. As células foram mantidas com este tratamento por mais 15 minutos, totalizando 30 minutos de incubação com os marcadores e 15 minutos para o fotossensibilizante. Para a marcação do núcleo, as células foram incubadas com o FS na concentração de 6,25 µg/mL por 15 minutos. Depois o meio de cultivo foi removido e as células foram tratadas com 200 µL de solução de DAPI 0,1 µg/mL sobre a lamínula por 5 minutos. Após a exposição ao fármaco e aos marcadores, as células foram lavadas duas vezes com PBS e, com auxílio de uma pinça, as lamínulas foram retiradas e montadas em lâminas limpas.

As lâminas prontas foram analisadas a fresco em microscópio de fluorescência. O canal do azul foi utilizado para análise do lisossomo, núcleo e retículo endoplasmático, o do verde para mitocôndria e o do vermelho para o FS. As imagens foram obtida através da câmara acoplada, AxioCam MRC ZEISS, utilizando o software ZEN e tratadas com o programa Adobe Photoshop CS 6 para ajuste de opacidade e sobreposição das imagens.

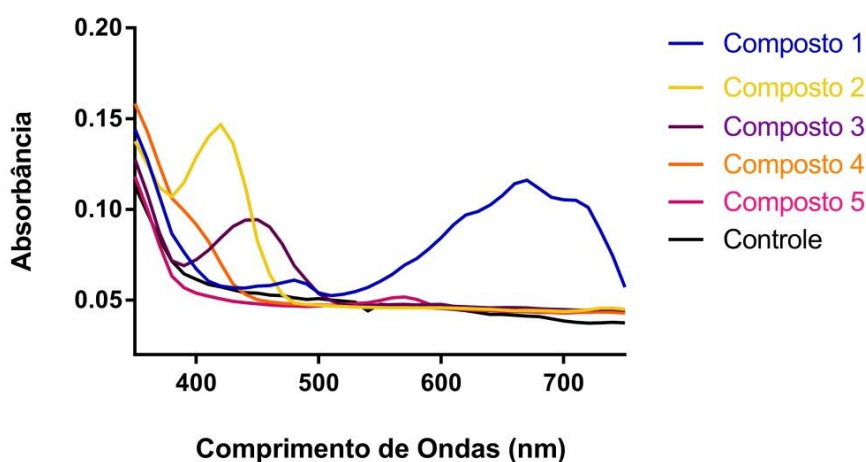
#### 5.5.6. Análises Estatística

Os resultados foram analisados no software GraphPad Prisma® e submetidos a testes estatísticos com confiança estatística de 95% ( $p < 0,05$ ). As diferenças estatísticas foram avaliadas pelo teste Anova (Análise de Variância), de duas vias, aplicando pós-testes de múltiplas comparações de Sidak's. Os resultados foram expressos em média  $\pm$  erro padrão da média (E.P.M).

## 6. RESULTADOS

### 6.1. Características Fotofísicas

Os cinco compostos inicialmente estudados neste trabalho, desenvolvidos na Universidade de Jinan, China, foram escolhidos porque ainda não haviam sido utilizados como FS, segundo a literatura, e porque eram corantes e, portanto, tinham potencial para uso em TFD. A análise dos espectros de absorção de luz obtidos para estas moléculas orientou a escolha inicial de moléculas para experimentos subsequentes deste trabalho. Os comprimentos de onda de absorção máxima verificados para os compostos 1, 2, 3, 4 e 5 foram 670, 420, 450, 490 e 570 nm, respectivamente (Figura 4). Assim, dentre os cinco compostos iniciais, somente o número 1 apresentou absorção máxima de luz na região considerada ideal para a TFD, i.e., entre 650 e 780 nm. Desta forma, foram avaliadas outras características referentes ao seu potencial como FS.

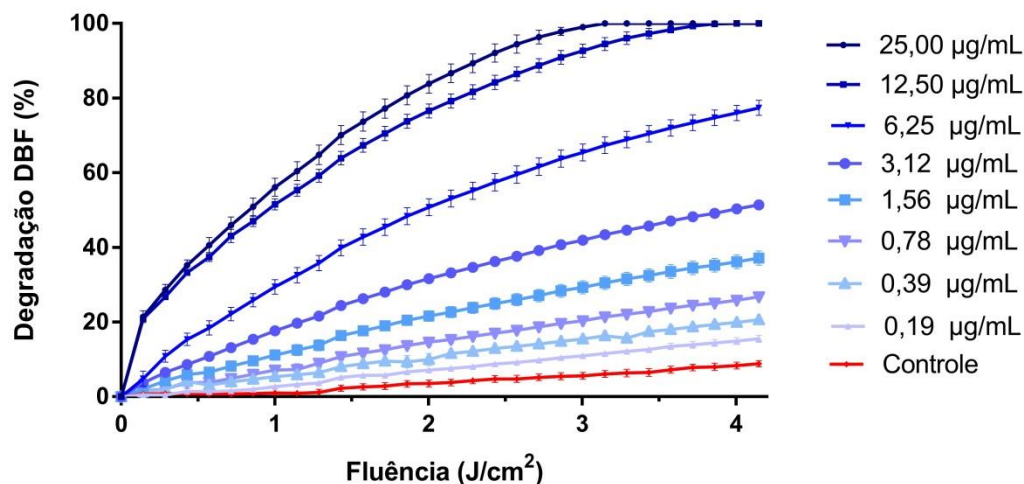


**Figura 4.** Espectro de Absorção dos compostos 1, 2, 3, 4, 5 e controle.

### 6.2. Capacidade de Produção de Oxigênio Singlete

O composto 1 apresentou capacidade de produção de oxigênio singlete, degradando 100 % o DBF nas duas maiores concentrações, 25,00 e 12,50  $\mu\text{g/mL}$ , na fluência de 3,14 e 3,86  $\text{J/cm}^2$ , respectivamente (Figura 5). A produção de oxigênio singlete se mostrou concentração-dependente, quanto

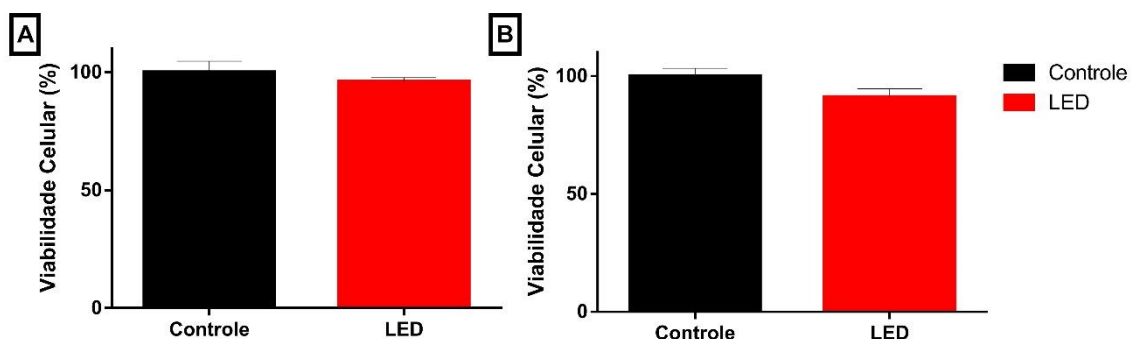
maior a concentração do FS, maior a produção. Conforme o esperado, o grupo controle não degradou quantidades significativas de oxigênio singlete.



**Figura 5.** Degradação do DBF em diferentes concentrações do fotossensibilizante (composto 1). Os dados estão representados como média  $\pm$  E. P. M. para triplicatas.

### 6.3. Tratamento com LED

As células 4T1 e NIH-3T3 tratadas com LED por 30 minutos, fluência de 25,8 J/cm<sup>2</sup>, tiveram uma redução estatisticamente insignificante da viabilidade celular, 95,95  $\pm$  1,71 e 91,00  $\pm$  3,57 %, respectivamente, mostrando que a luz de LED é inócua a estas células na ausência de um FS, como o esperado (Figura 6).

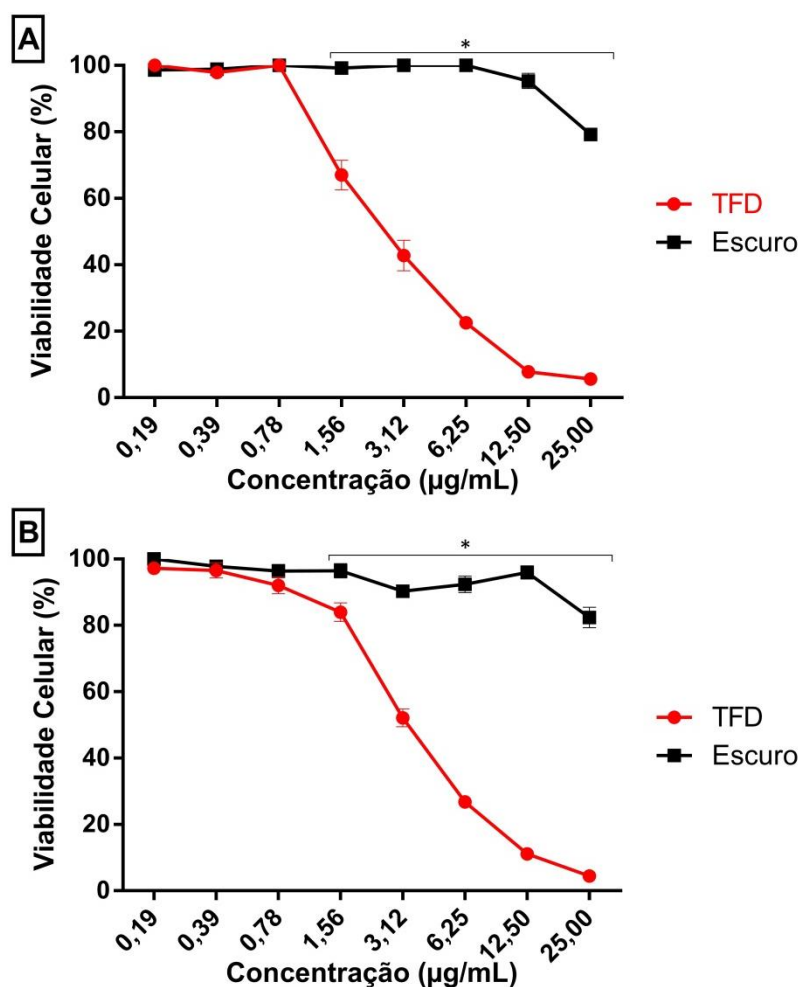


**Figura 6. (A)** Viabilidade de células 4T1 tratadas com LED e **(B)** Viabilidade de células NIH-3T3 tratadas com LED por 30 minutos. Em vermelho, o grupo

tratado e em preto, grupo de células controles mantidas ao abrigo da luz. Os dados estão representados como média  $\pm$  E. P. M. para quintuplicatas.

#### 6.4. Terapia Fotodinâmica

Ao tratar as células 4T1 e NIH-3T3 com o composto 1 sem a irradiação, observou-se baixa citotoxicidade celular (Figura 7). As células tratadas com o composto 1 e irradiadas em seguida tiveram maior redução da viabilidade celular, com CC 50 % de aproximadamente 2,70  $\mu\text{g/mL}$  e 3,30  $\mu\text{g/mL}$  para células tumorais e células controle, respectivamente (Figura 7). Observou-se diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) entre o grupo mantido no escuro e o grupo irradiado a partir da concentração de 1,56  $\mu\text{g/mL}$ , em ambos os tipos celulares.



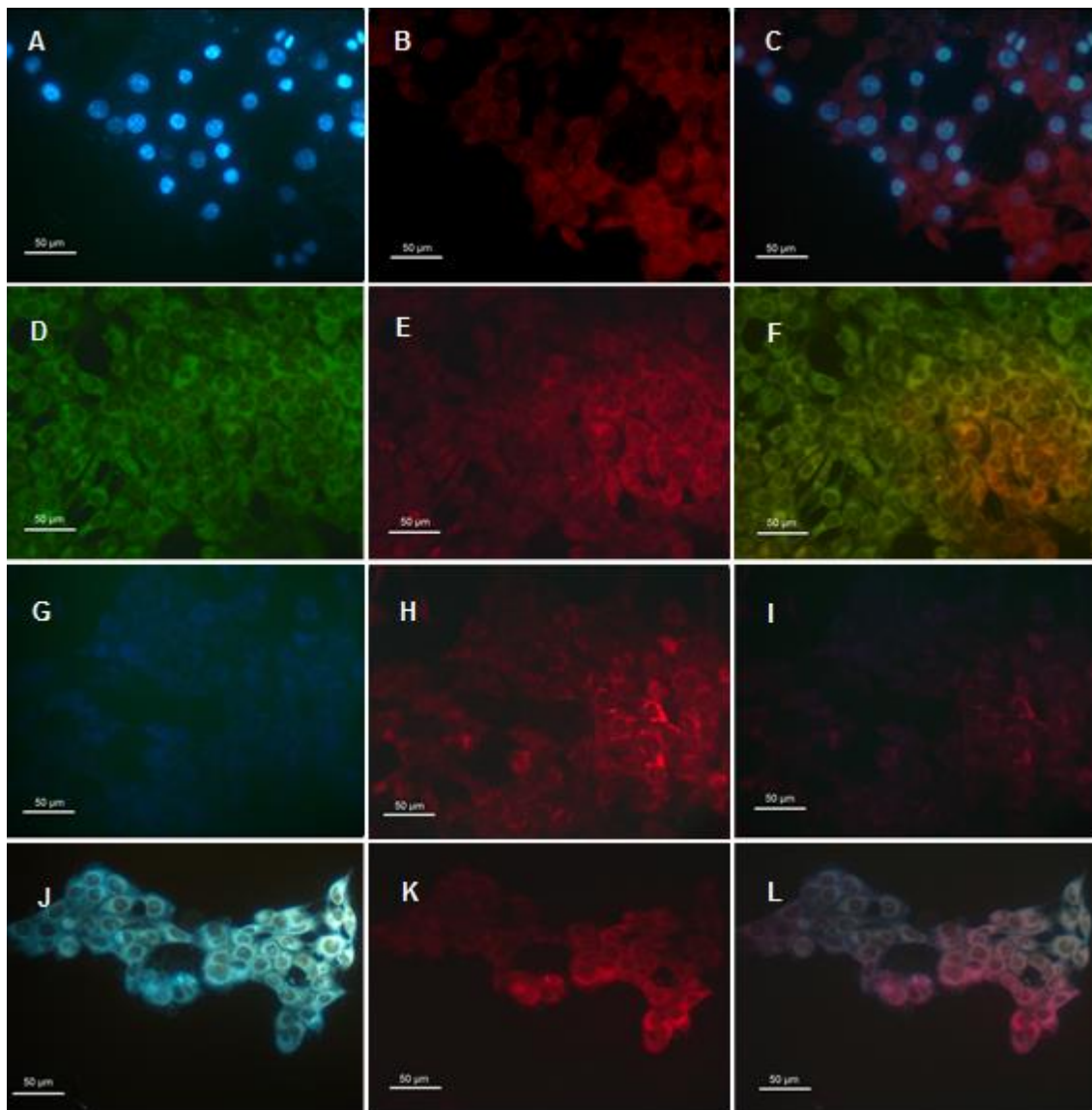
**Figura 7. (A)** Viabilidade Celular de células 4T1, tratadas por 15 minutos, no escuro (preto) e irradiadas (vermelho) por LED, por 30 minutos. **(B)** Viabilidade

---

Celular de células NIH-3T3, tratadas por 15 minutos, no escuro (preto) e irradiadas (vermelho) por LED, por 30 minutos. Os dados estão representados como média  $\pm$  E. P. M. para quintuplicatas. \*  $p < 0,05$  para TFD vs Escuro.

### **6.5. Distribuição Intracelular**

Após 15 minutos de tratamento com o composto 1, observou-se uma concentração significativa do fotossensibilizante nas organelas mitocôndria, lisossomo e retículo endoplasmático, dada pela formação de novas cores, amarelo, sobreposição do verde sobre o vermelho na mitocôndria, e rosa para sobreposição do vermelho sobre o azul para lisossomo e retículo endoplasmático, observado pela sobreposição das imagens (Figura 8), indicando colocalização. Constatou-se também uma baixa presença do FS no núcleo, evidenciado pela baixa intensidade da cor vermelha (FS) na região central da célula que envolve o núcleo e ausência da sobreposição do vermelho sobre o azul.



**Figura 8.** Imagens de microscopia de fluorescência de células 4T1 tratadas com composto 1 na concentração de 6,25 µg/mL por 15 minutos. **(A)** Núcleo marcado. **(D)** Mitocôndria marcada. **(G)** Lisossomo marcado. **(J)** Retículo Endoplasmático marcado. **(B)**, **(E)**, **(H)** e **(K)** Em vermelho, FS. **(C)**, **(F)**, **(I)** e **(L)** Sobreposição das imagens.

## 7. DISCUSSÃO

Dentre os compostos estudados, o composto 1 foi o que apresentou uma das características fotosínicas mais importantes para um FS, i.e., alta absorção de luz entre 650 e 780 nm (Figura 4). A importância desta propriedade deriva das características ópticas de tecidos biológicos. A maioria dos tecidos possui pigmentos endógenos, principalmente a hemoglobina, que absorvem luz intensamente entre 400 e 600 nm, interferindo na ativação do FS e consequentemente reduzindo a eficácia da TFD. Ainda, luz com comprimentos de onda acima de 800 nm não apresenta energia suficiente para ativar os FS (SIBATA, 2000). Visto que os demais compostos absorvem luz em comprimento de onda inferior (Figura 4) ao da janela terapêutica, foram descartados das etapas seguintes do estudo.

Uma característica importante para um fotossensibilizante ser considerado ideal é ter a capacidade de produzir ERO (STERNBERG; DOLPHIN; BRÜCKNER, 1998). No presente estudo, a produção de ERO pelo composto fotoativado foi monitorada pelo método do DBF. O composto 1 mostrou-se um bom candidato à FS para terapia fotodinâmica, chegando a degradar completamente o DBF nas duas maiores concentrações (Figura 5), indicando uma boa produção desta espécie reativa, que é de suma importância para a eficácia da TFD.

O oxigênio singlete é uma forma altamente reativa de oxigênio e é considerado o principal mediador do dano fotoquímico causado pelos FS (EDUARDO et al, 2015). Esta ERO pode induzir a oxidação em constituintes e organelas celulares, resultando em danos irreversíveis às organelas e consequentemente na morte de células cancerosas (WEISHAUPT; GOMER; DOUGHERTY, 1976; DOUGHERTY, 1987; DOLPHIN, 1994).

A TFD mediada pelo composto 1 foi eficaz na redução da viabilidade de células cancerosas. As células 4T1 quando tratadas com o composto 1 e em seguida irradiadas por LED tiveram uma redução significativa em sua viabilidade (Figura 7), sendo a mesma, proporcional à produção de oxigênio singlete, demonstrada pelo método de DBF (Figura 5).

Quando tratadas com o FS, sem a irradiação, a citotoxicidade observada foi baixa, o que é um evento essencial em TFD, pois segundo Konopka e



Goslinski (2007), para que a terapia seja eficaz, é necessário que o efeito citotóxico seja mediado pelo FS fotoativado. A redução da viabilidade em células não tumorais após tratamento com o composto 1 seguido de luz já era esperado (Figura 7), uma vez que o FS ativado também é capaz de gerar ERO's em células normais. No entanto, quando não exposta a luz, a citotoxicidade foi baixa, sendo esta uma das vantagens para aplicações *in vivo*, uma vez que a luz pode ser focalizada na região do tumor, evitando toxicidade em células normais e mantendo a seletividade para o tecido alvo. Caso o FS fosse intrinsecamente citotóxico, haveria indução de danos em tecidos não atingidos pela luz, ocasionando efeitos adversos em tecidos não alvos.

Quando as células foram tratadas somente com o LED, não houve redução de sua viabilidade (Figura 6). Estudos *in vitro* realizados por Rodrigues (2014) utilizando tratamento com LED com comprimento de onda e fluência semelhantes também demonstraram baixa toxicidade da luz em células MCF-7 (células de câncer de mama humana), o que ressalta importância da interação da luz com o FS para a ocorrência dos efeitos fototóxicos.

Os mecanismos de citotoxicidade da TFD dependem também da localização subcelular do FS (GREBEŇOVÁ et al, 2003). O composto 1 acumulou-se preferencialmente na mitocôndria e retículo endoplasmático (Figura 8).

Estudos mostram que alguns FS fotoativados podem induzir apoptose em células cancerosas. Muitos FS atuam na mitocôndria (MACDONALD; DOUGHERTY, 2001). As ERO produzidas pela ativação do FS provocam um estresse oxidativo nesta organela, fazendo com que sejam liberadas proteínas pró-apoptóticas, como citocromo c e proteína Smac Diablo. Estas proteínas atuam ativando caspases que ativam vários processos celulares controlados, como a fragmentação do DNA, levando à morte da célula (USUDA et al, 2002; REINERS JR et al, 2002). As espécies reativas podem também inativar proteínas anti-apoptóticas, como a bcl-2, que são responsáveis por evitar que as células cancerosas entrem em apoptose (LIANG-YAN; SONG-MAO; OLEINICK, 2001).

A TFD pode induzir morte celular imunogênica (MCI), o que ativa o sistema imunitário contra antígenos tumorais, aumentando a eficiência do tratamento, pela eliminação do tumor primário com a TFD e a de focos

---

metastáticos (GARG; AGOSTINIS, 2014). Para que isso ocorra é necessário que o FS esteja presente no retículo endoplasmático rugoso e que gere estresse oxidativo nesta organela (VERFAILLIE et al, 2012). A presença do composto 1 no retículo endoplasmático, sugere que este FS pode levar à MCI após aplicação de TFD, o que é uma propriedade vantajosa, pois através da indução da MCI é possível atuar contra a causa primária de morte relacionado ao câncer de mama, a metástase. A presença do fármaco no retículo endoplasmático é a primeira etapa para a indução de MCI, desta maneira mais estudos são necessários para avaliar seu potencial imunogênico. O resultado de localização subcelular deve ser confirmado por outras técnicas como microscopia confocal para melhor resolução das imagens.

Uma das limitações observadas para o composto 1 é a sua baixa solubilidade em água. A utilização de fotossensibilizantes livres apresentam a tendência de se aglomerar em meios biológicos devido as suas características hidrofóbicas, diminuindo assim sua atividade e conseqüentemente a eficácia do tratamento por TFD (MARCATO; DURÁN, 2008).

Uma alternativa para superar tal desvantagem seria a associação do mesmo à nanocarreadores. A associação do FS a nanopartículas permite aumentar a sua dispersibilidade em meios aquosos e facilitar sua entrega para células tumorais, reduzindo assim, os efeitos colaterais induzidos pelo FS, além de outras vantagens como, por exemplo, a diminuição do número de doses a serem administradas, a prolongação dos intervalos entre doses e a possibilidade de sua administração intravenosa (WOJTONISZAK et al, 2013). Apesar desta desvantagem, de um modo geral, o composto 1 é um promissor FS para TFD, abrindo a possibilidade para novos estudos.

## 8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Diante das limitações dos tratamentos convencionais do câncer e dos problemas apresentados pelos FS utilizados na TFD, há a necessidade do desenvolvimento de novos FS. Ao avaliar novos compostos como possíveis FS, o composto 1 apresentou boas características para ser utilizado em TFD.

O fármaco em questão possui características fotofísicas que o habilitam como candidato a FS, além de apresentar capacidade de gerar ERO, baixa toxicidade no escuro e capacidade de reduzir a viabilidade de células tumorais 4T1 *in vitro*, quando irradiado.

Além disto, o estudo da localização subcelular indica que o composto pode levar a indução de MCI e apoptose de células cancerosas, ressaltando a importância de novos estudos com o mesmo, com objetivo de investigar e explorar o seu potencial para terapia fotodinâmica anticâncer de mama, não podendo descartar a sua possível utilização em outros tipos celulares tumorais.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACKROYD, R. et al. The history of photodetection and photodynamic therapy. **Photochemistry and photobiology**, v. 74, n. 5, p. 656-669, 2001.

AGUILLAR, V. L. N.; BAUAB, S. P.; MARANHÃO, N. M. Mama: diagnóstica por imagem: mamografia, ultrassonografia, ressonância magnética. **Revinter**, 2009.

MA, B. C. Eficácia do alumínio-cloro ftalocianina associado a nanopartículas de poli(vinil metil éter-co-anidrido maleico) na terapia fotodinâmica contra células tumorais in vitro. 2012. 60 f. : il. Dissertação(Mestrado em Biologia Animal)— Universidade de Brasília, Brasília, 2012.

BERLANDA, N.; VERCELLINI, P.; FEDELE, L. The outcomes of repeat surgery for recurrent symptomatic endometriosis. **Current Opinion in Obstetrics and Gynecology**, v. 22, n. 4, p. 320-325, 2010.

BRAATHEN, L. R; SZEIMIES, R. M.; SEGUIN, N. B. Guidelines on the use of photodynamic therapy for nonmelanoma skin cancer: an international consensus. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 56, n. 1, p. 125-143, 2007.

BRASILa. Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer. Falando sobre câncer de mama. **Rio de Janeiro: INCA**, 2002.

BRASILb. Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer. Ações de enfermagem para o controle do câncer. **3ª ed. Rio de Janeiro: INCA**, 2008.

BROWN, S. B.; BROWN, E. A.; WALKER, I. The present and future role of photodynamic therapy in cancer treatment. **The lancet oncology**, v. 5, n. 8, p. 497-508, 2004.

BONNETT, R. Photosensitizers of the porphyrin and phthalocyanine series for photodynamic therapy. **Chemical Society Reviews**, v. 24, n. 1, p. 19-33, 1995.

CALVETE, M. J. F.; GOMES, A. T. P. C.; MOURA, N. M. M. Clorinas em Terapia Fotodinâmica–Síntese e aplicações. **Revista Virtual de Química**, v. 1, n. 2, p. 92-103, 2009.

CANCER COUNCIL VICTORIA. Coping with Radiotherapy: for people with cancer, their family and friends. **Victoria, United States of America: Cancer Council Victoria**, 2009

CÂNDIDO, C. et al. A Carcinogênese e o Câncer de Mama. **Revista Maiêutica-Ciências Biológicas**, v. 4, n. 1, p. 45-52, 2016.

CANTINELLI, F. S. et al. A oncopsiquiatria no câncer de mama: considerações a respeito de questões do feminino. **Rev Psiquiatr Clín**, v. 33(3), p. 124-133, 2006.

CARVALHO, V. C. M. Estudo dos efeitos de duas porfirinas hidrofílicas em células tumorais Hep-2 visando aplicação em terapia fotodinâmica do câncer. 2001. 91f. 2001. Tese de Doutorado. Dissertação (Mestrado em Química Analítica)–Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2001.

CIBEIRA, G. H.; GUARAGNA, R. M. Lipídio: fator de risco e prevenção do câncer de mama. **Revista de nutrição**, v. 19(1), p. 65-75, 2006.

DELLINGER, A. et al. Uptake and distribution of fullerenes in human mast cells. **Nanomedicine: Nanotechnology, biology and medicine**, v. 6, n. 4, p. 575-582, 2010.

DOLPHIN, D. Syntex Award Lecture Photomedicine and photodynamic therapy. **Canadian journal of chemistry**, v. 72, n. 4, p. 1005-1013, 1994.

---

DOUGHERTY, T. J. Photosensitizers: therapy and detection of malignant tumors. **Photochemistry and Photobiology**, v. 46, p. 569-573, 1987.

EDUARDO, C. P. et al. A terapia fotodinâmica como benefício complementar na clínica odontológica. **Rev. Assoc. Paul. Cir. Dent.**, Sao Paulo , v. 69, n. 3, set. 2015.

FERREIRA, J. Análise Da Necrose Em Tecidos Normais Fotossensibilizados Pós Terapia Fotodinâmica - Estudo In Vivo. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2003.

FOOTE, Christopher S. Photosensitized oxidation and singlet oxygen: consequences in biological systems. **Free radicals in biology**, v. 2, p. 85-133, 1976.

GARG, A. D.; AGOSTINIS, P. ER stress, autophagy and immunogenic cell death in photodynamic therapy-induced anti-cancer immune responses. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 13, n. 3, p. 474-487, 2014.

GELPERINA, S. et al. The potential advantages of nanoparticle drug delivery systems in chemotherapy of tuberculosis. **American journal of respiratory and critical care medicine**, v. 172, n. 12, p. 1487-1490, 2005.

GREBEŇOVÁ, Dana et al. Mitochondrial and endoplasmic reticulum stress-induced apoptotic pathways are activated by 5-aminolevulinic acid-based photodynamic therapy in HL60 leukemia cells. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 69, n. 2, p. 71-85, 2003.

JEMAL, A. et al. Global cancer statistics. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 61, n. 2, p. 69-90, 2011.

JORI, G. Photodynamic therapy of microbial infections: state of the art and perspectives. **Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology**, v. 25, n.1-2, 2006.

---

KALEY, T. J.; DEANGELIS, L. M. Therapy of chemotherapy-induced peripheral neuropathy. **British journal of haematology**, v. 145, n. 1, p. 3-14, 2009.

KALKA, K.; MERK, H.; MUKHTAR, H. Photodynamic therapy in dermatology. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 42, n. 3, p. 389-413, 2000.

KANEKO, T. et al. Detection of photodynamic therapy-induced early apoptosis in human salivary gland tumor cells in vitro and in a mouse tumor model. **Oral oncology**, v. 40, n. 8, p. 787-792, 2004.

KONOPKA, K.; GOSLINSKI, T. Photodynamic Therapy in Dentistry. **Journal of Dental Research**, v. 86, n. 8, p. 694 – 707, 2007.

KURWA, H. A.; BARLOW, R. J. The role of photodynamic therapy in dermatology. **Clinical and experimental dermatology**, v. 24, n. 3, p. 143-148, 1999.

LEVY, J. G. Photodynamic therapy. **Trends in biotechnology**, v. 13, n. 1, p. 14-18, 1995.

LIANG-YAN, X.; SONG-MAO, C.; OLEINICK, N. L. Photochemical destruction of the Bcl-2 oncoprotein during photodynamic therapy with the phthalocyanine photosensitizer Pc 4. **Oncogene**, v. 20, n. 26, p. 3420, 2001.

MACDONALD, I. J.; DOUGHERTY, T. J. Basic principles of photodynamic therapy. **Journal of Porphyrins and Phthalocyanines**, v. 5, n. 02, p. 105-129, 2001.

MACHADO, A. E. H. Terapia fotodinâmica: princípios, potencial de aplicação e perspectivas. **Química Nova**, v. 23, n. 2, 2000.

---

MALAM, Y.; LOIZIDOU, M.; SEIFALIAN, A. M. Liposomes and nanoparticles: nanosized vehicles for drug delivery in cancer. **Trends in pharmacological sciences**, v. 30, n. 11, p. 592-599, 2009.

MARCATO, P. D.; DURÁN, N. New aspects of nanopharmaceutical delivery systems. **Journal of nanoscience and nanotechnology**, v. 8, n. 5, p. 2216-2229, 2008.

MAROSOTICA, L. L. Análise dos Efeitos do Mesilato de Imatinibe em cultura de células-tronco mesenquimais humanas derivadas e placenta. (Dissertação). **Universidade Federal de Santa Catarina**, p.121, 2011.

MENDES, M. C. S. et al. Obesidade e câncer: as doenças do século. **ABESO (Associação Brasileira para o Estudo da Obesidade e da Síndrome Metabólica)**, n. 54, p. 7-9, 2011.

MERKEL, L. K.; BIEL, M. A. C. Photodynamic therapy. In: WITHROW, S.J.; MacEWAN, E.G. **Small animal clinical oncology**, p.86-913, 2001.

MIRONOV, A. F.; NIZHNIK, A. N.; NOCKEL, A. Y. Hematoporphyrin derivatives: an oligomeric composition study. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 4, n. 3, p. 297-306, 1990.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of immunological methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.

NGUYEN, K. T. et al. Nanomaterials for photo-based diagnostic and therapeutic applications. 2013.

O'SHAUGHNESSY, J. Extending survival with chemotherapy in metastatic breast cancer. **The oncologist**, v. 10, n. Supplement 3, p. 20-29, 2005.



---

PAULA, M. G. Terapia fotodinâmica: uma alternativa antimicrobiana coadjuvante no tratamento periodontal. 2010. Monografia (Curso de Especialização em Periodontia) – Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, 2010.

PERUSSI, J. R. Inativação fotodinâmica de microrganismos. **Química Nova**, v. 30, n. 4, p. 988, 2007.

PLAETZER, K. et al. Photophysics and photochemistry of photodynamic therapy: fundamental aspects. **Lasers in medical science**, v. 24, n. 2, p. 259-268, 2009.

RATH, G. K. Radiation Therapy in the Management of Cancer. **Fifty Years of Cancer Control in India**. National Cancer Control Programme, p. 88-96, 2002.

ROCHÉ, H. et al. Sequential Adjuvant Epirubicin-Based and Docetaxel Chemotherapy for Node-Positive Breast Cancer Patients: The FNCLCC PACS 01 Trial. **Journal of Clinical Oncology**, v. 24 (36), p. 5664- 5667, 2006.

RAGHAVENDRA, M.; KOREGOL, A.; BHOLA, S. Photodynamic therapy: a targeted therapy in periodontics. **Australian dental journal**, v. 54, p.102-109, 2009.

REINERS JR, J. J. et al. Release of cytochrome c and activation of pro-caspase-9 following lysosomal photodamage involves Bid cleavage. **Cell death and differentiation**, v. 9, n. 9, p. 934, 2002.

RODRIGUES, M. C. Terapia fotodinâmica mediada por extrato de cajuru e cloreto de alumínio-ftalocianina em nanoemulsões no tratamento de câncer de mama in vitro. 2014. xxi, 118 f., il. Dissertação (Mestrado em Nanociências e Nanobiotecnologia)—Universidade de Brasília, Brasília, 2014.

SCHNEIDER, R. et al. Design, synthesis, and biological evaluation of folic acid targeted tetraphenylporphyrin as novel photosensitizers for selective

---

photodynamic therapy. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 13, n. 8, p. 2799-2808, 2005.

SEPAH, S. C.; BOWER, J. E. Positive affect and inflammation during radiation treatment for breast and prostate cancer. **Brain Behav Immun**, v. 23(8), p. 1068-1072, 2009.

SHI, L. et al. *In vitro* evaluation of 5-aminolevulinic acid (ALA) loaded PLGA nanoparticles. **International journal of nanomedicine**, v. 8, p. 2669, 2013.

SIBATA, C. H. et al. Photodynamic therapy: a new concept in medical treatment. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 33, n. 8, p. 869-880, 2000.

SILVA, A. R. Análise das propriedades fotossensibilizantes do In(III)-meso-tetrafenilporfirina para uso em Terapia Fotodinâmica. **Campinas: UNICAMP, IQ**, 2003.

SILVA, L. C. Câncer de mama e sofrimento psicológico: aspectos relacionados ao feminino. **Psicologia em Estudo**, v. 13 (2), p. 231-237, 2008.

SILVA, P. A.; RIUL, S. S. Câncer de mama: fatores de risco e detecção precoce. **Rev. bras. enferm.**, Brasília, v. 64, n. 6, p. 1016-1021, 2011.

SIMPLICIO, F. I.; MAIONCHI, F.; HIOKA, N. Terapia fotodinâmica: aspectos farmacológicos, aplicações e avanços recentes no desenvolvimento de medicamentos. **Química Nova**, v. 25, n. 5, p. 801-807, 2002.

SOBOLEV, A. S.; JANS, D. A.; ROSENKRANZ, A. A. Targeted intracellular delivery of photosensitizers. **Progress in biophysics and molecular biology**, v. 73, n. 1, p. 51-90, 2000.

SOUSA, G. R. Reparação óssea de lesões perirradiculares tratadas ou não com laser em baixa intensidade ( $\lambda=904$  nm): estudo radiográfico em humanos.

---

[Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, 2001.

SPILLER, W. et al. Singlet oxygen quantum yields of different photosensitizers in polar solvents and micellar solutions. **Journal of Porphyrins and Phthalocyanines**, v. 2, n. 2, p. 145-158, 1998.

STERNBERG, E. D.; DOLPHIN, D.; BRÜCKNER, C. Porphyrin-based photosensitizers for use in photodynamic therapy. **Tetrahedron**, v. 54, n. 17, p. 4151-4202, 1998.

USa. SURVEILLANCE EPIDEMIOLOGY AND RESULTS (SEER). **National Cancer Institute**, 2007. Disponível em: <<http://seer.cancer.gov>>. Acesso em 24 de maio de 2017, às 20h.

USb. AMERICAN CANCER SOCIETY. Breast Cancer Facts & Figures 2015-2016. **Atlanta: American Cancer Society**, 2015.

USUDA, J. et al. Promotion of Photodynamic Therapy-Induced Apoptosis by the Mitochondrial Protein Smac/DIABLO: Dependence on Bax. **Photochemistry and photobiology**, v. 76, n. 2, p. 217-223, 2002.

VERFAILLIE, T. et al. PERK is required at the ER-mitochondrial contact sites to convey apoptosis after ROS-based ER stress. **Cell Death & Differentiation**, v. 19, n. 11, p. 1880-1891, 2012.

VIA, L.; MAGNO, S. Photochemotherapy in the treatment of cancer. **Current medicinal chemistry**, v. 8, n. 12, p. 1405-1418, 2001.

WALSH, L. J. The current status of laser applications in dentistry. **Australian dental journal**, v. 48, n. 3, p. 146-155, 2003.

---

WANG, X. et al. Analysis of the in vivo and in vitro effects of photodynamic therapy on breast cancer by using a sensitizer, sinoporphyrin sodium. **Theranostics**, v. 5, n. 7, p. 772, 2015.

WEISHAUPT, K. R.; GOMER, C. J.; DOUGHERTY, T. J. Identification of singlet oxygen as the cytotoxic agent in photo-inactivation of a murine tumor. **Cancer research**, v. 36, n. 7 Part 1, p. 2326-2329, 1976.

WIEDER, M. E. et al. Intracellular photodynamic therapy with photosensitizer nanoparticle conjugates: cancer therapy using a 'Trojan horse'. **Photochemical & photobiological sciences**, v. 5, n. 8, p. 727-734, 2006.

WOJTONISZAK, M. et al. Graphene oxide functionalized with methylene blue and its performance in singlet oxygen generation. **Materials Research Bulletin**, v. 48, n. 7, p. 2636-2639, 2013.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Diagnosis and Treatment. Cancer Control: knowledge into action: WHO guide for effective programmes. **World Health Organization**, 2008.

YANO, S. et al. Current states and future views in photodynamic therapy. **J Photoch Photobio C.**, v. 12: p. 46-67, 2011.