

## PROJETO DE BOLSA DE ESTUDOS AVANÇADOS (BEA)

**Título**

Uso Avançado do Grafeno e Seus Derivados em Sistemas Complexos de Inflamação e Câncer

**Supervisor:** Ralph Santos-Oliveira**1. Introdução**

Grafeno é uma estrutura de carbono formada por camadas finas e bidimensionais, apresenta propriedades únicas e diversificada aplicabilidade nas áreas de nanotecnologia e ciências biomédicas. A partir do grafeno, nanopartículas foram desenvolvidas como o grafeno quantum dots (GQDs) que apresentam características interessantes como emissão de fotoluminescência intrínseca, estabilidade óptica e química, propriedades fototérmicas, bandas de raman típicas, flexibilidade mecânica, grande área superficial, baixa toxicidade e grupos funcionais em sua superfície permitindo síntese de sistemas complexos, como nanocarreadores terapêuticos de alta especificidade, diminuindo ou eliminando os desafios atuais nos processos de diagnóstico, tratamento e monitoramento de diversas doenças, em especial o câncer.

Complexo e heterogêneo, câncer é uma doença que afeta tecidos e órgãos pelo crescimento desenfreado de células anormais, e é responsável por mais de 8,0 milhões de mortes anuais em escala global. Dentre os diversos tipos de câncer, os tumores de mama são os mais invasivos e comuns entre as mulheres, e sua ocorrência tem aumentado tanto em países desenvolvidos quanto em desenvolvimento, sendo que neste último o diagnóstico precoce pode ser um desafio. Ele é responsável por 2,0 milhões de diagnósticos e por 630 mil mortes anuais. O câncer de próstata tem também grande incidência e representa o segundo câncer com maior frequência de diagnósticos (1,2 milhões) em homens no mundo, principalmente em países desenvolvidos. O tratamento que pode incluir radioterapia, cirurgia e quimioterapia, é inespecífico nos estágios avançados e metastático da doença, causando diversas complicações como resistência e geração de reações adversas. Devido a esses fatores, o câncer de próstata é responsável por aproximadamente 360 mil mortes anuais pelo mundo. Há expectativa que até 2030 o câncer seja responsável pela morte anual de 13 milhões de pessoas, evidenciando a necessidade de novas estratégias de combate. Para tal, a nanotecnologia é um promissor instrumento no desenvolvimento de novas ferramentas para melhorar o diagnóstico, monitoramento e tratamento do câncer.

A inflamação é uma síndrome que se apresenta com alterações imunológicas, bioquímicas e fisiológicas, produzindo no local agredido aumento do fluxo sanguíneo e da permeabilidade vascular, recrutamento leucocitário e liberação de mediadores químicos pró-inflamatórios. Os processos inflamatórios são complexos e se assemelham ao processo oncológico em muitas etapas. Em termos gerais o processo inflamatório se divide em duas grandes categorias: agudo e crônico. A inflamação aguda é parte da resposta natural do corpo à infecção ou lesão e pode ser considerada uma resposta adaptativa, contanto que permaneça dentro de limites saudáveis. A resposta geralmente começa localmente e representa um programa altamente conservado evolutivamente de reações relacionadas à imunidade inata, que é relativamente "conectada" (isto é, modificável, mas não evitável). A resposta aguda à infecção e inflamação está intimamente relacionada à defesa imunológica, cicatrização de feridas e reparo de tecidos. As principais características são o recrutamento de leucócitos para o local da lesão, por meio de mecanismos quimiotáticos e a liberação de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias. A inflamação crônica, por sua vez, é caracterizada por persistência, disseminação e falha em se tornar completamente resolvida ou reprimida, levando a doenças secundárias de alta gravidade, inclusive cognitivas.

Em termos estatísticos, estima-se que 3 em cada 5 pessoas no mundo sofra de alguma condição inflamatória (aguda ou crônica), representando mais de 2 bilhões de pessoas em condição inflamatória.

Nanoestruturas apresentam características peculiares devido ao seu tamanho reduzido. Dentre elas, novas propriedades eletrônicas, mecânicas, térmicas, quânticas, aumento da área superficial e de reatividade química, capacidade de formar sistemas complexos com vários elementos químicos e moléculas. Por esses motivos, as nanopartículas viabilizam o desenvolvimento de novas estratégias em inovação e pesquisa, com especial foco nos sistemas de entrega de medicamento.

Os sistemas de entrega de agentes terapêuticos e de diagnóstico são uma realidade no gerenciamento de algumas doenças, como no tratamento do câncer de próstata, pelo sistema de entrega associado ao acetato de leuprorrelina, trazendo inúmeros benefícios ao tratamento. Além disso, ao introduzir as nanopartículas aos sistemas de entrega as vantagens provenientes desses materiais podem ser aproveitadas como: (i) controle do tamanho, forma e composição das nanopartículas durante a síntese, atendendo as necessidades particulares do tratamento e diagnóstico; (ii) melhorar o transporte e acesso às barreiras naturais através do controle da interação com biomoléculas; (iii) multifuncionalização com moléculas de alta especificidade a tecidos e células, importante para o endereçamento aos alvos de interesse e para manipulação do microambiente tumoral; (iv) o escape do sistema mononuclear fagocitário aumentando a biodisponibilidade.

Para melhorar a atuação dos nanocarreadores, é importante identificar biomarcadores moleculares altamente específicos presentes em tecidos afetados por células cancerígenas. Estes biomarcadores melhorariam o transporte dos agentes terapêuticos e de diagnóstico ao tecido alvo, aumentando a eficácia e diminuindo a resistência inata, além de minimizar efeitos adversos, ao diminuir a exposição de células saudáveis à ação direta ou indireta dos tratamentos. Em relação a esses biomarcadores, muitos estudos propõem novos sistemas de entrega decorados com ligantes de alta especificidade aos alvos moleculares presentes nos tumores que melhorariam a bioacumulação dos agentes no tecido tumoral, silenciariam mecanismos de progressão tumoral, aumentariam a especificidade a diversos tecidos, entre outras estratégias.

Dentre esses ligantes moleculares, o peptídeo arginina-glicina-ácido aspártico (RGD) é uma molécula que se liga às integrinas  $\alpha\beta3$  superexpressas no endotélio tumoral durante a angiogênese, e presentes nos tumores malignos de próstata, nos melanomas, carcinomas de mama, e neuroblastomas. Estas integrinas são bons biomarcadores e estão sendo multifuncionalizados às nanopartículas para direcionamento de diversos agentes.

Atualmente, agentes quimioterápicos atuam no ciclo do folato, isso ocorre em resposta a superexpressão dos receptores de superfície envolvidos na absorção de vitamina B12, folato e biotina, sendo fundamental para o crescimento tumoral, mas em decorrência da administração tradicional geram resistência e efeitos adversos. Por isso, estratégias que explorem essa via metabólica por direcionamento podem melhorar o tratamento e imageamento de tumores malignos com essas características metabólicas como no carcinoma de mama.

A doxorubicina (DOX) é um potente agente quimioterápico utilizado no tratamento de diversos tumores líquidos e sólidos, incluindo o câncer de mama e de próstata. A DOX entra nas células cancerígenas por difusão passiva, é metabolizada, gerando espécies reativas de oxigênio no citoplasma, causando estresse oxidativo, gera danos ao DNA mitocondrial, ao ser internalizado pela mitocôndria, induz apoptose na célula pela cascata das caspases e inibe as enzimas topoisomerases I e II, gerando mais radicais livres, ativando a expressão de genes como p53, inibindo a proliferação celular e induzindo apoptose. No entanto, induz reações adversas, principalmente cardiotoxicidade, e pode gerar resistência. Logo, um sistema de entrega de alta especificidade aos tecidos alvos é essencial para aumentar a eficácia do tratamento.

Por fim, diversas ferramentas para diagnóstico não invasivo que empregam radiofármacos/radioisótopos fornecem visualização de alta sensibilidade de processos biológicos estão disponíveis. No entanto, a entrega seletiva de um radioisótopo para visualizar uma região de interesse assim como o depósito de energia suficiente nesta região são desafios atuais.

Por isso, as nanopartículas carreadoras associadas a radionuclídeos específicos são promissores veículos de transporte de radioisótopos para sítios alvos de tecidos acometidos por células cancerígenas e/ou por processo inflamatório, propiciando uma classe altamente específica e tecnologicamente superior no combate ao câncer: os nanorradiofármacos. Em relação aos radionuclídeos disponíveis, o tecnécio ( $^{99m}\text{Tc}$ ) é extensivamente utilizado, pois apresenta características ideais como meia-vida curta (6 h), emissão de raios gama ideal (140 keV), baixa toxicidade, grande reatividade que permite ligações químicas, e baixo custo.

## 2. Objetivo

Desenvolver novas nanopartículas de Grafeno (G) e seus derivados (Grafeno Quantum Dots (GQDs) e Óxido de Grafeno (GO)), incorporadas com agente quimioterápico e anti-inflamatórios, decoradas com o peptídeo e anticorpos monoclonais e radiomarcadas com tecnécio-99m ( $^{99m}\text{Tc}$ ) para o desenvolvimento de um novo teranóstico eficiente e seguro com uso para oncologia (câncer de próstata e mama) e inflamação (artrite e artrite reumatoide).

### 2.1. Objetivos específicos

Sintetizar nanopartículas de G, GQDs e GO;

Caracterizar as nanopartículas de G, GQDs e GO quanto ao tamanho, homogeneidade, morfologia, composição e as propriedades ópticas, químicas e estruturais;

Multifuncionalizar as nanopartículas de G, GQDs e GO;

#### 2.1.1. Oncologia

Radiomarcas as nanopartículas de G, GQDs e GO com  $^{99m}\text{Tc}$ ;

Realizar estudo toxicológico *in vitro* para determinar a segurança das nanopartículas de G, a eficiência das nanopartículas multifuncionalizadas;

Avaliar a inibição do potencial *in vitro* de tumor de mama e próstata;

Avaliar interação com Soro Albumina Humana *in vitro*;

Analisar a biodistribuição e a atividade antineoplásica *in vivo* das nanopartículas multifuncionalizadas e radiomarcadas no tratamento de camundongos BALB/c saudáveis e xenoinxertados com tumor de mama ou próstata.

## 3. Justificativa

O câncer é altamente letal, quando associado a diagnóstico tardio, tratamento ineficaz e aos efeitos colaterais do tratamento. Uma das formas viáveis de atenuar essa letalidade é através do uso da nanotecnologia aplicada à radiofarmácia e ao tratamento individualizado.

A inflamação é uma doença de proporções globais, responsável por mais de 2 bilhões de pacientes e com severas consequências, em particular no caso da crônica.

De forma geral, o uso de nanofármacos e nanorradiofármacos vem aumentando e estes se destacam por oferecerem possibilidade de diagnóstico precoce, de forma não invasiva e/ou de tratamento diferenciado em estágios iniciais com efeitos colaterais reduzidos.

O grafeno e seus derivados, tem se mostrado eficientes e potentes agentes terapêuticos e diagnósticos. Suas propriedades intrínsecas, associadas as propriedades diagnósticas e terapêuticas dos radionuclídeos favorecem seu uso e permitem o desenvolvimento de produtos inovadores, únicos em sua concepção e com capacidade de real de utilizada transladada.

Assim, de modo a melhorar as abordagens terapêuticas e diagnósticas tanto para o câncer, como para processos inflamatórios complexos, o desenvolvimento de nanopartículas multifuncionalizadas e radiomarcadas utilizando como base o grafeno e seus derivados associados a elementos radionuclídeos diagnósticos ( $^{99m}\text{Tc}$ ) e terapêuticos ( $^{223}\text{Ra}$ ) se apresentam como uma opção viável possibilitando o diagnóstico e/ou tratamento mais eficiente e eficaz.