

PRISCILA IZABEL SANTOS DE TÓTARO

**APLICAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS MULTIFUNCIONAIS BASEADAS EM
FOSFATO DE CÁLCIO COMO PLATAFORMA PARA IMAGEAMENTO E
TRATAMENTO DO CANCER DE MAMA.**

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FEVEREIRO DE 2017

PRISCILA IZABEL SANTOS DE TÓTARO

**APLICAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS MULTIFUNCIONAIS
BASEADAS EM FOSFATO DE CÁLCIO COMO
PLATAFORMA PARA IMAGEAMENTO E TRATAMENTO
DO CANCER DE MAMA.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular do Departamento de Morfologia, do Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Orientador: Prof. José Dias Corrêa Jr.

Instituto de Ciências Biológicas

Universidade Federal de Minas Gerais

Fevereiro de 2017

043 Tótaro, Priscila Izabel Santos de.
Aplicação de nanopartículas multifuncionais baseadas em fosfato de cálcio como plataforma para imageamento e tratamento do câncer de mama *in vitro* [manuscrito] / Priscila Izabel Santos de Tótaro. - 2017.

85 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Prof. Dr. José Dias Corrêa Júnior.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular.

1. Neoplasias da Mama. 2. Nanopartículas. 3. Fosfato de cálcio. 4. Doxorrubicina. I. Corrêa Júnior, José Dias. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 576



Universidade Federal de Minas Gerais - Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular

**ATA DA DEFESA DE TESE DE DOUTORADO DE
PRISCILA IZABEL SANTOS DE TÓTARO**

178/2017
entrada
1º/2013
2013670367

Às oito horas e trinta minutos do dia 23 de fevereiro de 2017, reuniu-se, no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, a Comissão Examinadora da Tese, indicada pelo Colegiado do Programa, para julgar, em exame final, o trabalho final intitulado: "APLICAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS MULTIFUNCIONAIS BASEADAS EM FOSFATO DE CÁLCIO COMO PLATAFORMA PARA IMAGEAMENTO E TRATAMENTO DO CANCER DE MAMA IN VITRO", requisito final para obtenção do grau de Doutora em Biologia Celular, área de concentração: **Biologia Celular**. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, **Dr. José Dias Corrêa Júnior**, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata, para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição de resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Prof./Pesq.	Instituição	Indicação
Dr. José Dias Corrêa Júnior	UFMG	APROVADA
Dr. Guilherme Mattos Jardim Costa	UFMG	APROVADA
Dr. André Luiz Branco de Barros	UFMG	Aprovada
Dr. Ênio Ferreira	UFMG	Aprovado
Dr. Antônio Carlos Santana de Castro	UFJF	Aprovada
Dra. Silvia Ligorio	Fund. Ezequiel Dias	Aprovador

Pelas indicações, a candidata foi considerada: APROVADA
O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ATA, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. **Belo Horizonte, 23 de fevereiro de 2017.**

Dr. José Dias Corrêa Júnior (Orientador) _____
 Dr. Guilherme Mattos Jardim Costa _____
 Dr. André Luiz Branco de Barros _____
 Dr. Ênio Ferreira _____
 Dr. Antônio Carlos Santana de Castro _____
 Dra. Silvia Ligorio _____

Obs: Este documento não terá validade sem a assinatura e carimbo do Coordenador

Prof.ª Luciana de Oliveira Andrade
COORDENADORA DO PROGRAMA DE
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR (ICBI/UFMG)

“Tudo tem o seu tempo determinado, e há tempo para todo o propósito debaixo do céu.”

Eclesiastes 3:1

Dedico este trabalho ao meu pai Geraldo Ben-Lucas Tótaro que foi o pilar de positividade e apoio desta jornada.

Agradecimentos

Agradeço a Deus que concedeu e me concede luz, oportunidades de aprendizado, sabedoria, e bênçãos muito além do que eu mereço.

Ao Professor José Dias Corrêa Júnior, que me deu a oportunidade de realizar este trabalho e ajudou a torná-lo possível e melhor, sendo paciente ao acompanhar o meu amadurecimento.

Ao Professor Alfredo Miranda Góes que nos honrou com seu conhecimento e pareceria ao gentilmente aceitar ser parte deste trabalho. Sua imensurável colaboração e disposição em fornecer a ajuda de uma das equipes mais competentes da UFMG foram essenciais na obtenção da maioria dos resultados obtidos.

Aos professores colaboradores deste trabalho: Geovani Cassali, Rodrigo Resende, José Bento Borba, Gustavo Menezes, e Mônica Cristina que gentil e prontamente disponibilizaram seus laboratórios, equipe, ou material, e cujas contribuições intelectuais fizeram enorme diferença.

Aos brilhantes alunos de doutorado Anderson Santos e Thaís Martins pela ajuda infinita durante os ensaios realizados no departamento de Bioquímica. A competência e inteligência de vocês me inspiram e servem de exemplo.

À minha colega de laboratório e amiga Betânia Alvarenga, cuja contribuição prática para este trabalho é muito significativa, pela coragem de ter sido pioneira nos estudos com as nanopartículas fosfatadas em nosso laboratório, gerando resultados de credibilidade e abrindo caminho para novos alunos, como eu. Obrigada por tornar os dias de trabalho mais divertidos, dividindo comigo momentos alegres durante esses 4 anos.

Ao meu namorado Matheus que é uma fonte inesgotável de amor, atenção, e paciência por ter me ajudado de infinitas formas e por tornar a minha vida mais feliz e melhor.

À amiga Vanessa Valente que em 2013 abriu as portas de sua casa em Belo Horizonte para mim durante a seleção para o doutorado, inundando esse momento com positividade, alto astral e boas vibrações, me ensinando tudo o que eu precisaria saber sobre o ICB e a UFMG. Eu não teria conseguido sem você!

Aos amigos da UFMG: Diego Reis, André Figueiredo, Joice Dias, e Raquel Alvarenga por todo o carinho, presença e suporte durante o curso e na vida em Belo Horizonte.

Aos amigos de Viçosa: Felipe Cardoso, Joel Couceiro, Márcio Martins, Carlos Stopato, Nelson Lage, Eulálio Marques e Carol Dorim por estarem sempre presentes nos bons e nos maus momentos, apesar da distância.

Aos amigos da Biologia – UFV 2006: Sabrina Oliveira e Guilherme Ferreira, cuja importância é inabalável, mesmo depois de mais 10 anos.

Aos amigos de Ubá: Luiz Gustavo e Talita pelos muitos anos de amizade que é imune ao tempo, e à ausência. Obrigada por todo amor e confiança de saber que para nós o tempo não passa.

À Vovó Darci e Tia Julinha; às minhas irmãs Ana Cecília e Rayane, e aos meus pais Geraldo e Izabel por representarem o amor incondicional e a confiança de uma família.

Este trabalho foi realizado nos seguintes laboratórios:

- Laboratório do Estudo da Interação Químico-Biológica e Reprodução Animal, vinculado ao departamento de Morfologia do Instituto de Ciência Biológicas (ICB) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG);

- Laboratório de Patologia Comparada, vinculado ao departamento de Patologia do Instituto de Ciência Biológicas (ICB) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG);

- Laboratório de Imunologia Celular e Molecular, vinculado ao departamento de Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciência Biológicas (ICB) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG);

- Laboratório de Sinalização Celular e Nanobiotecnologia vinculado ao departamento de Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciência Biológicas (ICB) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG);

- Laboratório de Química Analítica, vinculado ao Departamento de Química do Instituto de Ciências Exatas (ICEX), da Universidade Federal de Minas Gerais.

Contou com apoio das seguintes agências de fomento:

- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

RESUMO

Sistemas nanoestruturados funcionalizados podem ser utilizados para imageamento e administração de fármacos no tratamento de tumores, incluindo o câncer da mama. Estes sistemas permitem abordagens alternativas mais eficientes apresentando redução de efeitos colaterais sistêmicos, e baixo custo frente aos métodos de diagnóstico e terapias convencionais. Nanopartículas multimodais são potenciais ferramentas no diagnóstico e localização de células tumorais *in vivo* atuando de forma menos invasiva. As nanopartículas baseadas em fosfato de cálcio são eficientes no carreamento de muitos tipos de marcadores fluorescentes e drogas antimitóticas. Neste trabalho, foi sintetizado e caracterizado físico-quimicamente compostos nanoestruturados fosfatados (CNF) funcionalizados com substâncias orgânicas (PEG, ácido hialurônico e rodamina 6G (R6G)), visando a caracterização físico-química de seus efeitos biológicos em células de tumor mamário humano que super expressam o gene para o receptor de ácido hialurônico, CD44 (MCF-7 e MDA-MB-231). Não houve redução da viabilidade celular em células MCF-7 e MDA-MB-231 tratadas com CNF, e CNF funcionalizadas com PEG, HA e R6G. A internalização de CNF funcionalizada em células MDA-MB-231 foi quantificada por observação em tempo real *in vitro*, e confirmada por técnicas de microscopia óptica e eletrônica. A distribuição intracelular de CNF em células MCF-7 foi detectada no citoplasma e no núcleo por imagens fluorescentes obtidas em microscópio confocal. A associação de CNF com doxorubicina produziu um “load” de aproximadamente 18% e células MDA-MB 231 e MCF-7 tratadas com as nanopartículas resultantes dessa associação tiveram significativa redução percentual na viabilidade celular. Estes dados reforçam a utilização potencial de CNF como uma nanopartícula não tóxica e de baixo custo para marcação de células tumorais CD44 positivas e carreamento de doxorubicina como antimitótico. A associação de CNF com doxorubicina é eficiente e reduz a viabilidade de células tumorais *in vitro*.

Palavras-chave: nanopartículas, funcionalização, imageamento, drug delivery, doxorubicina

ABSTRACT

Functionalized nanostructured systems can be used for imaging and administering drugs in the treatment of tumors, including breast cancer. These systems allow for more efficient alternative approaches presenting reduction of systemic side effects, and low cost compared to conventional diagnostic methods and therapies. Multimodal nanoparticles are potential tools in the diagnosis and localization of tumor cells *in vivo* acting less invasively. Calcium phosphate based nanoparticles are efficient in carrying many types of fluorescent markers and antimitotic drugs. In this work, it was synthesized and characterized physicochemically nanostructured phosphate-based composites (NPC) functionalized with organic substances (PEG, hyaluronic acid and rhodamine 6G (R6G)), aiming at the physical-chemical characterization of its biological effects in human mammary tumor cells that Super express the gene for the hyaluronic acid receptor, CD44 (MCF-7 and MDA-MB-231). There was no reduction of cell viability in MCF-7 and MDA-MB-231 cells treated with NPC, and NPC functionalized with PEG, HA and R6G. The internalization of functionalized CFN in MDA- MB-231 cells was quantified by real-time observation *in vitro*, and confirmed by optical and electron microscopy techniques. The intracellular distribution of NPC in MCF-7 cells was detected in the cytoplasm and in the nucleus by fluorescence images obtained by confocal microscopy. The association of NPC with doxorubicin produced a load of approximately 18% and MDA-MB 231 and MCF-7 cells treated with the nanoparticles resulting from this association had a significant percentage reduction in cell viability. These data reinforce the potential use of NPC as a non-toxic, low-cost nanoparticle for labeling CD44 positive tumor cells and loading doxorubicin as an antimitotic. The association of NPC with doxorubicin is efficient and reduces the viability of tumor cells *in vitro*.

Key words: nanoparticles, functionalization, imaging, drug delivery, doxorubicin

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação espacial das taxas brutas de incidência de neoplasia maligna da mama feminina por 100 mil mulheres, estimadas para o ano de 2016 no Brasil.....	19
Figura 2 - Visão geral do papel das enzimas HASEs e do AH em células tumorais e em uma célula estromal normal.....	23
Figura 3 - Aplicações e áreas de interesse na pesquisa em nanomedicina	25
Figura 4 – Esquema representando o Efeito de Permeabilidade e Retenção Aumentada (<i>EPR</i>) observado em tumores	26
Figura 5 - Representação da fórmula estrutural da doxorubicina	30
Figura 6 - Fotomicrografias de CNF e CNFF obtidas por microscopia eletrônica de varredura	45
Figura 7 - Distribuição de diâmetro de CNF em nanômetros (nm)	46
Figura 8 - Espectros obtidos por microanálise de raio-x para CNF e CNFF mostrando sua composição elementar.....	46
Figura 9 - Difração de raio-x para a hidroxiapatita cristalina, o porta-amostra do equipamento e para CNF	47
Figura 10 - Espectros de absorvância da água pura e CNF, poli-etilenoglicol, ácido hialurônico e CNFF.....	48
Figura 11 - Absorvância de CNFF complexado com fluorocromo rodamina 6G (0,1 mM), sobrenadantes obtidos após lavagens sucessivas	49
Figura 12 - Imunohistoquímica para CD44 realizada em células MCF7 e MDA-MB-231	50
Figura 13 - Viabilidade celular de células MDA-MB-231 e MCF-7 tratadas com CNF, CNFF, CNFFF e rodamina 6G.....	52
Figura 14 - Células MDA MB 231 expostas a rodamina 6G livre e a CNFFF e monitoradas em tempo real.....	53
Figura 15 - Quantificação de fluorescência de células MDA MB 231 expostas a rodamina livre 6G e CNFFF e monitoradas em tempo real	54
Figura 16 - Imagens obtidas por microscopia confocal mostrando células MCF-7 tratadas com CNFFF por 10 minutos	55
Figura 17 - Imagens obtidas por microscopia confocal mostrando células MCF-7 tratadas com CNFFF por 20 minutos	56

- Figura 18** - Imagens obtidas por microscopia confocal mostrando células MCF-7 tratadas com CNFFF por 20 minutos, mostrando detalhes do compartimento nuclear.....57
- Figura 19** - Imagens de microscopia eletrônica de varredura de células MDA-MB-231 e MCF-7 após 30 minutos de exposição à CNFFF.....58
- Figura 20** - Espectros de microanálise de raio-x obtidos a partir de um cristais de cloreto de sódio e CNFFF presentes na amostra contendo células MDA-MB-231 e MCF-7 expostas a CNFFF.....59
- Figura 21** - Espectros de absorvância para os sobrenadantes obtidos após lavagem de CNFF-DOX em quatro concentrações de nanopartícula.....60
- Figura 22** - Espectros de absorvância obtidos para CNFF-DOX após lavagem nas quatro concentrações de nanopartículas.....61
- Figura 23** - Morfologia de células de tumor mamário humano após 24 horas de exposição ao tratamento com Doxorubicina e CNFF-DOX.....62
- Figura 24** - Viabilidade de células de tumor mamário humano tratadas com diferentes concentrações de CNFF-DOX e doxorubicina livre.....63

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Caracterização de CNF, CNFF e das moléculas orgânicas usadas no processo de funcionalização, em relação ao potencial zeta e condutividade..... .44

TABELA 2 - Load de Doxorubicina em CNFF-DOX de acordo com a concentração de nanopartícula adicionada ao sistema.....61

LISTA DE ABREVIACOES

INCA	Instituto Nacional do Câncer
OMS	Organizao Mundial de Saúde
BCA1	Gene <i>Breast Cancer 1</i> .
BCA 2	Gene <i>Breast Cancer 2</i> .
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
NPs	nanoprticulas
EPR	<i>Enhanced Permeability and Retention</i>
EGFR	receptor do fator de crescimento epidérmico
A431	linhagem celular de carcinoma epidérmico humano
MRI	<i>Magnetic Resonance Imaging</i>
PET	<i>Positron Emission Tomography</i>
NMRI	<i>Nuclear Magnetic Resonance Imaging</i>
CDDP	cisplatina
DOX	doxorubicina
MCF-7	linhagem celular de tumor mamário humano
MDA-MB-231	linhagem celular de tumor mamário humano
PEG	poli-etilenoglicol
AH	cido hialurônico
EGa1	anticorpo anti-EGFR VHH
TRC105	anticorpo monoclonal anti-endoglina
DI17E6	anticorpo monoclonal anti- integrina alpha v
C(RGDyK)	peptídeo arginina-glicina-ácido aspártico-D-tirosina-lisina

PLA	ácido láctico
AS1411	aptâmero ligante de nucleolina
PLGA	ácido láctico-co-glicólico
CD44	proteína receptora transmembrana
R6G	rodamina 6G
CNF	compósito nanoestruturado fosfatado
CNFF	compósito nanoestruturado fosfatado funcionalizado
CNFFF	compósito nanoestruturado fosfatado funcionalizado fluorescente
CNFF-DOX doxorubicina	compósito nanoestruturado fosfatado funcionalizado associado à doxorubicina
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
SFB	soro fetal bovino
Log	logarítimo
mg	miligrama
mL	mililitro
µg/mL	micrograma por mililitro
µM	micromolar
mM	milimolar
M	molar
Rpm	rotações por minuto
nm	nanômetros
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-diphenil tetrazólio brometo
µL	microlitro

SDS	dodecil sulfato de sódio
PBS	tampão fosfato salino
BSA	albumina do soro bovino
PPD	p-fenilenediamina; 1,4-fenilenediamina
KGy	kilogray
mBar	milibar
mS cm ⁻¹	miliSiemens por centímetro
mV	milivolt
°C	graus Celsius
MEV	microscopia eletrônica de varredura
kV	quilovolts
UAF	unidades arbitrárias de fluorescência
PEI	poli-etilenoimina
Cy3	cianina 3
Dy550	<i>DyLight Fluor 550</i>
CTT	células tronco tumorais
AgNPs	nanopartículas de prata
HMMs	macrófagos derivados de monócitos humanos
DRG	linhagem de células do gânglio da raiz dorsal de ratos
U37311	linhagem de células de neuroblastoma humano
C612	linhagem de células de tumor glial de ratos
HepG2	linhagem de células de fígado humano
HeLa	linhagem de células de tumor cervical uterino humano

TATp	peptídeo TAT
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
BT20	adenocarcinoma mamário humano
C26	linhagem de células de câncer de cólon murino
CD44 McAb	anticorpo monoclonal para CD4
ROS	espécies reativas de oxigênio
MEC	matriz extra-celular
HMWHA	ácido hialurônico de alto peso molecular
LMWHA	ácido hialurônico de baixo peso molecular
HASes	hialuronan sintases
HYALs	endoglicosidades

SUMÁRIO

I.INTRODUÇÃO	18
1. Câncer de Mama	19
2. O papel do ácido hialurônico (AH) e do seu receptor (CD44) no câncer	22
3.Panorama Geral da Nanotecnologia.....	24
4. Uso de NPs no tratamento e diagnóstico de câncer	25
5. Aspectos gerais da doxorubicina (DOX)	29
II.JUSTIFICATIVA	32
III. OBJETIVOS.....	33
IV.METODOLOGIA	35
1.Síntese de Compostos Nanoestruturados Fosfatados (CNF)	35
2.Obtenção de compostos nanoestruturados fosfatados funcionalizados (CNFF).....	35
3.Obtenção de compostos nanoestruturados fosfatados funcionalizados fluorescentes (CNFFF).....	36
4.Caracterização de CNF, CNFF e CNFFF	36
5. Ensaio Biológicos.....	38
6. Avaliação da potencial utilização de CNFF como carreador de doxorubicina no tratamento de células de tumor mamário humano	41
7. Análises Estatísticas.....	43
V.RESULTADOS	44
1. Caracterização de CNF, CNFF e CNFFF	44
2. Ensaio Biológicos.....	50
3. Avaliação da potencial utilização de CNFF como carreador de doxorubicina no tratamento de células de tumor mamário humano	59
VI.DISSCUSSÃO	63
VII. CONCLUSÃO.....	72
VIII. REFERÊNCIAS.....	73

INTRODUÇÃO

1. Câncer de Mama

Para os anos de 2016 e 2017 foram previstos, para o Brasil, 596 mil novos casos de câncer. Entre os homens são esperadas 295.200 ocorrências e entre as mulheres, 300.800. O número de novos casos de câncer de mama estimado para o Brasil em 2016 foi de 57.960, e exceto pelos tumores de pele não melanoma, esse tipo de câncer é o mais frequente nas mulheres das regiões Sudeste, Sul, Centro-Oeste e Nordeste. (Ministério da Saúde/INCA, 2016) (**Ilustração 1**). Dentre os principais tipos de tumores ocorrentes em mulheres, o câncer de mama é o que possui a maior incidência e a maior mortalidade em todo o mundo.

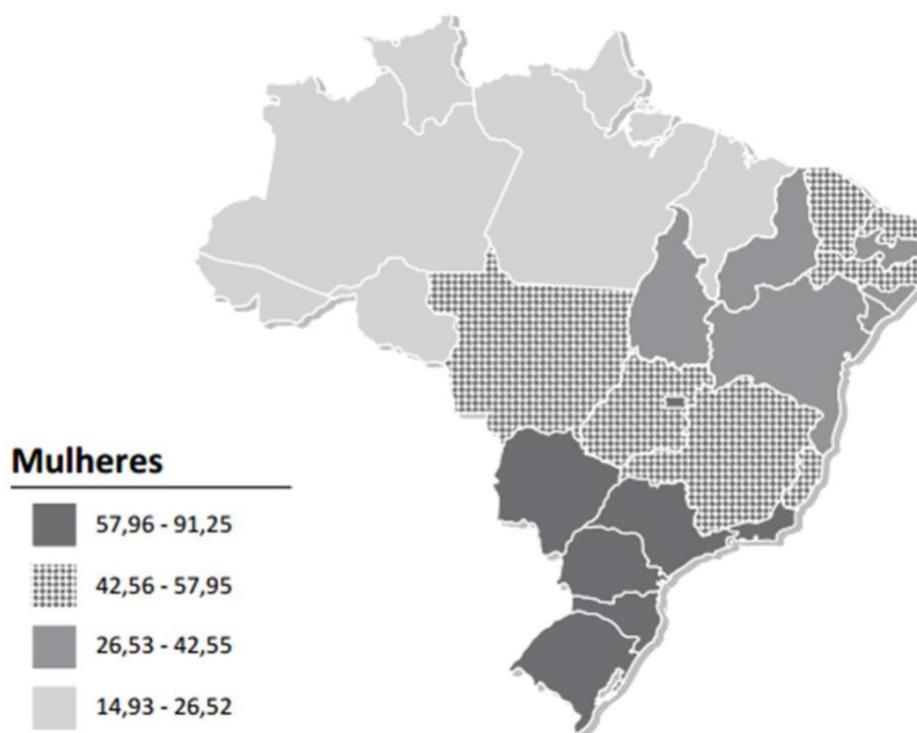


Figura 1: Representação espacial das taxas brutas de incidência de neoplasia maligna da mama feminina por 100 mil mulheres, estimadas para o ano de 2016 no Brasil, por unidade de federação. Fonte: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2016/sintese-de-resultados-comentarios.asp>.

Levando em consideração a natureza anatômica da mama feminina, o câncer de mama é categorizado como uma doença heterogênea com relação a aspectos clínicos e morfológicos. Em 2012, a Organização Mundial De Saúde (OMS) publicou a 4ª edição da “Classificação para Tumores de Mama”, que categoriza a doença em mais de 20 subtipos diferentes. A

maior parte (cerca de 80%) dos tumores mamários origina-se no epitélio dos ductos glandulares, sendo denominados: “carcinoma ductal invasivo”. Os demais subtipos de carcinomas que podem ser diagnosticados são: o lobular, o tubular, o mucinoso, o medular, o micropapilar e o papilar (Ministério da Saúde/INCA, 2017). Com relação aos fatores de risco que podem levar à ocorrência de tumores de mama o avanço da idade pode ser citado como o principal (Altekruse et al., 2016). O histórico de saúde familiar (Colditz et al., 1996) a hereditariedade (Colditz et al., 2012; Malone et al., 2011; Cybulski e Jakubowska, 2011), o consumo de álcool (Hamajima et al., 2002), a densidade do tecido mamário (Boyd et al., 2009; McCormack e Dos Santos, 2006), a ação de hormônios estrogênicos (Kaaks et al., 2005 A e B), o histórico do uso de terapias hormonais (Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer, 1997), obesidade (Wolin et al., 2010; Morimoto et al., 2002), o histórico pessoal de ocorrência de tumores mamários benignos (Goldacre et al., 2010), a raça (Razzaghi et al., 2012), e a exposição das mamas à radiação (Andrieu et al., 2006) são outros fatores de risco do câncer de mama em mulheres.

Cerca de 85% dos tumores mamários ocorrentes em mulheres são causados por mutações nos genes *BRCA1* e *BRCA2* (Blackwood e Weber, 1998). Para mulheres portadoras de mutação nos genes *BRCA1* e *BRCA2* o risco estimado de desenvolver câncer de mama é de 40 a 85% (Frank et al., 1998). Entretanto, a prática de atividade física e a alimentação saudável com a manutenção do peso corporal estão associadas a uma diminuição de aproximadamente 30% do risco de desenvolver câncer de mama. A mamografia bienal para mulheres entre 50 a 69 anos é a estratégia recomendada pelo Ministério da Saúde no Brasil para o diagnóstico precoce do câncer de mama, e para as mulheres consideradas grupo de risco elevado para desenvolvimento de câncer de mama, recomenda-se o acompanhamento clínico individualizado (Ministério da Saúde/INCA, 2017).

Sendo o diagnóstico precoce o responsável por uma boa chance de cura do câncer de mama, a clínica médica dispõe atualmente de múltiplas estratégias para a detecção de tumores. A mamografia, nome dado ao exame de raio-x das mamas, detecta anormalidades no tecido mamário e é amplamente usada como exame de rotina em pacientes assintomáticas. O exame de ultrassom é indicado quando algum sinal de ocorrência de tumores foi observado previamente, e consegue detectar massas sólidas no tecido mamário. O imageamento por ressonância magnética é recomendado para a complementação de diagnósticos inconclusivos ou para acessar a extensão das lesões. Essa técnica submete o tecido mamário a um campo magnético que gera imagens detalhadas, diferenciando tecidos tumorais dos normais. Em

alguns casos, para a confirmação da ocorrência de um tumor mamário, é necessária a remoção de uma quantidade de tecido das mamas para análise em laboratório (biópsia). A biópsia pode ser feita por aspiração auxiliada por seringas ou por meio de cirurgia. A escolha dessa técnica para diagnóstico de tumores de mama leva em conta aspectos individuais de cada lesão. (National Breast Cancer Foundation INC, 2017).

Os tratamentos convencionais para o câncer de mama envolvem cirurgia, quimioterapia, radioterapia ou hormonioterapia, a depender das condições clínicas e psicológicas das pacientes, bem como do avanço do tumor (Bergmann et al., 2000). Radio, quimioterapia e cirurgia apresentam desvantagens como: ineficácia no combate a metástases e dano às células saudáveis dos tecidos adjacentes (Boyle & Levin, 2008).

A quimioterapia é um tratamento à base de medicamentos injetáveis com o objetivo de matar células tumorais *in locu* ou em outras partes do corpo. O grande inconveniente da quimioterapia é que a aplicação intravenosa de medicamentos tóxicos causa efeitos colaterais diversos. A quimioterapia pode envolver a aplicação de mais de um fármaco combinados, serve pra tratar tumores em estágios iniciais ou avançados e pode ser indicada antes ou depois da remoção cirúrgica do tumor (Breastcancer.org, 2017). As principais substâncias químicas usadas na elaboração de quimioterápicos comerciais, com marca registrada, utilizados no tratamento do câncer de mama incluem paclitaxel, carboplatina, ciclofosfamida, gencitabina, eribulina, ixapebilona, mutamicina, novantrona, vinorelbina, docetaxel, capecitabina, e também, a doxorubicina. Essas medicações causam efeitos colaterais sistêmicos conhecidos, e no caso de quimioterápicos à base de doxorubicina os principais efeitos deletérios em pacientes são: baixa contagem de glóbulos brancos no sangue, baixa contagem plaquetária com alto risco de sangramento, perda de apetite, perda de cabelo, eritrodisestesia palmar-plantar, mudanças no aspecto e consistência das unhas, náusea, vômitos, feridas bucais, alterações no ciclo menstrual, e cardiotoxicidade (Breastcancer.org, 2017).

A administração de agentes terapêuticos a sítios tumorais encontra uma série de problemas, tais como: resistência tumoral às drogas causada por barreiras fisiológicas em nível celular e não celular e a biotransformação e eliminação dos fármacos do organismo, geralmente causada pelo baixo peso molecular desses compostos (Brigger et al., 2002). Por conta disso, as doses administradas, em via sistêmica, ao paciente durante o tratamento são muito altas o que aumenta a ocorrência dos efeitos colaterais já citados.

Devido à relevância do câncer de mama na saúde pública mundial, à importância de um diagnóstico precoce, acurado e não invasivo, e à necessidade cada vez mais crescente de se encontrar terapias que minimizem os efeitos colaterais e aumente a qualidade de vida da paciente, o câncer de mama é um ponto importantíssimo de interesse em muitas pesquisas médicas atuais em todo o mundo.

2. O papel do ácido hialurônico (AH) e do seu receptor (CD44) no câncer

Estrutura e Metabolismo do AH

O AH é uma das moléculas mais abundantes na matriz extracelular (MEC) e pertence à família das glicosaminoglicanas. As unidades monoméricas do AH são os dissacarídeos *N-acetil-D-glicosamina* e o *ácido D-glucorônico*, que se ligam por ligações do tipo β formando oligômeros ou polímeros que podem alcançar de 6 a 8 MDa e um comprimento de 1nm (Karousou et al., 2016). A molécula de AH, embora seja encontrada predominantemente na forma secretada, também ocorre dentro de células e associada à membrana celular, onde se liga não covalentemente a glicoproteínas. O AH é amplamente distribuído nos tecidos conjuntivos de mamíferos na forma de um gel altamente hidratado (Rugheimer et al., 2009), tendo o papel de promover a migração e a proliferação celulares, especialmente durante a embriogênese (3). Existe relação direta entre o AH e o processo de desenvolvimento e progressão de tumores, sendo essa molécula importante na proliferação celular e na ocorrência de metástase. Nesse âmbito, o tamanho da molécula de AH influencia a resposta gerada em tumores. O AH de alto peso molecular (HMWHA) se relaciona com a proliferação celular, enquanto a molécula de baixo peso (LMWHA) modula a angiogênese e eventos pró- inflamatórios (6,7). O tamanho da molécula de AH depende diretamente das enzimas que se relacionam com o seu metabolismo. Enzimas que sintetizam o AH são chamadas hialuronan sintases (HASes), que em mamíferos, ocorrem nas isoformas HAS1, 2 e 3, enquanto a degradação do AH é realizada por 6 tipos de endoglicosidases (HYALs). A atividade dessas enzimas depende do pH do meio e da possível ligação com outras moléculas (Karousou et al., 2016).

2.2 O Papel do AH no câncer

Devido às suas funções relacionadas à migração, interação, adesão, comunicação, e ao crescimento celular o AH está diretamente associado a processos patológicos como o câncer. Vários tipos tumorais produzem quantidades maiores de AH que os tecidos normais ou

induzem sua produção através da liberação de fatores de crescimento e citocinas (Misra et al., 2015). O metabolismo do AH pelas enzimas de síntese e degradação desencadeia uma série de eventos relacionados ou independentes que culminam em migração, invasão, proliferação em células tumorais (**Figura 2**).

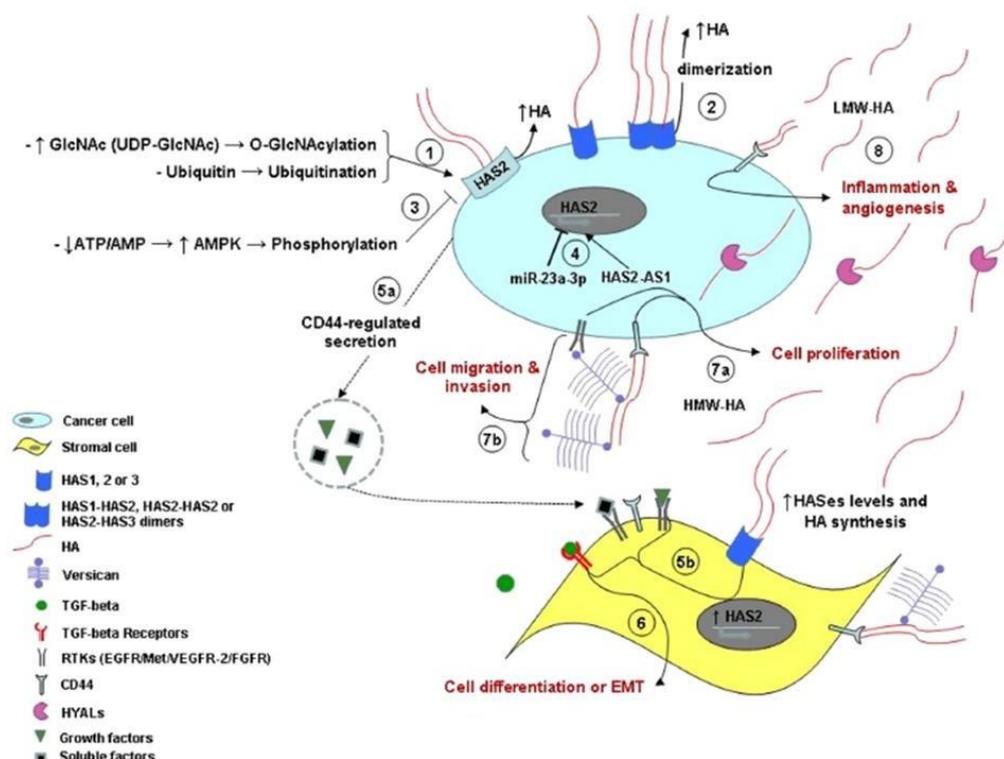


Figura 2: Visão geral do regulamento das HASes e interações parácrinas entre células tumorais e células do estroma.

2.3. Aspectos gerais da proteína receptora CD44

As proteínas CD44 participam do reconhecimento de uma variedade de sinais no microambiente celular, o que as torna reguladoras da adesão entre células e entre células e a MEC, com forte papel no controle da proliferação, diferenciação, migração e sobrevivência celular, tendo a capacidade de se ligar a domínios na MEC, a fatores de crescimento, citocinas, metaloproteínas, e ao AH. Essas características, associadas à ocorrência de múltiplos domínios intracelulares em CD44 justifica a sua contribuição na gênese de tumores (Karousou et al., 2016).

O CD44 é uma glicoproteína transmembrana que atua como receptor endocítico de AH em queratinócitos, condrócitos e células de tumor mamário humano (Culty et al., 1994; Tammi et al., 2001). A internalização do AH via endocitose mediada por CD44 requer a

acilação da porção citoplasmática do receptor (Thankamony e Knudson, 2006). A internalização do AH se dá por meio de associação do CD44 com balsas lipídicas na membrana celular, num processo em que o receptor interage com proteínas de endocitose, podendo ser incorporado de volta à membrana ao final do processo (Skandalis et al., 2010; Eyster et al., 2011).

A endocitose de AH via receptores CD44 pode ser aplicada em sistemas de “*drug-delivery*” para o direcionamento de agentes quimioterápicos (incorporados a nanopartículas) a células tumorais, principalmente aquelas que expressam CD44 em níveis aumentados. Assim sendo, a funcionalização de nanopartículas (NPs) usando glicosaminoglicanos, especialmente ácido hialurônico (AH) é uma estratégia promissora para aumentar a afinidade de NPs por células cancerosas. Uma vez que o CD44 é considerado um dos mais amplamente aceitos marcadores de superfície celular para uma variedade de células cancerosas, incluindo as linhagens de tumor de mama humano MDA-MB-231 e MCF-7, a interação CD44 e AH pode ser usada como um alvo potencial para a terapia e diagnóstico de câncer.

3. Panorama Geral da Nanotecnologia

A “nanotecnologia”, embora não seja um conceito recente, tem ganhado novo destaque na última década. O prefixo “nano” significa “um bilionésimo de metro”, portanto, nos padrões da ciência de materiais, o termo nanotecnologia é usado pra se referir à fabricação e o uso de estruturas diversas em escala nanométrica (de 1 a 1000nm) (*International Union of Pure and Applied Chemistry – IUPAC*, 2017). De modo conceitual, a nanotecnologia pode ser definida como a ciência que permite a possibilidade de se trabalhar em nível molecular, átomo a átomo numa combinação de materiais biológicos e leis da física, química e genética para o desenvolvimento de estruturas sintéticas de proporções métricas muito reduzidas (McNeil, 2005; Fortina et al, 2005).

As pesquisas atuais envolvendo a nanotecnologia têm permitido o desenvolvimento de sistemas altamente funcionais cuja aplicação no tratamento de doenças é denominada “Nanomedicina” pelo *National Institutes of Health*, dos Estados Unidos (Yiyao et al., 2007). Os principais esforços das pesquisas em nanomedicina concentram-se no desenvolvimento de sistemas de administração de agentes terapêuticos e diagnósticos (“*drug-delivery*” e imageamento) (Moghimi et al., 2005). Os avanços nessa área tem sido promissores, uma vez que sistemas nanoestruturados possuem características biológicas únicas que permitem superar os inconvenientes dos métodos de diagnóstico e administração de fármacos no

tratamento de diversas doenças (Koo et al., 2005). Nanopartículas de natureza diversa como, *quantum dots*, NPs de sílica, dendrímeros, micelas, conjugados moleculares, lipossomas, microbolhas de ultrassom e nanotubos de carbono tem sido amplamente utilizadas como potenciais agentes de entrega de fármacos e imageamento em diversas doenças (Yiyao et al., 2007). Esses nanomateriais apresentam vantagens como: estabilidade biológica, biocompatibilidade, podem ser administradas por rotas variadas e são capazes de incorporar um número considerável de moléculas diferentes (Del Burgo, et al., 2013). Um resumo das aplicações da nanomedicina é mostrado na **Figura 3**.

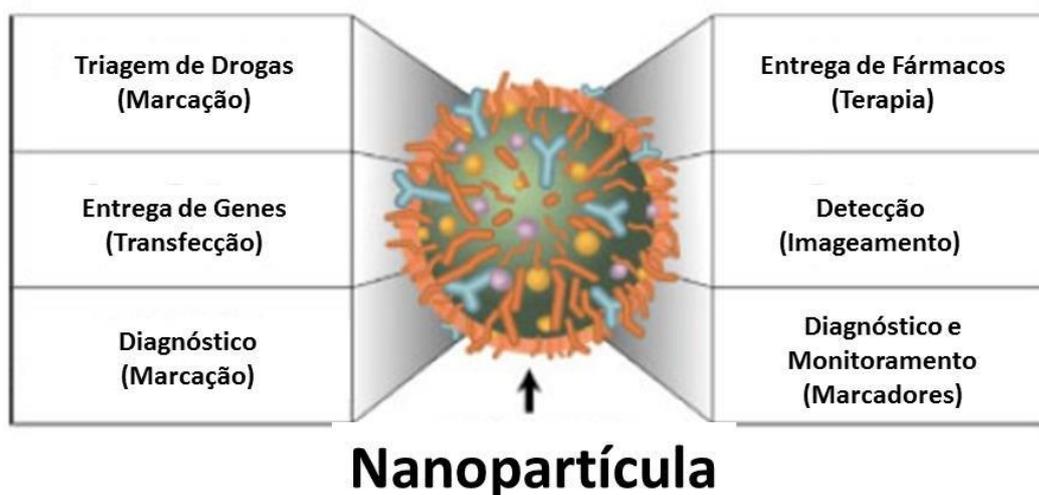


Figura 3: Aplicações e áreas de interesse da pesquisa em nanomedicina. Adaptado de Yiyao et al., 2007.

4. Uso de NPs no tratamento e diagnóstico de câncer

Uma estratégia proposta a fim contornar problemas decorrentes da administração e entrega de fármacos a sítios tumorais é a associação de drogas antimitóticas a nanopartículas. O objetivo dessa associação é superar as barreiras celulares e não celulares causadoras da resistência tumoral à medicação e aumentar a seletividade das drogas por células tumorais, diminuindo assim os efeitos colaterais dos tratamentos. NPs, usadas em sistemas poliméricos de *drug-delivery*, podem ser o que chamamos de “nano esferas” nas quais a droga fica dispersa em toda a NP ou “nano capsulas” onde o fármaco permanece encapsulado em uma matriz aquosa ou oleosa, cercada por uma membrana polimérica (Brigger et al., 2002). A associação de drogas anti-tumorais ou marcadores tumorais a nanopartículas também é vantajosa porque promove o aumento do acúmulo dessas substâncias na vasculatura tumoral e posteriormente no tumor, um fenômeno conhecido como Efeito de Permeabilidade e Retenção Aumentada (do inglês, *EPR*) (Matsmura e Maeda, 1986) (**Figura 4**).

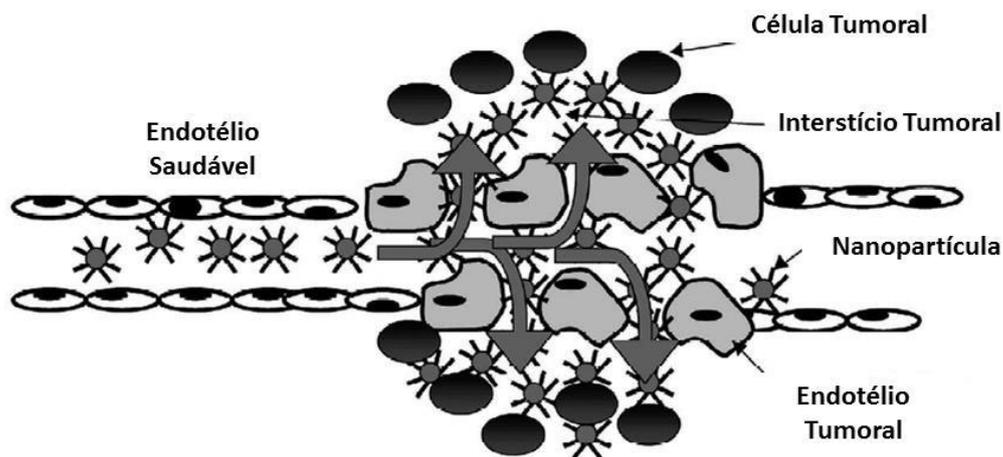


Figura 4: Esquema representando o Efeito de Permeabilidade e Retenção Aumentada (EPR) observado em tumores. O endotélio tumoral possui células morfologicamente alteradas o que produz espaços intercelulares maiores, em comparação com o endotélio normal. Esse efeito, associado ao tamanho reduzido de nanopartículas, e á ausência de vasos linfáticos tumorais, permite que elas atravessem esses capilares tumorais, se acumulem e permaneçam retidas no ambiente tumoral, posteriormente alcancem as células cancerosas. Adaptado de Brigger et al., 2012.

Um grande desafio na pesquisa oncológica é a detecção precoce de tumores, o que motiva o uso de agentes de contraste, tais como marcadores de imagem que podem ser específicos para tipos de células (Bornhop, et al., 2001), como as de tumor mamário. (Morawski, et al., 2005; Lin, et al., 2005). As plataformas de monitoramento ou diagnóstico devem envolver um fluoróforo que: retenha seu estado de dispersão em soluções ou ambientes fisiológicos, tenha intensidade de sinal prolongada, seja capaz de se acumular em regiões de interesse e ser eficientemente eliminado do corpo após o uso (Rao, et al., 2007).

O uso de nanopartículas como ferramenta de marcação e detecção de tumores constitui uma alternativa promissora em relação aos métodos usados atualmente, uma vez que esses materiais, quando associados com marcadores fluorescentes, protegem essas moléculas da degradação e as tornam mais estáveis, em comparação com sua forma livre, aumentando a precisão das análises de interesse (Brigger, et al., 2002).

Nanopartículas no imageamento de tumores

Nesse cenário, a nanotecnologia trouxe ao imageamento de tumores a possibilidade de melhora no rendimento das moléculas marcadoras *in vivo* (Rao, et al., 2007) Além disso, nanopartículas marcadoras podem ser usados para a detecção quantitativa e qualitativa de células tumorais *in vitro*, com mais eficiência (Irène, et al., 2002). Seguindo essa proposta,

Gulyaev e colaboradores (1999), utilizaram nanoesferas de poli-estireno fluorescentes revestidas com estreptavidina, denominadas Fluospheres® (fluorescência verde) e TransFluospheres® (fluorescência vermelha) em citometria de fluxo para detectar o receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) em células de carcinoma epidérmico humano (A431), *in vitro*, onde a encapsulação do marcador fluorescente produziu nanopartículas híbridas mais fluorescentes do que conjugados simples de corantes únicos. Podemos encontrar ainda uma vasta gama de nanopartículas usadas no imageamento do câncer *in vitro* e *in vivo* (Dhruba et al., 2010). O *quantun dot*, um nanocristal de semicondutores, funciona como uma sonda de luminescência com potencial em aplicações biológicas. A principal tarefa associada aos *quantun dots* é a obtenção de uma formulação não tóxica, biodegradável e estável, uma vez que a fluorescência começa a ser perdida em soluções aquosas, e pela ocorrência de um grande potencial tóxico associado a *quantun dots* devido à sua associação com metais pesados (Dhruba et al., 2010). Nanopartículas também têm sido utilizados para melhorar o imageamento e o diagnóstico de tumores também por Ressonância Magnética (*MRI*) (Sun et al., 2008; Shubayev et al., 2009; Veiseh et al., 2010). Nanopartículas de óxido de ferro pod

em facilitar o monitoramento de tumores em tempo real, podendo ser usadas como agentes de contraste para *MRI* (Josephson et al., 1988). No entanto, nanopartículas de óxido de ferro têm baixa eficiência em alcançar grandes profundidades teciduais, o que limita seu uso (Dhruba et al., 2010). Outra abordagem possível é o uso de nanopartículas incorporadas ao gadolínio (Gd), onde, por exemplo, a incorporação de Gd em nanopartículas de quitosana aumenta seu tempo de retenção no tecido tumoral *in vivo* (Tokumitsu, et al., 1999). A Tomografia por Emissão de Positrons (*PET*) é uma das ferramentas de imageamento médico mais utilizadas, especialmente devido à sua natureza não invasiva (Dhruba et al., 2010). Desta forma, as nanopartículas marcadas podem aumentar a sensibilidade da *PET*, utilizando (Ghanem et al., 1993) fluoróforos e isótopos radioativos, (Nahrendorf et al., 2010) por exemplo.

Devido a essas múltiplas possibilidades, as nanopartículas tem sido associadas ao conceito de “transporte multimodal”. Imageamento por diferentes ferramentas tais como a microscopia de fluorescência, o PETSCAN, a NMRI (*Nuclear Magnetic Resonance Imaging*) entre outras, com o uso de nanopartículas, tem agregado informações na pesquisa do câncer, devido a melhora proporcionada no diagnóstico e localização de células cancerosas em modelos animais (Tabackovic et al, 2012).

Nanopartículas como sistema de “drug-delivery”

Nanopartículas usadas como sistemas de “*drug-delivery*” para agentes terapêuticos no tratamento do câncer de mama têm sido alvo de estudos recentes (Lee et al, 2014; Shen et al, 2015; Wang et al, 2015; Zhong et al, 2015). Cheng e colaboradores (2007) usou cisplatina pura (CDDP) associada a uma nanopartícula de fosfato de cálcio e avaliou seu efeito em células de tumor ovariano humano. A associação de nanopartículas a drogas antimitóticas é uma alternativa promissora no que diz respeito à diminuição dos efeitos colaterais sistêmicos da quimioterapia e ao aumento da eficácia dos tratamentos (Bae et al, 2011). A doxorubicina (DOX) em baixas concentrações (0,25 a 2µg/mL) carregada por nanopartículas funcionalizadas com ácido hialurônico foi mais eficiente na redução da viabilidade celular em MCF7 e MDA-MB-231 que a droga livre, nas mesmas concentrações (Wang et al., 2015). Seguindo essa linha, nanopartículas lipídicas sólidas, funcionalizadas com ácido hialurônico, foram eficientes na entrega de paclitaxel em células de melanoma humano e reduziram a viabilidade de modo mais eficaz que a droga livre (Shen et al., 2015).

Outra característica desejável atribuída a nanopartículas é a ampla possibilidade de modificação de suas superfícies, num processo conhecido funcionalização (Dhruba e Shaker, 2010). Isso é extremamente vantajoso na terapia tumoral já que para ser usada como agente terapêutico ou de detecção de tumores, uma nanopartícula precisa conter, associado à sua matriz, um ligante com afinidade para um ou mais receptores característicos ou com expressão aumentada em células cancerosas. Nanopartículas também necessitam de estabilidade coloidal *in vitro* e uma camada estabilizadora pode ser formada pela incorporação de uma camada polimérica hidrofílica. O poli-etileno-glicol (PEG) é o material mais comum usado para este propósito (Wang et al., 2010). O PEG é uma boa escolha para funcionalização devido à sua hidrofílicidade e flexibilidade (Bergstrom et al., 1994). Para abordagens *in vivo* o PEG aumenta a circulação de nanopartículas na circulação sanguínea evitando a sua interação com proteínas plasmáticas e células mononucleares do sistema fagocitário (Allen et al., 2002).

Funcionalização de nanopartículas para tratamento de câncer (targeting)

Ao interagir com as células, nanopartículas tendem realizar interações não-específicas com a superfície celular. Deste modo, a adição de um ligante de direcionamento é necessária para aumentar a afinidade celular e a internalização de NPs através da endocitose mediada. É importante, também, diferenciar as células e os tecidos saudáveis das células cancerosas,

assim os ligantes de direcionamento devem ter especificidade para os receptores com expressão aumentada em células cancerosas, e minimamente ou normalmente expressos em células saudáveis. Um ligante ideal deve possuir elevada afinidade para os seus receptores e ter a capacidade de induzir a endocitose mediada pelo receptor (Wang et al., 2010).

A funcionalização de nanopartículas com o objetivo de aumentar sua afinidade por células tumorais envolve alguns tipos de moléculas biológicas. Podemos destacar anticorpos como EGa1, TRC105, DI17E6 ligados a micelas poliméricas, micelas e nanopartículas de albumina de soro humano, respectivamente, para administração de doxorubicina. A utilização de peptídeos ou proteínas é comum. O peptídeo cíclico de arginina-glicina-ácido aspártico-D-tirosina-lisina (C (RGDyK)), é associado nanopartículas de poli (ácido láctico) (PLA) para entrega de paclitaxel e doxorubicina. Os lipídios, assim como os antagonistas do receptor da integrina, participam do direcionamento de nanopartículas à vasculatura tumoral (Hood, 2002) e aptâmeros como AS1411, que se liga à nucleolina e foi usado para funcionalizar nanopartículas de ácido poli (ácido láctico-co-glicólico) (PLGA) para administração de paclitaxel a células tumorais (Guo, 2011).

5. Aspectos gerais da doxorubicina (DOX)

A doxorubicina (C₂₇H₃₀ClNO₁₁, de peso molecular 579,99 g/mol), é uma base fraca anfipática altamente hidrofílica (solubilidade em água 10 mg por 1 mL) derivada de bactérias do gênero *Streptomyces* (Mosafer et al., 2017). Nos anos 1960, foi isolada uma nova cepa de *Streptomyces peucetius* capaz de sintetizar um pigmento vermelho a partir do qual se produziu um antibiótico com boa atividade antitumoral. O novo composto, de nome daunorubicina foi eficaz no tratamento de linfoma e leucemia, porém em 1967 foi provado que a daunorubicina causava efeitos cardiotoxicos fatais. Modificações genéticas em *Streptomyces spp.* levaram à produção de um novo composto, a adriamicina, posteriormente chamada doxorubicina. A manipulação desses compostos abriu o caminho para inúmeras pesquisas subsequentes e atualmente, existem cerca de 2000 análogos à doxorubicina conhecidos. (Rivankar, 2010). Os antibióticos do tipo antraciclina têm uma estrutura anelar tetra cíclica associada a um açúcar incomum, o daunosamina. Agentes citotóxicos desta classe contendo quinona e hidroquinona em anéis adjacentes possuem capacidade de ganho e perda de elétrons.

Apesar de apresentarem diferenças acentuadas no uso clínico, os análogos à doxorubicina diferem em suas estruturas químicas em um único grupo hidroxil no carbono 14 (**Figura 5**).

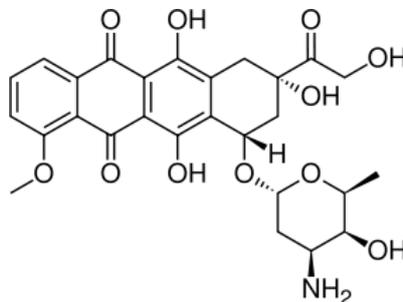


Figura 5: Fórmula estrutural da doxorubicina. Fonte: www.medicallook.com/reviews/Doxorubicin.html

O uso terapêutico da doxorubicina deve considerar aspectos do fármaco, como por exemplo, o fato de que a droga não é absorvida no trato gastrointestinal e por ser extremamente irritante aos tecidos deve ser administrada via intravenosa. A meia vida da doxorubicina no sangue é de 12 a 18 horas e a distribuição em compartimentos extra vasculares é ampla e rápida. Sua taxa de ligação a proteínas plasmáticas é de 75%, embora a doxorubicina não seja capaz de transpor a barreira hematoencefálica. O metabolismo da doxorubicina acontece no fígado produzindo como metabólito principal o 13-OH- doxorubicinol, que também possui certo nível de atividade antitumoral, produzido pela enzima aldo-keto redutase. A depuração da DOX no plasma é de 324 a 809 ml/min e sua excreção ocorre pelas vias biliar e fecal. (Kumar et al., 2014).

Em nível celular, a doxorubicina interage com o DNA por intercalação bloqueando a síntese de macromoléculas. Sequencialmente, inibe a ação da topoisomerase II (comprometendo o processo de transcrição) e causa uma quebra na dupla-fita impedindo a duplicação do material genético. Adicionalmente, a doxorubicina tem a habilidade promover a geração de radicais livres que causam danos ao DNA e às membranas celulares (Rivankar, 2010). A capacidade de promover eventos citotóxicos e consequente morte celular tem sido a razão do uso da doxorubicina como agente terapêutico no tratamento de patologias hematológicas, sarcomas e carcinomas (Mosafer et al., 2017). A doxorubicina é comumente usada no tratamento de tumores de bexiga, mama, estômago, pulmão, ovários, tireóide, mieloma múltiplo e linfoma de Hodgkin.

Os tratamentos de tumores baseados na doxorubicina, de modo geral podem incluir: adriamicina, ciclofosfamida, taxotere, adriamicina, bleomicina, vimblastina, dacarbazina, bleomicina, vincristina, procarbazona e prednisona, ciclofosfamida, e 5-fluorouracilo. A dosagem de doxorubicina, e compostos análogos, geralmente usada na quimioterapia de pacientes com câncer de mama é de $90\text{mg}/\text{m}^2$ de superfície corporal (Lankelma et al., 1999) e os efeitos colaterais decorrentes da toxicidade sistêmica desses compostos são bem conhecidos e limitam seu uso. São relatados casos de cardio, mielo, e nefrotoxicidade e de geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) (Teymouri et al., 2015). Uma alternativa que vem sendo amplamente explorada para minimizar os efeitos colaterais da doxorubicina é a sua associação com carreadores nanométricos que promovem uma mudança na distribuição farmacológica da droga reduzindo os níveis de acumulação no coração, e por consequência, a cardiotoxicidade.

A associação de doxorubicina com nanopartículas envolve materiais de natureza lipídica sólida (Oliveira et al., 2016), lipossomas (Rivankar, 2010), nanopartículas inorgânicas de sílica, (Jing et al., 2016; Wang et al., 2015), hidroxiapatita (Victor et al., 2014) e fosfato de cálcio (Liang et al., 2012) Os resultados obtidos mostram ampla acumulação em sítios tumorais com acentuada eficiência terapêutica. Sendo a doxorubicina um composto de toxicidade elevada, é de grande interesse médico e farmacológico o desenvolvimento de métodos que possibilitem a criação de sistemas menos agressivos às células saudáveis e ao mesmo tempo eficazes no tratamento de tumores.

II. JUSTIFICATIVA

Ensaio preliminares conduzidos em nosso laboratório (LIQBRA) permitiram a síntese de compósitos nanoestruturados fosfatados (CNF) de baixo custo e fácil manuseio. A caracterização físico-química do material sugeriu a possibilidade de sua funcionalização, via auto-arranjo (“*self-assembly*”) com substâncias orgânicas de interesse, como o ácido hialurônico (AH), o PEG e o fluorocromo Rodamina 6G (R6G). Dessa forma, os compósitos usados no presente trabalho, constituem potenciais plataformas multimodais para a detecção e marcação de células tumorais *in vitro*. A associação do referido material com a doxorubicina (DOX), um quimioterápico de atividade conhecida, pode apresentar-se como proposta eficiente para o desenvolvimento de um protocolo terapêutico com vantagens sobre os métodos atualmente aplicados.

III. OBJETIVOS

1. Objetivo Geral

Avaliar o uso e o efeito biológico de compósitos nanoestruturados fosfatados (CNFs) como matriz multifuncional para diagnóstico e tratamento de células de tumores mamários humanos *in vitro*.

2. Objetivos Específicos

Caracterizar físico-química e morfologicamente CNFs, através da determinação do potencial zeta e do uso de técnicas de difração de raio-x, microanálise de raio-x, e microscopia eletrônica de varredura.

Funcionalizar CNFs com ácido hialurônico (AH) e poli-etilenoglicol (PEG) obtendo de um compósito nanoestruturado fosfatado funcionalizado (CNFF).

Caracterizar opticamente soluções aquosas de CNF e CNFF obtendo-se o espectro de absorvância desses compósitos nos comprimentos de onda de 200 a 1000nm.

Associar CNFF ao fluorocromo rodamina 6G (R6G) obtendo-se um compósito nanoestruturado fosfatado funcionalizado e fluorescente (CNFFF).

Caracterizar opticamente CNFFF obtendo-se o espectro de absorvância desse compósito nos comprimentos de onda de 200 a 1000nm.

Verificar a expressão do receptor para ácido hialurônico (CD44) em células de tumor mamário humano (MCF-7 e MDA-MB231) através da técnica de imunohistoquímica.

Avaliar o efeito citotóxico de CNF, CNFF e CNFFF em células de tumor mamário humano CD44⁺ (MCF-7 e MDA-MB-231).

Verificar a internalização de CNFFF em células MCF-7 e MDA-MB-231, através do uso de microscopia confocal, microscopia ótica com observação em tempo real, microscopia eletrônica de varredura e microanálise de raio-x.

Associar de CNF com o antimitótico doxorubicina e obtenção de um nanocompósito nanoestruturado fosfatado associado à doxorubicina (CNFF-DOX).

Quantificar a porcentagem de ligação da doxorubicina a CNFF através de elaboração de curva padrão e obtenção de equação fornecendo valores de concentração em função da absorbância.

Avaliar o efeito citotóxico de CNFF-DOX, e da doxorubicina livre, em células de tumor mamário humano CD44⁺.

IV. METODOLOGIA

1. Síntese de Compostos Nanoestruturados Fosfatados (CNF)

Os compósitos nanoestruturados fosfatados (CNF) foram sintetizados no Laboratório do Estudo da Interação Físico-Química e Reprodução Animal, no Departamento de Morfologia, ICB-UFMG, em meio líquido com pH controlado, utilizando-se soluções contendo sais fosfatados e ânions de reconhecida atividade biológica associados a modificadores do estado cristalino ($\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ - Cromoline; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ - Cromoline; $\text{KSb}(\text{OH})_6$ - Sigma; $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ - Synth), em um sistema de membranas semipermeáveis (Spectrum Medical Industries, Inc). As condições experimentais e metodológicas constam em pedido de patente e encontram-se protegidas nos depósitos registrados sob os números BR 10 2012032493-8, BR 10 2013032731-0 e BR 13 2015031111-6.

Posteriormente à síntese, os CNFs foram isolados por centrifugação a 3500 rpm por 10 minutos, descartando-se o sobrenadante. Os precipitados resultantes foram lavados três vezes com etanol absoluto (Merck) e após nova série de centrifugação, secos em estufa a 60° C por 48 horas. Alíquotas de 1 mg de CNF foram inseridas em microtubos cônicos de polipropileno (Eppendorf) e esterilizadas por irradiação gama, na dose de 25 kGy, no Laboratório de Irradiação Gama - LIG, CDTN-UFMG.

Para as análises subsequentes, soluções estoque de 1 mg de CNF foram eluídas em água milli-Q ou meio de cultura Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), imediatamente antes da utilização.

2. Obtenção de compostos nanoestruturados fosfatados funcionalizados (CNFF)

Suspensões aquosas de CNF (1mg/mL) homogeneizadas em vórtex por 5 minutos receberam 3µL de Ácido Hialurônico (9,71mg/mL) (Galena Química e Farmacêutica LDTA). Após nova homogeneização a solução resultante recebeu 3µL de polietileno-glicol (PEG 400 - Synth), em temperatura ambiente. Todas as análises envolvendo CNFFs foram realizadas após o tempo mínimo de 15 minutos e em, no máximo, 24 horas após a funcionalização.

3. Obtenção de compostos nanoestruturados fosfatados funcionalizados fluorescentes (CNFFF)

A uma suspensão de CNFF (1mg/mL) foram adicionados 20µL de rodamina 6G (Sigma- Aldrich) (1mM) com posterior agitação em vórtex por 5 minutos. As amostras obtidas foram lavadas quatro vezes para remoção do excesso de fluorocromo antes de cada procedimento realizado, e utilizadas após o mínimo de 15 minutos e em no máximo 24 horas após a sua obtenção.

4. Caracterização de CNF, CNFF e CNFFF

Obtenção do Potencial Zeta de CNF e CNFF

Para obtenção do potencial zeta de CNF e CNFF foi utilizado o equipamento Zetasizer Nano Series (Malvern), do Laboratório de Biofísica Molecular, ICB-UFMG. Um volume de 200µL de solução estoque de CNF e CNFF (1mg/mL em água mili-Q) foi adicionado a 2mL de água destilada. As suspensões resultantes foram inseridas nas cubetas do equipamento e as leituras efetuadas e registradas após a homogeneização e estabilização das amostras.

Distribuição de diâmetro, morfologia e composição elementar de CNF e CNFF

Alíquotas de 10µL de solução estoque de CNF e CNFF (1mg/mL em água mili-Q) foram depositadas sobre lamínula de carbono (Termanox®), secas ao ar, metalizadas no vácuo a 10^{-5} mBar, com carbono no evaporador Hitachi modelo HUS4G. As amostras processadas foram então analisadas nos microscópios de varredura FEG Quanta 200 (FEI) e JEOL JSEM 6340 no Centro de Microscopia Eletrônica da UFMG, onde foram adquiridas as imagens por elétrons secundários, utilizando-se aumentos variando entre 5.000 e 50.000x. Os diâmetros de CNF foram obtidos através da técnica de morfometria realizada no programa ImagePro Plus 4.0. As distribuições de diâmetro foram geradas no programa GraphPad Prism 5.0.

Espectros de energia de raio-X dispersiva foram obtidos no microscópio eletrônico FEG Quanta 200 (FEI) operando a 15KeV, sendo os elementos químicos ocorrentes nas amostras identificados através de seus picos característicos.

Obtenção do padrão de cristalinidade de CNF

Alíquotas de 3mg de CNF foram previamente secas e então depositadas sobre suportes de silício do Difratorômetro de Policristais (Geigerflex-RIGAKU), composto por bomba de Cu, com ângulo de leitura de 2θ a aproximadamente 70 graus, com passo de $0,1^\circ$ e tempo de acumulação médio de 1 hora. As contagens e análises foram realizadas no Laboratório de Cristalografia, do Departamento de Física da UFMG. Foram obtidos os difratogramas contendo a distribuição de intensidade do feixe difratado pelos diferentes planos cristalinos ou o padrão amorfo de CNF, da hidroxiapatita (essencialmente cristalina) e do porta amostras do equipamento, de natureza amorfa.

Obtenção do espectro de absorbância de CNF

Alíquotas de CNF ($5\mu\text{g/mL}$ e $250\mu\text{g/mL}$ em água mili-Q) foram adicionadas a poços de uma placa de 96 poços, e o volume final elevado a $100\mu\text{L}$. As amostras foram lidas em aparelho Varioskan Flash Multireader (Thermo) para medição de absorbância entre os comprimentos de onda de 200 a 1000nm.

Obtenção do espectro de absorbância de CNFF

Alíquotas ($150\mu\text{L}$) de CNFF ($750\mu\text{g/mL}$ em água mili-Q) receberam $25\mu\text{L}$ de ácido hialurônico ($9,71\text{mg/mL}$) e $3\mu\text{L}$ de PEG 400. A mistura resultante foi adicionada a uma placa de 96 poços com volumes elevados a $200\mu\text{L}$, com água milli-Q. Amostras controle foram preparadas com de água mili-Q, ácido hialurônico ($0,24\text{mg/mL}$), PEG 400 ($15,03\mu\text{L/mL}$), CNF (1mg/mL) e CNF associada somente a PEG 400. Todas as alíquotas tiveram seus valores de absorbância lidos entre os comprimentos de onda de 200 a 1000nm no aparelho Varioskan Multi Reader (Thermo).

Avaliação das propriedades ópticas de CNFFF

Alíquotas de $200\mu\text{L}$ de CNF (1mg/mL em água mili-Q) receberam $20\mu\text{L}$ de rodamina 6G ($1,0\text{mM}$). Ao sistema resultante, foram adicionados, sequencialmente, $25\mu\text{L}$ de ácido hialurônico ($9,71\text{mg/mL}$) e $3\mu\text{L}$ de PEG 400. Após cinco minutos de agitação em vórtex, as amostras foram centrifugadas por um minuto a 5000 rpm, foi retirado o sobrenadante (S1), e os precipitados resultantes eluídos em $200\mu\text{L}$ de água milli-Q. Esse processo foi repetido quatro vezes sendo os precipitados eluídos no mesmo volume de água mili-Q após a última centrifugação. Cada um dos sobrenadantes obtidos após as quatro lavagens (S1, S2, S3 e S4),

bem como o precipitado obtido, ou amostra final, tiveram os seus espectros de absorvância adquiridos entre os comprimentos de onda de 200 a 1000nm com a utilização do aparelho Varioskan Multi Reader (Thermo), em placa de 96 poços. Os dados foram plotados utilizando-se o valor de absorvância obtido para todas as amostras em 540 nm, valor máximo de absorvância do fluorocromo, utilizando o programa Origin Pro 8[®].

5. Ensaio Biológicos

Culturas Celulares

Células de tumor mamário humano das linhagens MCF7 e MDA-MB-231 foram mantidas em atmosfera umidificada com 5% de CO₂ a 37°C usando meio de cultura DMEM (Sigma-Aldrich) suplementado com 10% de FBS (Cripion Biotecnologia LTDA), bicarbonato de sódio a 5mM (Cinética Química LTDA), penicilina (100 U/mL), estreptomicina (0,1mg/mL), anfotericina B (0,25mg/mL) (Sigma-Aldrich) e gentamicina (60mg/mL) (Schering Plough). Antes dos ensaios, as trocas de meio de cultura foram realizadas a intervalo de 48 horas durante o período de expansão das células.

Detecção da expressão de CD44 em células de tumor mamário humano MDA-MB 231 e MCF7 via imunofluorescência

Células de tumor mamário humano das linhagens MDA-MB 231 e MCF-7 foram plaqueadas em placas de 48 poços, na densidade de $2 \cdot 10^4$ e $4 \cdot 10^4$, baseadas na capacidade de crescimento de cada linhagem, respectivamente. Após período de expansão de 48 horas, as células foram lavadas duas vezes em PBS (0,15M), fixadas em paraformaldeído (3,7%) por 20 minutos, novamente lavadas em PBS por duas vezes, e permeabilizadas com Triton X100 (0,2%) por 10 minutos. Após serem lavadas com PBS por 3 vezes, as células foram colocadas em solução de bloqueio (PBS + BSA 1%) por 30 minutos e incubadas com o anticorpo primário *anti CD44 ab41478 rabbit policlonal* (na concentração de 1:250), também em solução de bloqueio por 24 horas.

A incubação com anticorpo secundário *anti rabbit marcado com Alexa555* (na concentração de 1:500), em solução de bloqueio, durou 1 hora e ao final desse período as células foram lavadas três vezes com PBS por 5 minutos. A marcação nuclear foi feita com Dapi Blue (1µg/mL, diluído em solução de bloqueio) por 1 hora a temperatura ambiente.

Ao final dos procedimentos de marcação, as preparações foram observadas em microscópio de fluorescência invertido OLYMPUS IX70 utilizando-se a objetiva de 20X.

Avaliação da viabilidade de células de tumor mamário humano expostas a CNF, CNFF e CNFFF

A viabilidade das linhagens MCF7 e MDA-MB 231 não tratadas, desafiadas com CNF, CNFF, CNFFF e com rodamina 6G foram avaliadas após 24 horas de exposição aos tratamentos, por meio do ensaio que utiliza o 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-diphenil tetrazólio brometo, ou MTT. (Cat. M-6494; Invitrogen). A reação induzida se baseia na redução do sal tetrazólio em cristais de formazan pela enzima desidrogenase, que é ativa apenas em mitocôndrias de células viáveis.

Para isso 1.10^5 células foram semeadas em placas de 48 poços, com um volume final de 400 μ L de meio DMEM (suplementado com 10% de SFB) por poço. Os tratamentos, realizados em triplicata foram: CNF, CNFF, CNFFF a 1,0; 5,0 e 25,0 μ g/mL e rodamina 6G a 1,0; 5,0; e 25,0 μ M. As amostras controle não receberam nenhum tratamento. Todos os tratamentos foram realizados em triplicata. Após 24 horas de exposição, a viabilidade celular foi avaliada através do ensaio que utiliza o 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-diphenil tetrazólio brometo, ou MTT (Cat. M-6494; Invitrogen), e que se baseia na a redução do sal tetrazólio em cristais de formazan pela enzima desidrogenase, ativa apenas em mitocôndrias de células viáveis. Após o período de tratamento, o meio de cultura foi removido e foram adicionados 130 μ L de meio novo e 100 μ L de MTT em cada poço. As amostras foram mantidas em estufa de CO₂ por mais duas horas. Ao término desse intervalo, adicionou-se 130 μ L de SDS 10% HCl e após 18 horas de incubação as absorbâncias das amostras e de uma mistura de MTT e meio de cultura (branco) foram obtidas em leitor de ELISA utilizando comprimento de onda de 595nm. Após descontar o valor de absorbância obtido para a amostra do branco de cada valor experimental obtido, os gráficos de porcentagem de viabilidade celular foram plotados no programa GraphPadPrism[®].

Verificação da internalização de CNFFF em células de tumor mamário humano através de observação em tempo real “time-lapse”.

Células das linhagens MDA-MB 231 mantidas em cultivo sob as condições já descritas foram plaqueadas em dishes plásticos estéreis de 25mm de diâmetro, com lamínula de vidro no fundo, a densidade de 1.10^5 células em 1mL de DMEM (10% de soro fetal bovino). Após o período de incubação de 24 horas as células foram tratadas com 25 μ g/mL de CNFFF (preparada segundo protocolo já descrito) e 50 μ M de rodamina 6G livre. Amostras controle não receberam tratamentos.

Para a aquisição das imagens em tempo real foi utilizado aparelho BioStation IMq (NIKON, Tóquio, Japão) que inclui um microscópio invertido motorizado e uma câmera CCD resfriada de alta sensibilidade em um sistema integrado. As células permaneceram mantidas na câmara incubadora do aparelho com atmosfera (5% de CO₂) e temperatura (37°C) controladas. Após a aplicação dos tratamentos as amostras foram observadas por 30 minutos, obtendo-se um total de 30 imagens (uma foto por minuto), com 4 campos cada uma. As imagens foram analisadas no programa Image Pro Plus ® e os gráficos (unidades arbitrárias de fluorescência em função do tempo) plotados no GraphPad Prism® .

Verificação da internalização e localização intracelular de CNFFF em células de tumor mamário humano através de microscopia confocal

Células da linhagem MCF7 foram plaqueadas à densidade de $2,5 \times 10^4$ em lamínulas de vidro estéreis depositadas no fundo de poços de uma placa de 48 poços. Ao fim de 24 horas de incubação as células foram tratadas com 60µg/mL de CNFF associada ao fluorocromo rodamina 6G (CNFFF) durante períodos de 10 e 20 minutos. Ao final dos tempos de interação, o meio de cultura foi removido e as células fixadas em paraformaldeído (4%) por cinco minutos. Após a remoção do fixador, lavagens em tampão fosfato salino (10X) e permeabilização com Triton X-100 (0,2%) por 5 minutos, as células foram incubadas com 30µL de Faloidina 488 (Sigma Aldrich) (PBS-BSA 1:40) por 1 hora. Após nova lavagem, foram incubadas com 30µL de Dapi Blue (Sigma Aldrich) (PBS-BSA 1:1000) por 1 minuto. Todo o procedimento foi realizado na ausência de luz.

As lamínulas foram aderidas em lâmina de vidro com meio de montagem adequado para a preservação da fluorescência (Fluoroshield® com PPD (p-fenilenediamina; 1,4-fenilenediamina), (Sigma-Aldrich) e observadas em microscópio confocal (Nikon Eclipse Ti) para aquisição de imagens com aumentos de 40X. As imagens foram processadas no programa Image J.

Verificação da internalização de CNFFF em células de tumor mamário humano através de análises de ultra-estrutura por microscopia eletrônica de varredura e de composição elementar por microanálise de raio-x

Para a determinação da possível internalização de CNFFF, células MCF-7 e MDA-MB-232 foram cultivadas sobre lamínulas de vidro na densidade de 1×10^5 células por 1 mL em DMEM suplementado com 10% de SFB. Após um período de 24 horas para aderência e

expansão em estufa com atmosfera (5% de CO₂) e temperatura (37°C) controladas, as células foram desafiadas com CNFFF (25µg/mL) durante 24 horas. Após o tratamento, as amostras foram lavadas 3 vezes em PBS para remoção do meio de cultura. As lamínulas de vidro foram então secas ao ar, montadas com fita dupla de carbono sobre "stubs" de alumínio e metalizadas no vácuo a 10⁻⁵mBar, com carbono no evaporador Hitachi (HUS4G). As amostras processadas foram analisadas no Microscópio Eletrônico de Varredura FEG com Sistema de Nano-fabricação (FIB - Quanta FEG 3D FEI), constituído de: um sistema dual com feixe iônico e eletrônico, e um canhão de elétrons de emissão por efeito de campo. A resolução do aparelho foram de 0,8nm para o feixe eletrônico e a distância focal foi de 3 a 99 mm em alto e baixo vácuo. Para aquisição de imagens e análise das amostras foram utilizados os detectores de elétrons secundários, de elétrons retroespalhados e detector para obtenção de espectros de energia de raios-x dispersiva.

As imagens adquiridas por elétrons secundários foram utilizadas para a descrição morfológica da superfície das células e confirmação da integridade estrutural de CNFFF. Com as imagens obtidas por elétrons retroespalhados foram determinados os locais de maior eletro-densidade potencialmente contendo CNFFF. Para estas análises utilizamos voltagem de aceleração de eletrônica entre 5 e 15kV.

Os pontos eletro-densos selecionados em cada amostra foram analisados utilizando-se feixe de elétrons pontual com tempo de acumulação mínima de 90 segundos utilizando voltagem de aceleração de eletrônica de 30kV . A análise descrita gerou espectros de raio -X cujos picos correspondentes a elementos químicos foram identificados, possibilitando a determinação da composição elementar de cada ponto analisado.

6. Avaliação da potencial utilização de CNFF como carreador de doxorubicina no tratamento de células de tumor mamário humano

Elaboração de curva-padrão para doxorubicina

Soluções aquosas de doxorubicina (100, 10 e 1µg/mL) e a solução estoque (1mg/mL) foram lidas, num volume final de 200µL, em aparelho VARIOSKAN (Multi Reader Device – Thermo) nos comprimentos de onda de 200 a 1000nm. Os valores de absorbância obtidos para as soluções no comprimento de onda de 480nm foram usados para elaboração da curva- padrão (*absorbância x concentração*) para doxorubicina, usando-se o programa Origin Pro 8[®].

Preparação de compostos fosfatados nanoestruturados funcionalizados e associados à doxorubicina (CNFF-DOX)

A preparação de CNFF-DOX foi obtida a partir de alíquotas de 20 μ L de doxorubicina (1mg/mL). Cada alíquota recebeu concentrações crescentes de CNFF (0,1; 0,2; 0,3 e 0,4mg/mL), e foi eluída ao volume final de 200 μ L utilizando-se água milli-Q. Após centrifugação a 5000rpm por 1 minuto, os sobrenadantes foram separados e os e os precipitados resultantes novamente resuspendidos a 200 μ L de água milli-Q.

Cálculo da porcentagem de associação entre CNFF e doxorubicina

A associação entre doxorubicina (0,1mg/mL) e diferentes concentrações de CNFF (0,1; 0,2; 0,3 e 0,4mg/mL), foi calculada com o uso da curva padrão obtida para o soluções aquosas do fármaco. A equação de regressão e a linearidade (r^2) obtida foram $y=0,0039+0,0429x$ e 0,9998 respectivamente. Sendo y =absorbância e x =concentração de doxorubicina, foi possível calcular a concentração da droga presente em amostras de CNFF- DOX lavadas e nos seus respectivos sobrenadantes. O cálculo do carregamento, ou “load”, da droga à matriz nanoestruturada foi feita segundo a equação:

[DOX] incorporada = ([DOX] adicionada ao sistema) – ([DOX] detectada nos sobrenadantes).

A porcentagem de ligação de doxorubicina a CNF foi calculada com base na equação:

%DOX incorporada = [DOX] incorporada X 100/ [DOX] adicionada ao sistema.

Culturas Celulares

Linhagens de células de tumor mamário humano (MDA-MB-231 e MCF7) foram mantidas em atmosfera umidificada com 5% de CO₂ a 37°C usando meio de cultura DMEM (Sigma-Aldrich) suplementado com 10% de FBS (Cripion Biotecnologia LTDA), bicarbonato de sódio a 5mM (Cinética Química LTDA), penicilina (100 U/mL), estreptomicina (0,1mg/mL), anfotericina B (0,25mg/mL) (Sigma-Aldrich) e gentamicina (60mg/mL) (ScheringPlough). Antes dos ensaios, as trocas de meio de cultura foram realizadas a intervalo de 48 horas durante o período de expansão das células.

Avaliação da viabilidade de células de tumor mamário humano expostas a CNFF- DOX

Células das linhagens MCF7 e MDA-MB 231 foram semeadas em placas de 48 poços a densidade de $2 \cdot 10^4$ e $1 \cdot 10^4$ células/mL, respectivamente em um volume final de 400 μ L de meio DMEM (suplementado com 10% de SFB) por poço. O tratamento com CNFF-DOX foi realizado utilizando-se uma solução estoque preparada com CNFF a 0,4mg/ml e doxorubicina a 0,1 mg/mL que foi aliquotada de modo a prover a droga nas concentrações tratamento de 0,01; 0,1; 1 e 10 μ M. Tratamentos utilizando doxorubicina livre nas concentrações de 0,001; 0,01; 0,1 e 1 μ M e o controle positivo (sem nenhum tratamento) também foram realizados. Todos os tratamentos foram realizados em triplicata. Após 24 horas de exposição, a viabilidade celular foi avaliada através do ensaio que utiliza o 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5- diphenil tetrazólio brometo, ou MTT (Cat. M-6494; Invitrogen), e que se baseia na a redução do sal tetrazólio em cristais de formazan pela enzima desidrogenase, ativa apenas em mitocôndrias de células viáveis. Após o período de tratamento, o meio de cultura foi removido e foram adicionados 130 μ L de meio novo e 100 μ L de MTT em cada poço. As amostras foram mantidas em estufa de CO₂ por mais duas horas. Ao término desse intervalo, adicionou-se 130 μ L de SDS 10% HCl e após 18 horas de incubação as absorbâncias das amostras e de uma mistura de MTT e meio de cultura (branco) foram obtidas em leitor de ELISA utilizando comprimento de onda de 595nm. Após descontar o valor de absorbância obtido para a amostra do branco de cada valor experimental obtido, os gráficos de porcentagem de viabilidade celular foram plotados no programa GraphPadPrism[®].

7. Análises Estatísticas

As análises estatísticas realizadas resultados obtidos nos testes de viabilidade celular (MTT) foram feitas com o uso o programa GraphPad Prism 5.0 (Prism Software, Irvine, CA, USA) utilizando-se análises de variância (one-way ANOVA) seguidas de pós teste de Bonferroni. Os resultados foram expressos como média seguida de erro padrão, com intervalo de confiança de 95%. Resultados onde $p < 0,05$, foram considerados estatisticamente significativos.

V. RESULTADOS

1. Caracterização de CNF, CNFF e CNFFF

Potencial Zeta e Condutividade

O potencial zeta e a condutividade de CNF, CNFF, PEG, AH e AH+PEG são apresentados na Tabela 1. Os valores de potencial zeta das nanopartículas permaneceram negativos, variando de -23,0 mV (CNF) e -14,0 (CNFF). A condutividade variou de 0,0082 e 0,1780 mS.cm⁻¹ respectivamente. O processo de funcionalização diminuiu a carga negativa de nanopartículas.

Tabela 1: Caracterização de CNF, CNFF e das moléculas orgânicas usadas no processo de funcionalização, em relação ao potencial zeta e condutividade.

Molécula/CNF	Potencial Zeta (mV)	Condutividade (mS/cm)
AH	-24,7	0,227
PEG	-23,4	0,244
AH+PEG	-27,9	0,395
CNF	-23,0	0,0082
CNFF	-14,2	0,1780

Morfologia e distribuição de diâmetro

Os CNFs sintetizados apresentaram forma esférica e superfície rugosa, como mostrado por microscopia eletrônica de varredura (MEV) (**Figura 6**). As imagens obtidas com feixe de elétrons secundários, adquiridas com voltagem de aceleração de 15kV, permitiram determinar que os CNFFs mantiveram a forma esférica e são encontrados imersos nas frações orgânicas adicionadas ao sistema (PEG e AH). O diâmetro médio dos CNFs foi de 149nm com um intervalo de confiança de 95% entre 136 e 147nm (**Figura 7**).

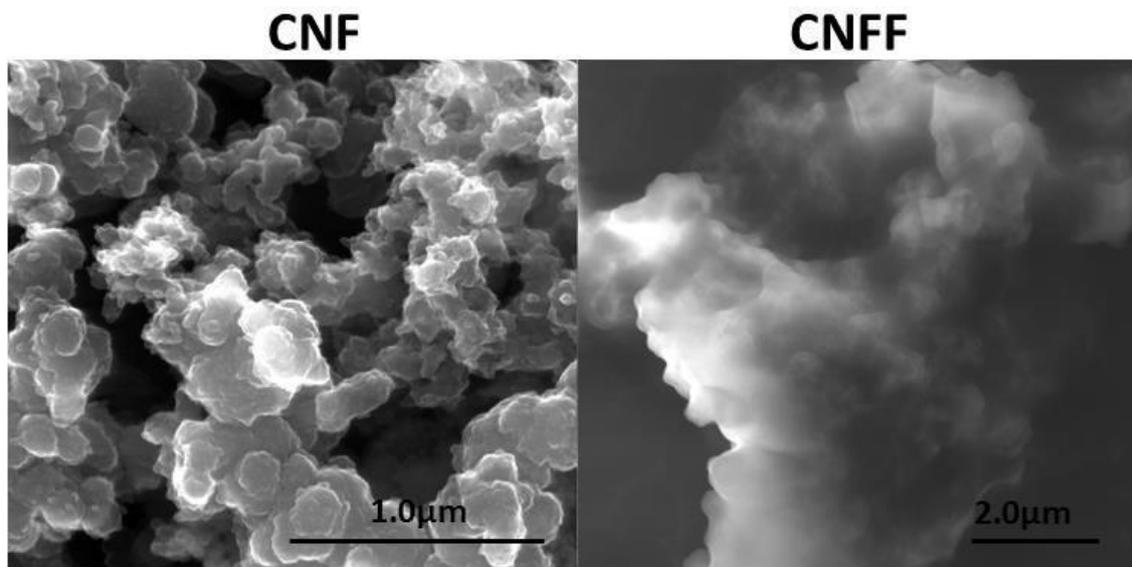


Figura 6: Fotomicrografias de compostos nanoestruturados fosfatados (CNF) e compostos nanoestruturados fosfatados funcionalizados (CNFF) obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV).

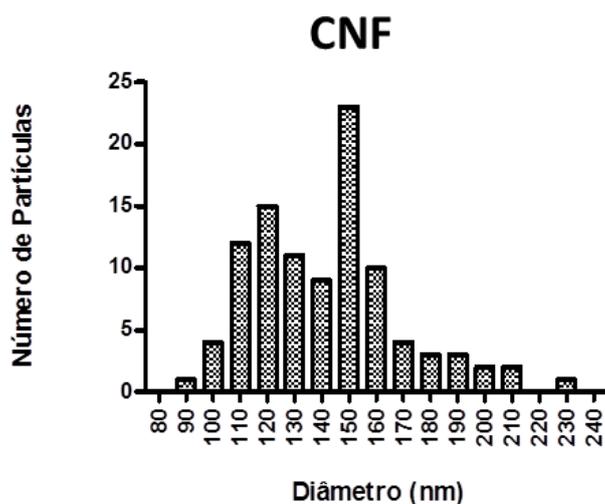


Figura 7: Distribuição de diâmetro de compostos nanoestruturados fosfatados (CNF) em nanômetros (nm) obtida por morfometria.

Composição elementar por microanálise de raio-x

Os espectros obtidos por microscopia eletrônica analítica (**Figura 8**) mostram para CNF e CNFF picos característicos de carbono (C), sódio (Na), alumínio (Al) e silício (Si). A ocorrência desses elementos é derivada: do processo de metalização (C), do suporte metálico do microscópio (Al) e lamínula de vidro usada no processamento das amostras (Si). Os elementos: magnésio (Mg), cálcio (Ca) e fósforo (P) são característicos da matriz inorgânica

do CNF. O processo de funcionalização não mudou o padrão de ocorrência dos elementos mencionados.

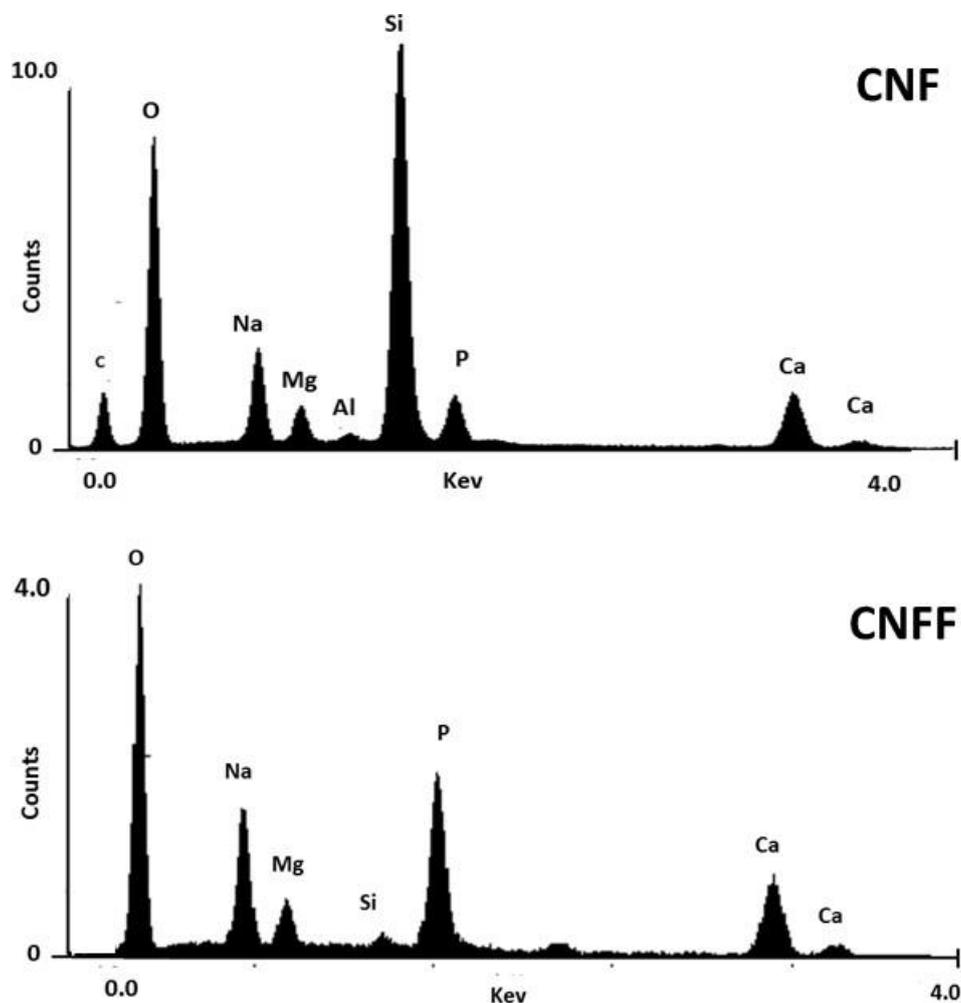


Figura 8: Espectros obtidos por microanálise de raio-x para compostos nanoestruturados fosfatados (CNF) e compostos nanoestruturados fosfatados funcionalizados (CNFF) caracterizando sua composição elementar de modo não quantitativo.

Padrões estruturais por difração de raio-x (XRD)

Os espectros obtidos por XRD para a hidroxiapatita sintética (composta principalmente por fosfato de cálcio cristalino), do porta amostras do equipamento (essencialmente amorfo) e para CNF são mostrados na **Figura 9**. CNF tem comportamento similar ao observado no padrão amorfo com um único pico largo a $2\theta = 28,3^\circ$ o que indica a sua natureza amorfa.

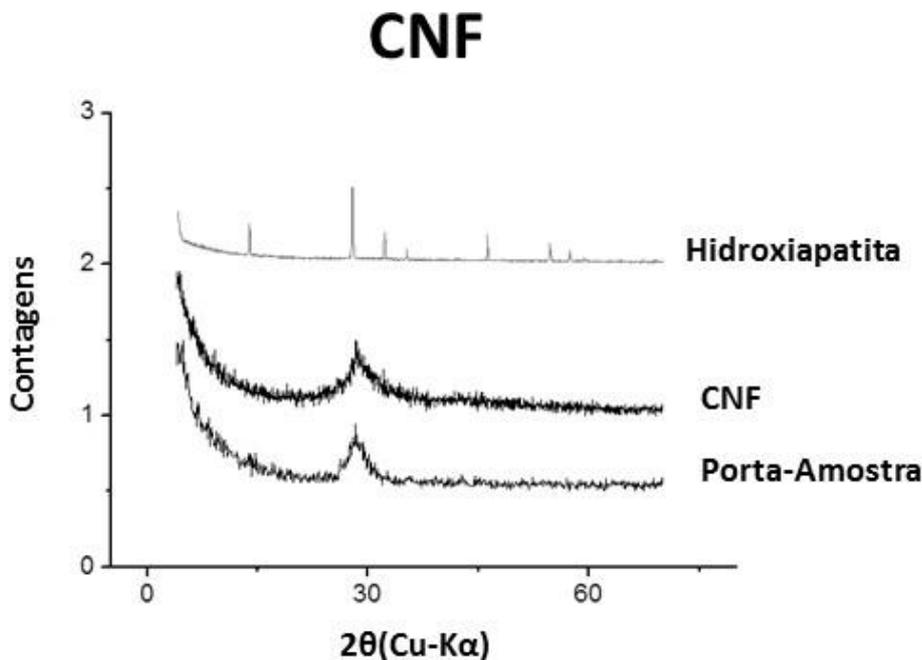


Figura 9: Difração de raio-x para a hidroxiapatita cristalina, o porta-amostra do equipamento e para compostos nanoestruturados fosfatados (CNF). O porta amostras e CNF possuem padrões essencialmente amorfos.

Espectros de absorvância de CNF e CNFF

Ensaio ópticos determinaram os espectros de absorvância de CNF, PEG, AH e CNFF entre 200 e 1000 nm. O espectro obtido para CNF (5 e 250 $\mu\text{g/mL}$) é mostrado na **Figura 10**. Nenhum pico de absorção foi observado para ambas as concentrações no intervalo analisado, especialmente entre 400 e 700nm. A 250 $\mu\text{g/mL}$, CNF mostrou um aumento nos valores de absorvância detectados. CNFF (750 $\mu\text{g/mL}$) e as moléculas orgânicas ligadas a ele também não são capazes de absorver luz no intervalo de comprimento de onda analisado. Desta forma, CNF e CNFF podem ser considerados como uma plataforma adequada para a adsorção de um corante fluorescente uma vez que não possuem autofluorescência, não sendo, portanto, capazes de causar interferência na detecção de um marcador em técnicas de interesse.

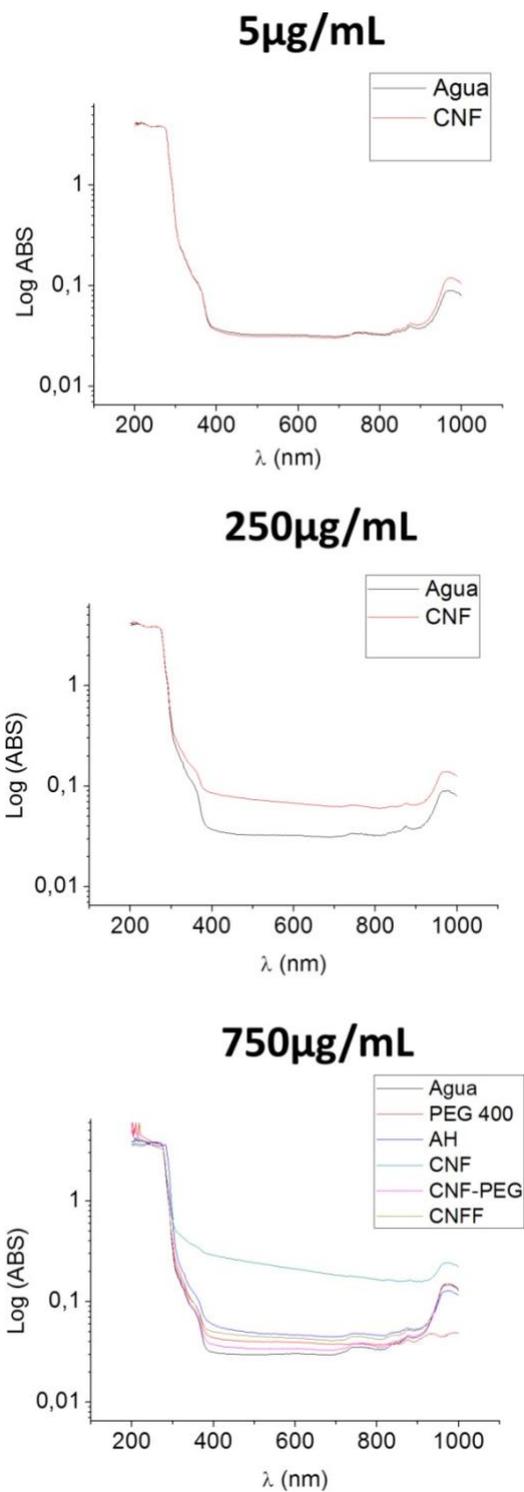


Figura 10: Espectros de absorvância da água pura e compostos nanoestruturados fosfatados (CNF) (5 µg/ml e 250 µg/ml), PEG 400, ácido hialurônico (AH) e compostos nanoestruturados fosfatados funcionalizados (CNFF) (750 µg/ml). Comprimentos de onda variando de 200 a 1000 nm.

Ligação de CNFF ao fluorocromo rodamina 6G (CNFFF)

CNFFF (750 µg/ml) apresentou picos de absorção consistentes com os obtidos para a rodamina 6G livre (530 nm). O pico de absorção dos sobrenadantes obtidos após lavagens sucessivas da amostra (S1, S2, S3 e S4) diminui gradualmente, sugerindo a retirada da rodamina 6G de CNFFF. Apesar de ocorrer perda do fluorocromo após os processos de lavagem, o pico de absorção da amostra lavada final foi satisfatório. Essa ocorrência sugere a adsorção da rodamina 6G à matriz nanoestruturada funcionalizada (**Figura 11**). O valor de pico de absorbância obtido para CNFFF também sugere que a quantidade de rodamina 6G adsorvida é detectável em ensaios de fluorescência e biológicos de internalização.

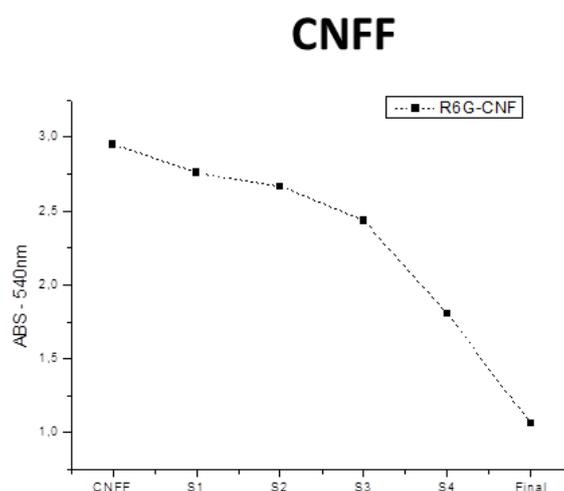


Figura 11: Absorbância de compostos nanoestruturados fosfatados funcionalizados (CNFF) complexado com fluorocromo rodamina 6G (0,1 mM), sobrenadantes obtidos após lavagens sucessivas (S1, S2, S3 e S4) e a amostra final contendo as nanopartículas lavadas. Comprimento de onda: 540nm

2. Ensaio Biológicos

Expressão de CD44 em células de tumor mamário humano MCF-7 e MDA-MB-231

Para confirmar se as linhagens celulares utilizadas neste estudo expressam o gene para CD44 e são, portanto, potencialmente capazes de interagir com nanopartículas funcionalizadas com ácido hialurônico, foi realizada imunohistoquímica para CD44 nas células MCF7 e MDA-MB-231. Imagens obtidas em microscópio de fluorescência invertido mostraram que ambas os tipos celulares são positivos quanto à expressão de CD44 (**Figura 12**).

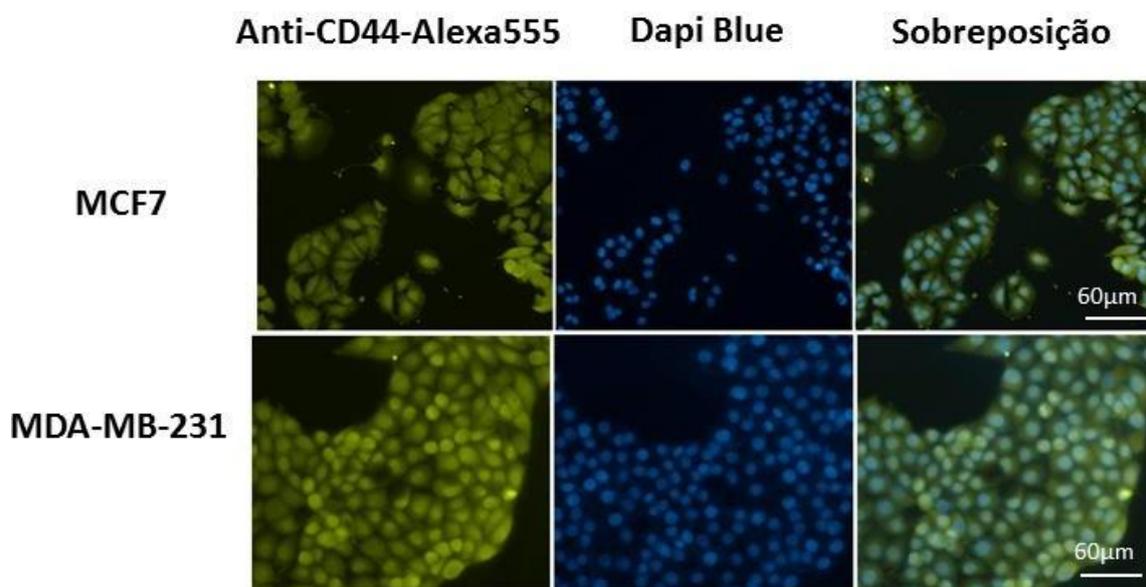


Figura 12: Imunofluorescência para CD44 realizada em células MCF7 e MDA-MB-231. As imagens de microscópio de fluorescência mostraram que ambas as linhagens são positivas para CD44 (verde). Núcleo corado em azul com Dapi.

Citotoxicidade de CNF, CNFF, CNFFF e rodamina 6G em células MCF-7 e MDA- MB-231

Células MCF7 e MDA MB 231 tratadas com CNF e CNFF e CNFFF a concentrações crescentes, durante 24 não apresentaram redução de viabilidade celular, em comparação ao grupo não tratado (**Figura 13**). As células expostas à rodamina 6G livre, em concentrações equivalentes a presente em CNFFF, durante 24 horas mostraram uma redução significativa da viabilidade mesmo na concentração mais baixa. A redução da viabilidade celular causada pela maior concentração de rodamina 6G livre foi de 74,97% em células MCF7 e 55,26% em MDA MB 231.

Estes resultados sugerem que os três tipos de nanopartículas propostas nesse estudo não apresentam atividade citotóxica significativa em células MCF7 e MDA MB 231. A funcionalização com AH e PEG (CNFF) e a conexão posterior com células de rodamina 6G (CNFFF) não induzem efeito citotóxico. Estes resultados são consistentes com o facto de CNF e CNFF não estarem associados a qualquer composto antimitótico e serem, por si só, inofensivos para as células tumorais em questão. A associação de rodamina 6G, provada citotóxica, com CNFF (CNFFF) parece reduzir o efeito citotóxico do fluorocromo.

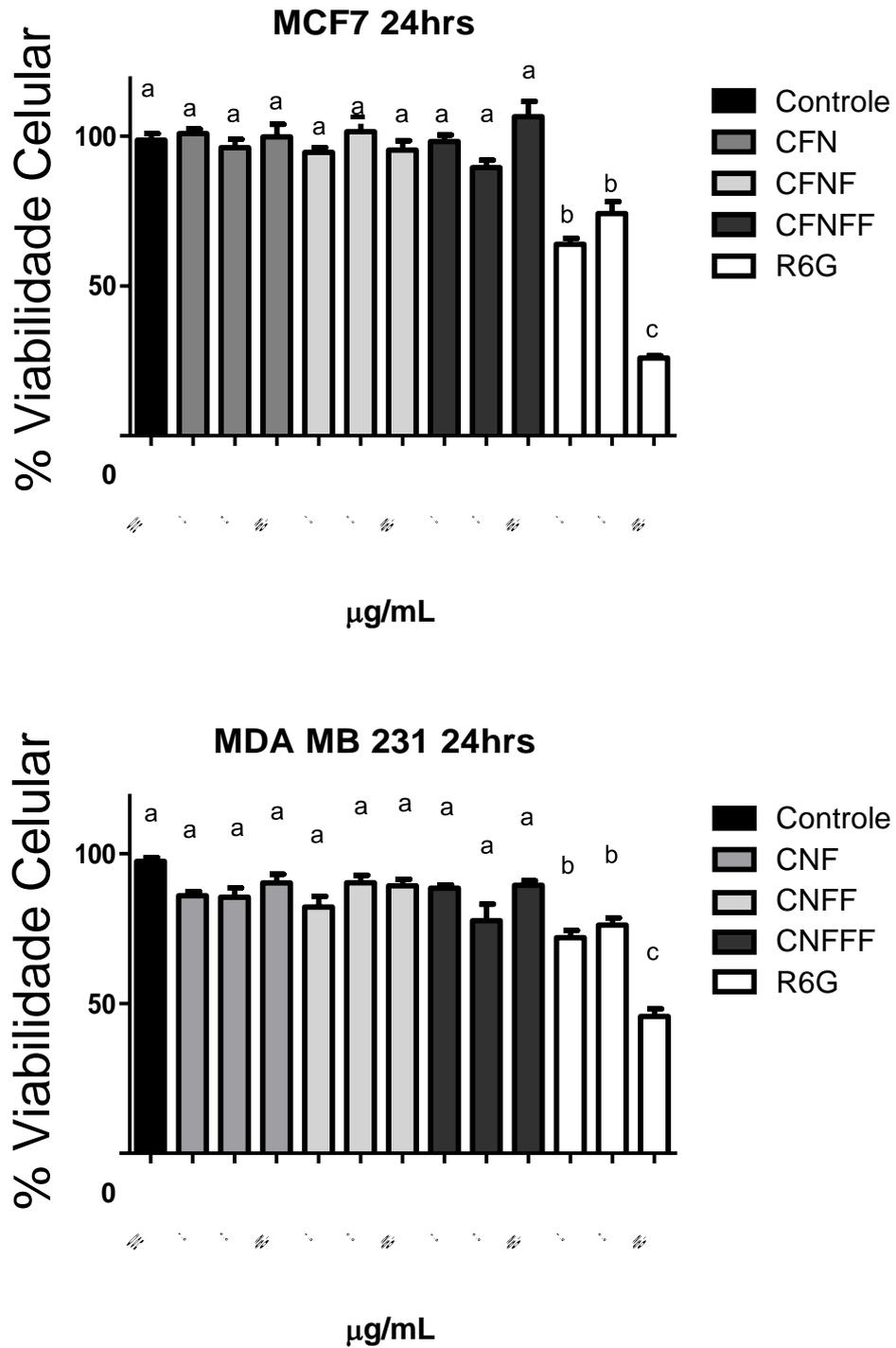


Figura 13: Viabilidade celular de células MDA-MB-231 e MCF-7 tratadas com 1, 5 e 25 µg/mL de CNF, CNFF, CNFFF e 1, 5 e 25 µM de rodamina 6G durante 24 horas. Os valores foram plotados como média/desvio padrão. Letras diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos.

Verificação da internalização de CNFFF em células de tumor mamário humano através de observação “time-lapse”

Células MDA MB 231 expostas a CNFF durante 30 minutos e monitoradas em tempo real, foram também expostas a concentrações equivalentes de rodamina 6G livre. A adição de rodamina livre 6G torna as células e o meio de cultura fluorescentes. Visualmente e quantitativamente, a intensidade de fluorescência nas amostras que receberam rodamina livre 6G foi constante durante todo o período experimental (**Figura 14 e Figura 15**). As células expostas a CNFFF não se tornam instantaneamente fluorescentes e foi possível observar a progressão temporal da intensidade de fluorescência no citoplasma das células. Isso sugere a internalização de CNFFF em células MDA-MB-231 (**Figura 14**).

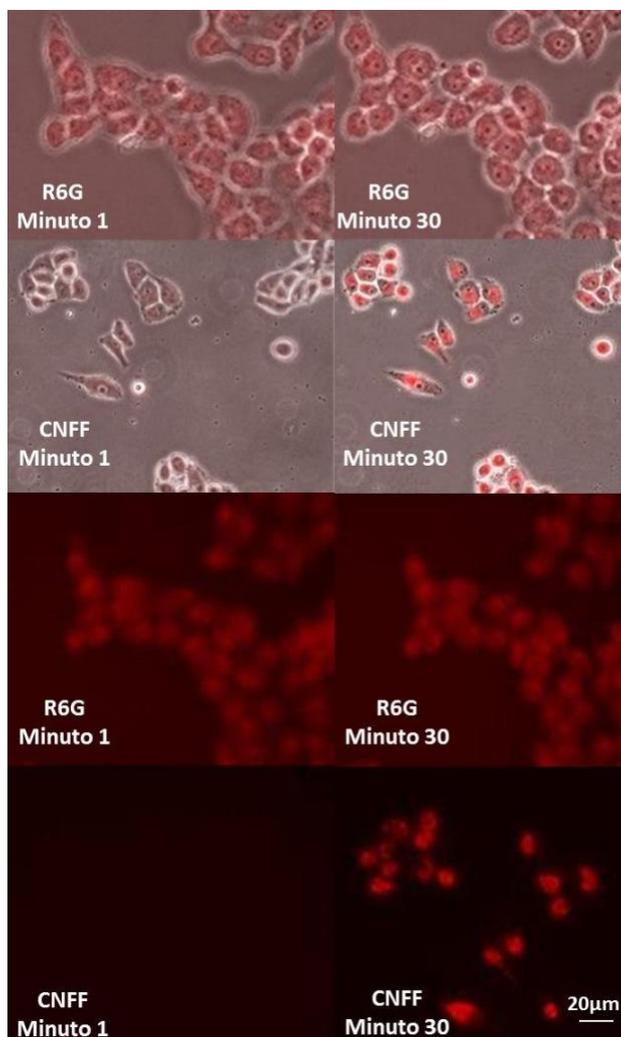


Figura 14: Células MDA MB 231 expostas a rodamina 6G livre e a CNFFF durante 30 minutos e monitoradas em tempo real.

Quantitativamente, a fluorescência aumenta acentuadamente após 10 minutos de exposição a CNFFF, sendo superior à detectada para a rodamina 6G após 15 minutos (**Figura 15**). As células tratadas com CNFFF não apresentam sinais aparentes de morte celular no final do procedimento, ao contrário das que foram tratadas com rodamina 6G que mostraram alterações morfológicas consistentes com sinais de apoptose.

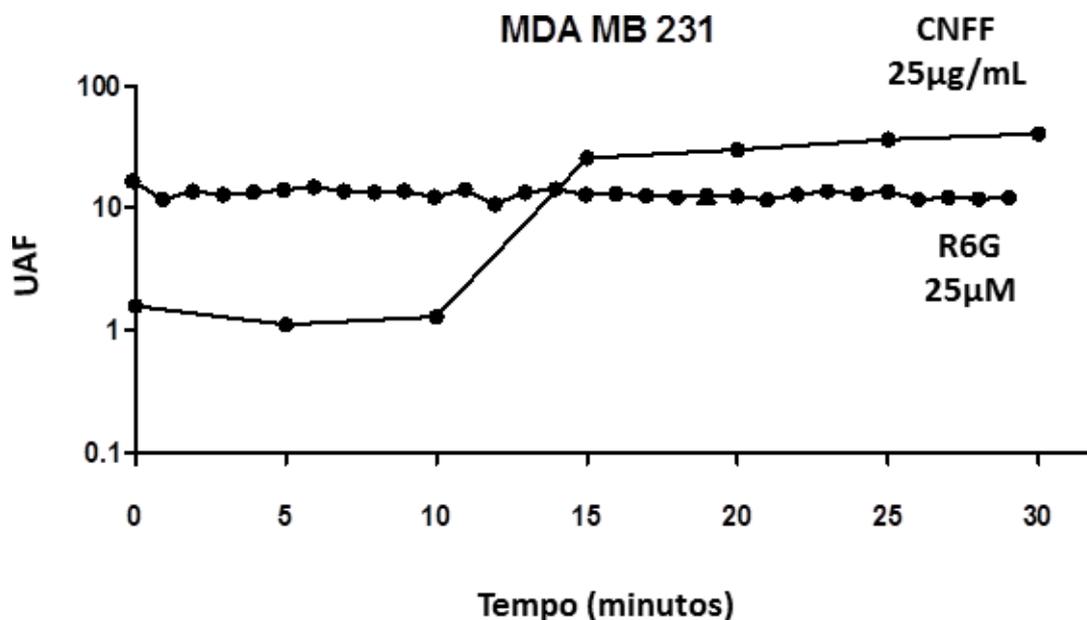


Figura 15: Quantificação de fluorescência de células MDA MB 231 expostas a rodamina livre 6G e CNFFF durante 30 minutos e monitoradas em tempo real.

Verificação da internalização de CNFFF em células de tumor mamário humano através da microscopia confocal

Imagens obtidas por microscopia confocal de células MCF-7 tratadas com CNFFF (60,0 µg/ml) durante 10 e 20 minutos mostram marcação azul na cromatina nuclear (Dapi Blue), verde no citoesqueleto (Faloidina 488) e CNFFF em vermelho (**Figuras 16 e 17**). A distribuição da marcação ao longo do eixo Z também permitiu a visualização de domínios nucleares definidos pelo corante azul, o citoplasma em verde e CNFFF em vermelho. Não se observou sobreposição de canais, demonstrando a ausência de co-localização entre as nanopartículas, o citoesqueleto e a heterocromatina. É possível observar, para os dois tempos de exposição, agregação robusta das nanopartículas (CNFFF) principalmente na região

periférica da célula, e também nos domínios citoplasmático e nuclear. A presença de CNFFF no citoplasma apresentou distribuição homogênea, independentemente da distância da célula ao seu ponto de aderência.

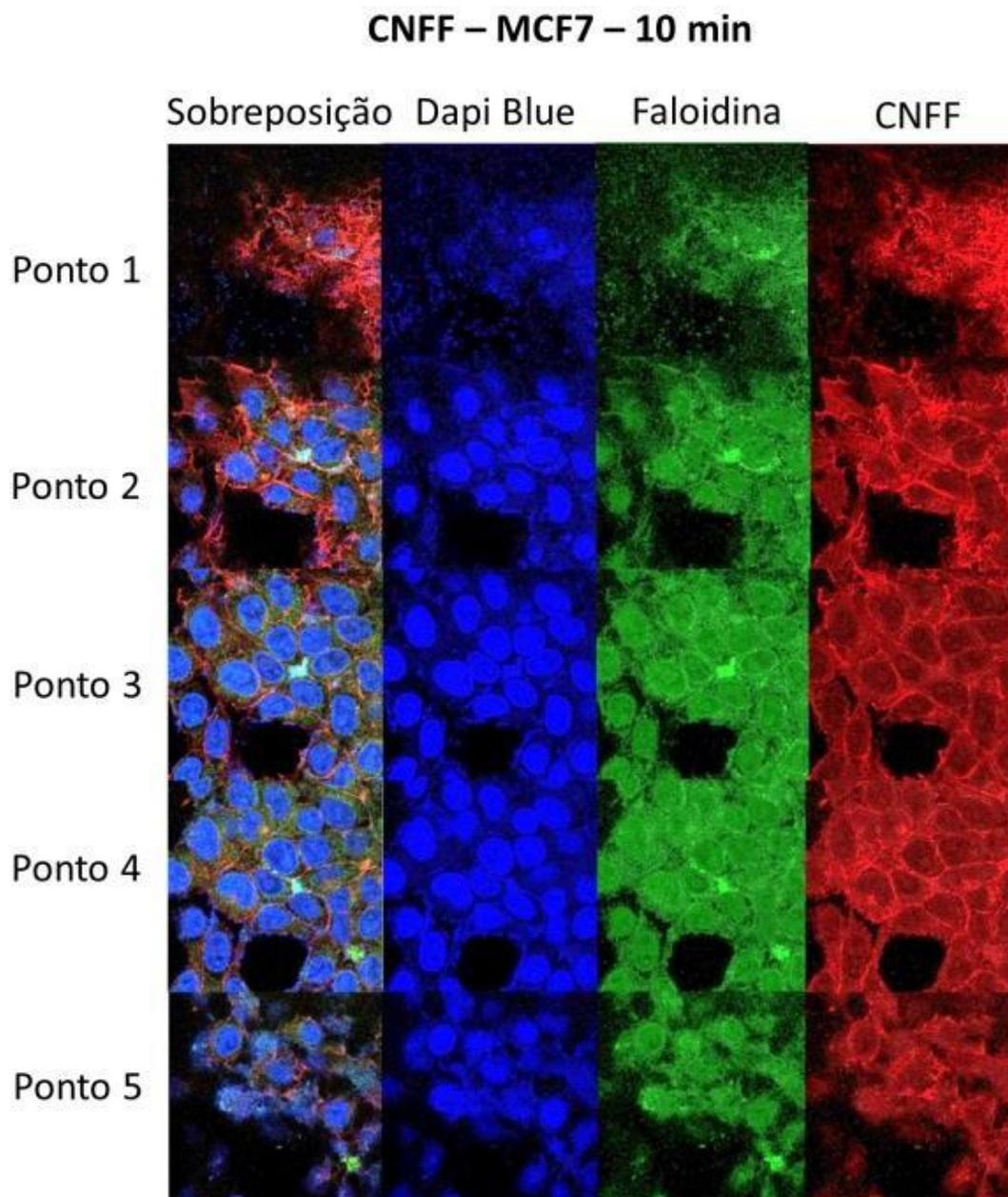


Figura 16: Células de tumor mamário humano (MCF7) coradas com DAPI Blue (núcleo) Faloidina 488 (citoplasma) e tratadas com CNFFF durante 10 minutos. Cada ponto equivale a 0,25µm na série-Z. Aumento: 60x. Microscópio confocal.

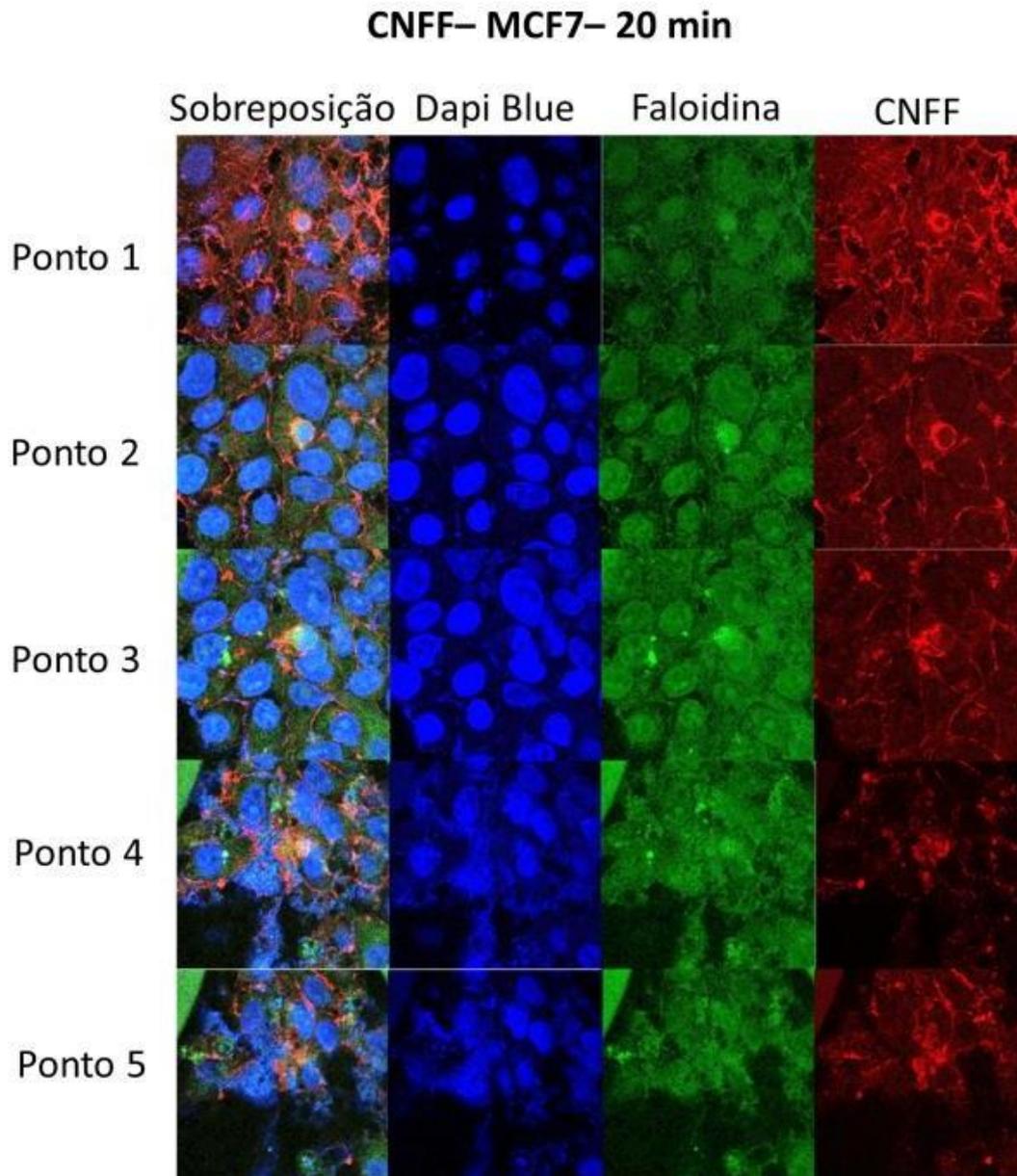


Figura 17: Células de tumor mamário humano (MCF7) coradas com DAPI Blue (núcleo) Faloidina 488 (citoplasma) e tratadas com CNFF durante 20 minutos. Cada ponto equivale a 0,25 μ m na série-Z. Aumento: 60x. Microscópio confocal.

Observou-se, após a verredura confocal no eixo Z, a presença de CNFFF na porção nuclear, principalmente em regiões de eucromatina (**Figura 18**). Nossos dados sugerem que o CNFFF é capaz de se aderir com sucesso às membranas e ser internalizada por células MCF-7 positivas para CD44 e serem transcoladas a porções nuclear.

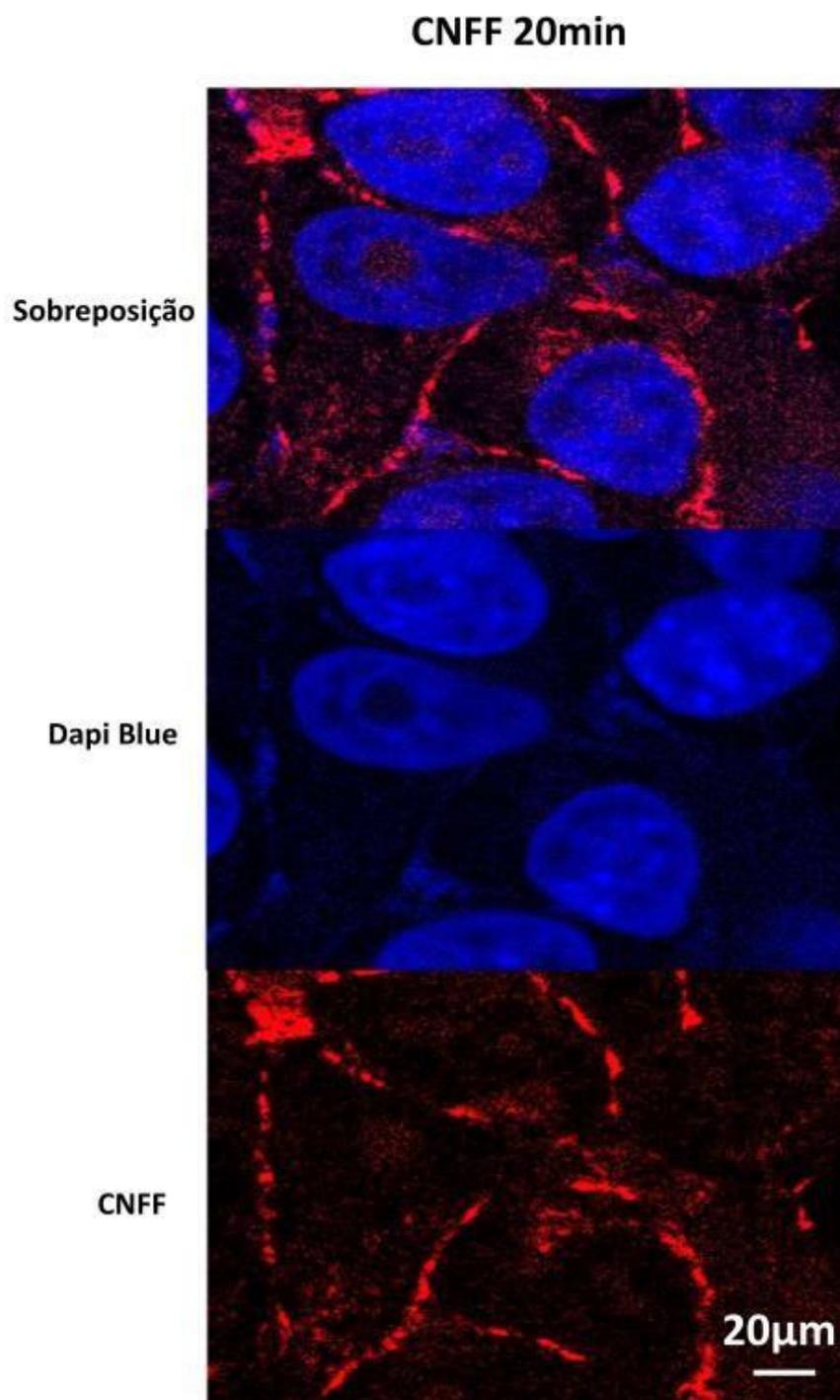


Figura 13: Detalhe de células de tumor mamário humano (MCF7) coradas com DAPI Blue (núcleo) e tratadas com CNFFF durante 20 minutos. Notar distribuição intranuclear, citoplásmica e membranar. Imagens obtidas por microscopia confocal.

2.4. Verificação da internalização de CNFFF em células de tumor mamário humano através de análises de ultra-estrutura por microscopia eletrônica de varredura e de composição elementar por microanálise de raio-x

Imagens de microscopia eletrônica de varredura, obtidas com elétrons secundários, mostram células MDA-MB-231 e MCF-7, após 30 minutos de interação com CNFFF (**Figura 19**). As células apresentaram aspecto rugoso e retraído em função do processamento. Foi possível detectar a ocorrência dos CNFFF com forma esférica em vários pontos do campo, eventualmente aderidos à superfície da membrana celular ou internalizados. As imagens obtidas por feixes de elétrons retroespalhados confirmaram a ocorrência de CNFFF, identificada como agregados eletro-densos em um plano abaixo da membrana celular.

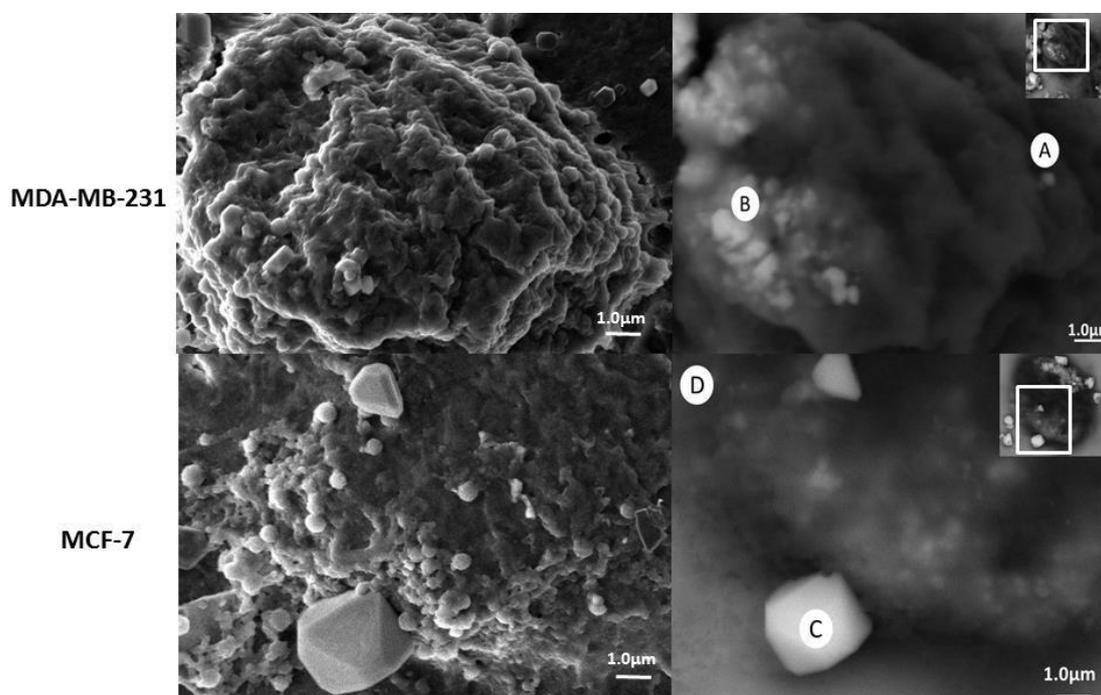


Figura 19: Imagens de microscopia eletrônica de varredura de células MDA-MB-231 e MCF-7 após 30 minutos de exposição à CNFFF (25 µg/mL). Nas imagens obtidas por elétrons secundários (direita) é possível notar os detalhes das superfícies celulares. As imagens obtidas por elétrons retroespalhados (esquerda) trazem domínios eletrondensos (porções mais claras da imagem) correspondendo aos locais analisados pela técnica de microanálise de raio-X (pontos A, B e C e D).

Os pontos eletro-densos evidenciados podem ser reconhecidos como agregados esféricos e porções poliédricas em forma cristalina (**Figura 19**). Os espectros obtidos por microanálise de raio-x confirmaram a natureza elementar dessas estruturas, identificadas como cristais de cloreto de sódio (derivados do PBS utilizado para lavagem), onde

predominam os íons sódio (Na) e cloro (Cl) e CNFFF, onde se observa uma ocorrência distinta de fósforo (P) e cálcio (Ca) (**Figura 20**).

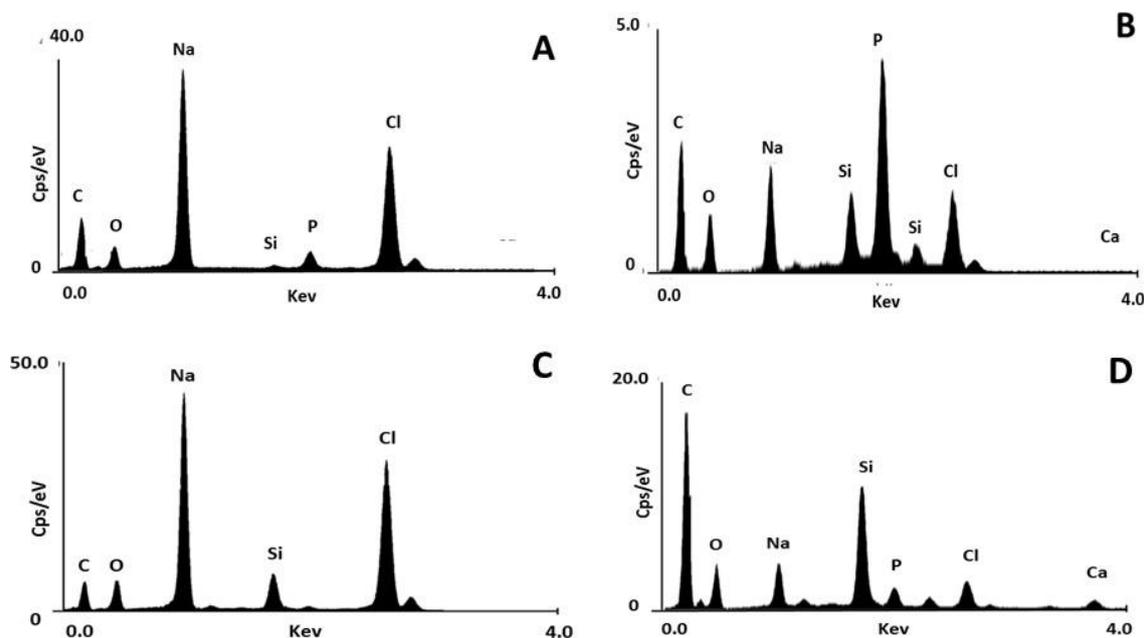


Figura 20: Espectros de microanálise de raio-x obtidos utilizando aceleração de voltagem de 30kV a partir dos locais indicados na figura 19 para células MDA-MB-231 (A e B) e MCF-7 (C e D).

3. Avaliação da potencial utilização de CNFF como carreador de doxorubicina no tratamento de células de tumor mamário humano

Percentual de ligação de doxorubicina a CNFF

Os espectros de absorvância obtidos para os sobrenadantes resultantes da lavagem de CNFF-DOX foram semelhantes ao espectro obtido para a doxorubicina livre (0,1mg/mL), apresentando valores de absorvância altos com pico a 480nm. O espectro obtido para CNFF não associado à droga apresentou perfil espectral similar ao da água, com ausência de pico no intervalo avaliado. Os valores e o pico de absorvância obtidos para as amostras de CNFF- DOX decresceram discretamente com o aumento da concentração de CNFF na amostra, sendo menor na amostra contendo CNFF a 0,4mg/mL (**Figura 21**). Esse comportamento pode ocorrer pela grande densidade de partículas sólidas presentes nos sistemas mais concentrados em CNFF, como forma de absorção inespecífica, mais evidente no espectro de CNFF puro, visto que a concentração de DOX nas demais amostras é constante.

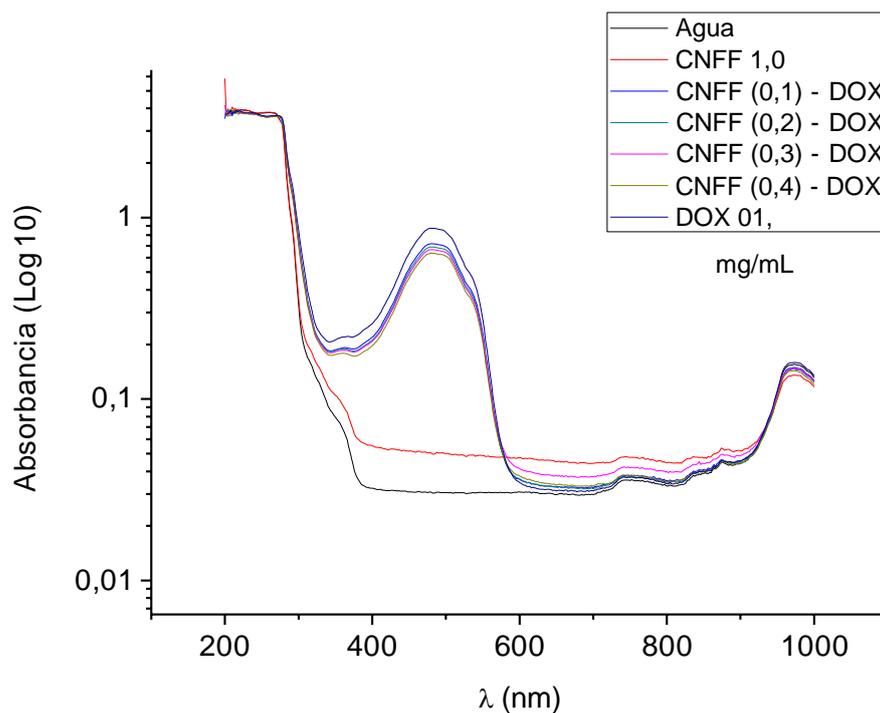


Figura 21: Espectros de absorvância para os sobrenadantes obtidos após lavagem de CNFF-DOX nas quatro concentrações de nanopartícula (0,1, 02, 03 e 0,4 mg/mL), doxorubicina (0,1mg/mL), CNFF (1,0mg/mL) e água milli-Q. Comprimento de onda λ entre 200 e 1000nm.

As amostras contendo os precipitados lavados registraram valores de absorvância notadamente inferiores aos obtidos para os seus sobrenadantes e para a doxorubicina livre, mas mantiveram evidente pico de absorvância a 480nm. Isso indica que após a lavagem e centrifugação uma alíquota de doxorubicina permaneceu associada à CNFF, indicando a ligação entre as nanopartículas e a droga (**Figura 22**).

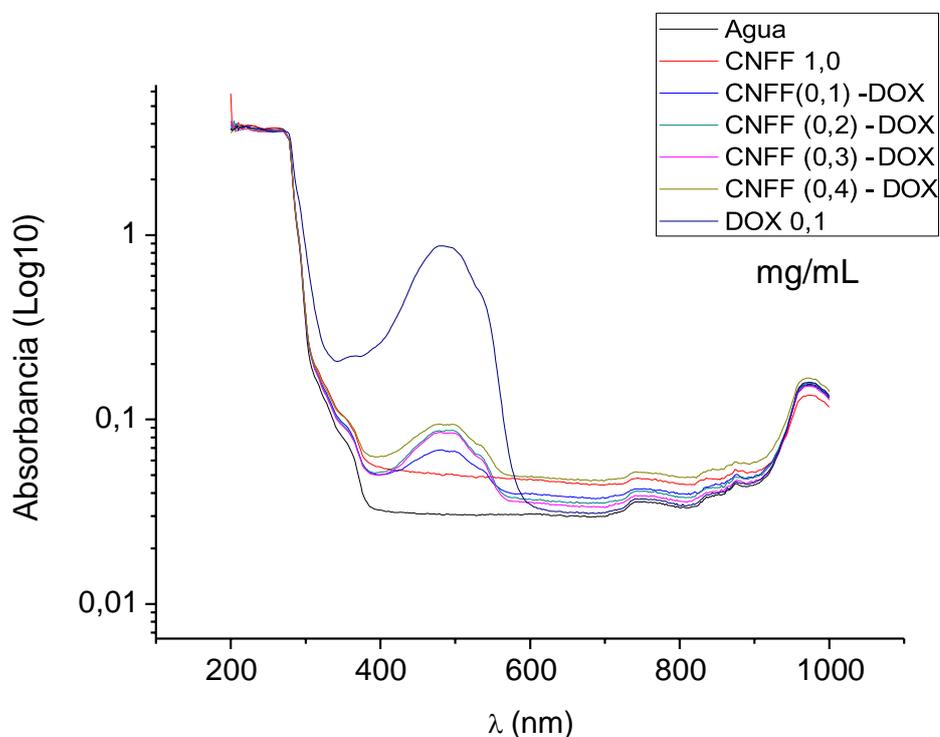


Figura 22: Espectros de absorvância obtidos para CNFF-DOX após lavagem nas quatro concentrações de nanopartículas (0,1, 02, 03 e 0,4 mg/mL), doxorubicina (0,1mg/mL), CNFF (1,0mg/mL) e água milli-Q. Comprimento de onda λ entre 200 e 1000nm.

O carregamento, ou “load” da droga obtidos nas amostras de CNFF-DOX contendo concentrações crescentes de CNFF são apresentados na **Tabela 2**. A complexação mais eficiente foi na amostra CNFF (0,4mg/mL) que registrou 17% da doxorubicina adicionada ao sistema aderida a CNFF após a lavagem.

Tabela 2: Load de doxorubicina em CNFF-DOX de acordo com a concentração de nanopartícula adicionada ao sistema.

[CNFF] em CNFF-DOX (mg/mL)	Associação (%)
0,1	5,95
0,2	10,15
0,3	13,08
0,4	17,72

Toxicidade de CNFF-DOX em células de tumor mamário humano MDA-MB-231 e MCF-7.

A morfologia de ambos os tipos celulares após exposição aos tratamentos com doxorubicina e CNF-DOX é mostrada na **Figura 23**. É possível notar o aspecto pré- confluyente das células não tratadas, ao passo que o tratamento com CNFF-DOX e com doxorubicina livre provocam alterações morfológicas visíveis em células MCF-7. Observa-se a redução da aderência celular, o que torna seu aspecto mais arredondado acompanhado da

aparente diminuição na densidade celular. Nas. Células MDA-MB-231 essas alterações são mais evidentes nos tratamentos com CNFF-DOX e doxorubicina livre quando comparadas as MCF-7.

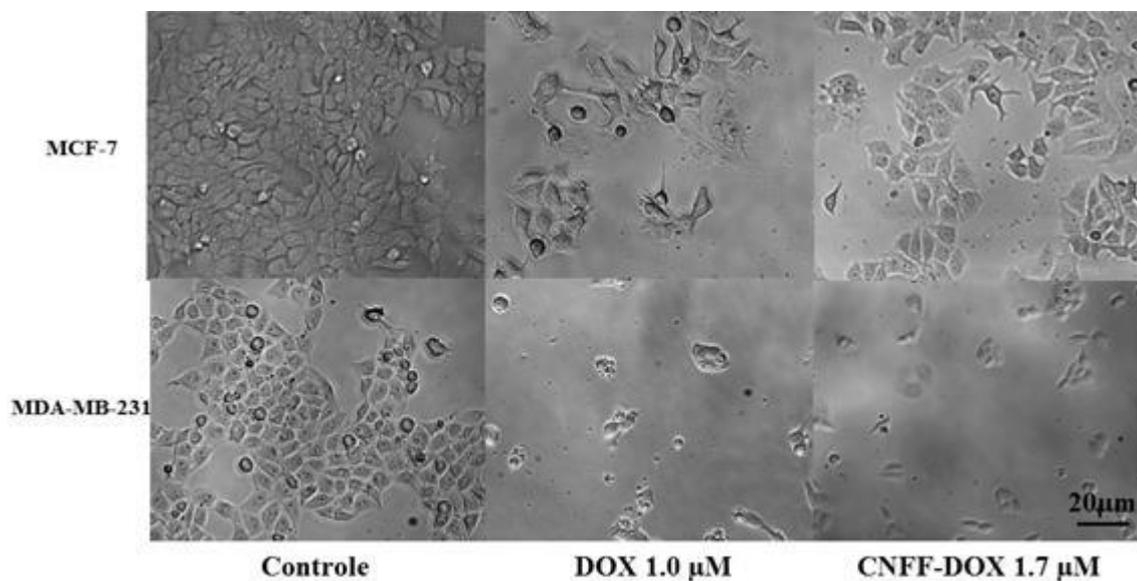


Figura 23: Morfologia de células de tumor mamário humano após 24 horas de exposição ao tratamento com doxorubicina e CNFF-DOX nas concentrações de 1,0 e 1,7μM. Imagens obtidas em microscópio de luz invertido. Aumento: 10X.

As células da linhagem MCF-7 sofreram redução significativa em sua viabilidade a partir da concentração de 1,0μM de droga em CNFF-DOX. A queda foi dose dependente observando-se uma redução na viabilidade celular de 43% e 48 % para os tratamentos com doxorubicina a 10μM e CNFF-DOX a 1,7 μM respectivamente (**Figura 24**). Células da linhagem MDA-MB 231 tratadas CNFF-DOX contendo 0,001μM de doxorubicina não apresentaram redução de viabilidade significativa em relação ao controle. Os demais tratamentos registraram redução significativa na viabilidade celular, chegando a 53% nas células tratadas com CNFF-DOX contendo 1,7μM de doxorubicina (**Figura 24**).

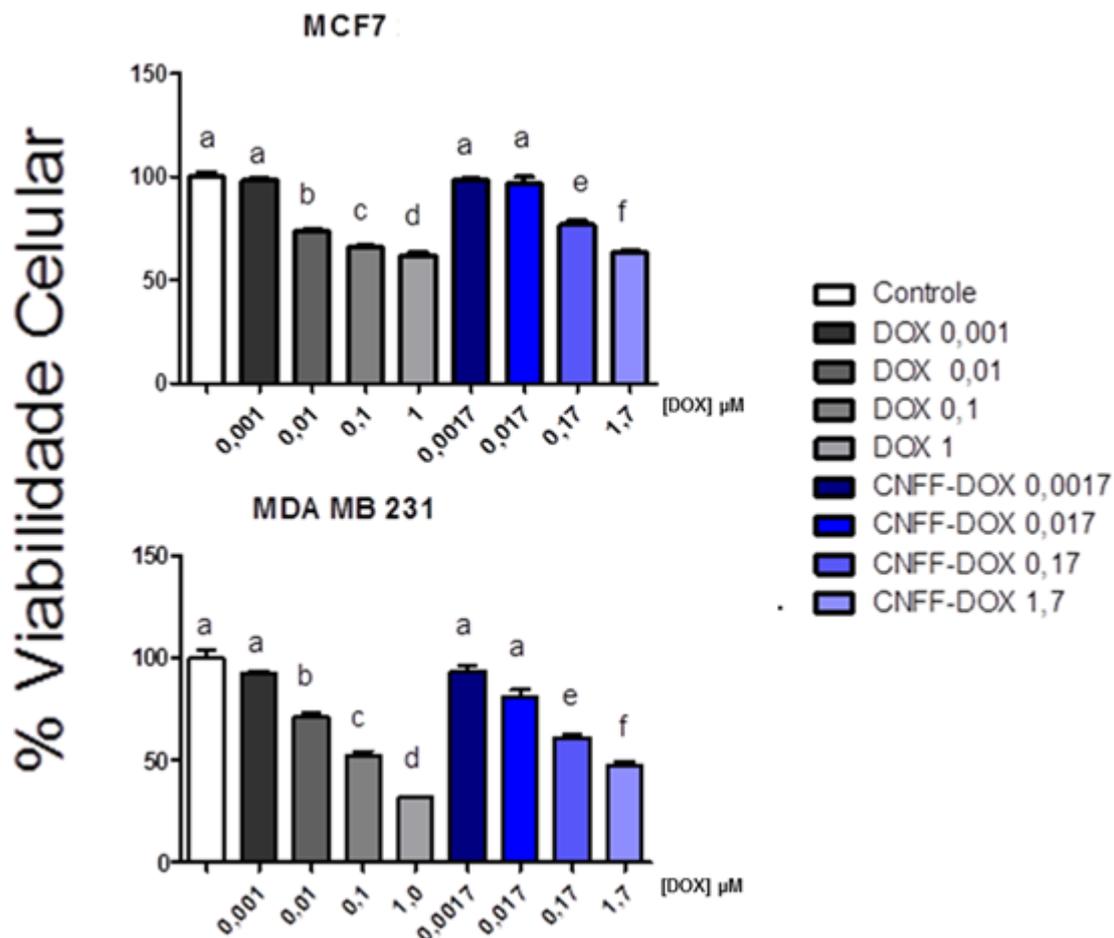


Figura 24: Viabilidade de células de tumor mamário humano tratadas com diferentes concentrações de CNFF-DOX e doxorubicina livre (μM) após 24 horas de interação. Os valores foram plotados como média/desvio padrão. Letras diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos.

VI. DISCUSSÃO

1. Caracterização físico-química, morfologia e diâmetro de CNF

As análises realizadas em CNF e CNFF indicaram redução da carga negativa das nanopartículas após o processo de funcionalização. Resultados similares foram obtidos após adição de PEG a nanopartículas de ouro causando queda expressiva no potencial zeta (Zhang et al., 2011), após a funcionalização de nanopartículas lipídicas sólidas carregadas com o antimitótico Paclitaxel (Shen et al., 2015) e em nanopartículas de poli-etilenoimina (PEI) - poli(D,L-láctico-co-glicólido) (PLGA) funcionalizadas com ácido hialurônico (Wang, et al., 2015). A carga de nanomateriais altera o seu tempo de circulação sanguínea e também as respostas tumorais desencadeadas. A presença de carga de superfície pode alterar o padrão de opsonização do material, seu reconhecimento por células do sistema mononuclear fagocitário

e o seu perfil geral de circulação no plasma (Alexis et al., 2008; Bertrand e Leroux, 2012). Dentro desse contexto portanto, existem várias vantagens relacionadas à funcionalização de nanomateriais de natureza diversa com PEG e AH. Principalmente, a utilização de PEG minimiza a internalização de nanopartículas pelas células do sistema mononuclear fagocitário, aumentando a meia vida dos materiais na corrente sanguínea, através do aumento de seu estado coloidal (Prencipe et al, 2009; Jokerst et al, 2011; Xu et al, 2015). O AH, por sua vez, tem sido explorado como ligante do receptor CD44 que é super expresso em vários tipos de células neoplásicas (Shen et al, 2015; Wang et al, 2015; Zhong et al, 2015), o que permite maior afinidade de nanopartículas funcionalizadas à membrana das células-alvo.

Os diâmetros obtidos para CNF podem ser considerados adequados ao uso em ensaios biológicos e são similares aos diâmetros de nanopartículas fosfatadas (de 19 a 258nm) utilizadas para o tratamento e imageamento do câncer de mama, aproximando-se também dos diâmetros obtidos em nanopartículas multi-modais funcionalizadas com PEG e AH (de 155 a 278nm), considerados satisfatórios para a internalização celular dos nanomateriais (Altinoglu et al, 2008; Meena et al, 2011; Lee et al, 2014; Tang et al, 2015).

Uma nanopartícula multifuncional contendo uma camada externa à base de fosfato de cálcio sensível ao pH, e uma matriz gelatinosa anfifílica, mostrou-se eficaz na liberação controlada e sequencial de doxorubicina e curcumina. O tamanho médio (150nm) dessas nanopartículas aumenta (170 a 200nm) após a funcionalização com concentrações crescentes de amifostina. Apesar dessa ocorrência, o nanomaterial em questão se mostrou eficaz em reduzir o volume tumoral *in vivo* (Li et al., 2015). Nanopartículas de fosfato de cálcio foram sintetizadas em versões contendo uma, duas ou três camadas, apresentando um diâmetro médio de 73,109, e 127nm, respectivamente. As nanopartículas com camada tripla foram associadas à doxorubicina (que se localizou na camada secundária das NPs) a um corante fluorescente (Dy550) (associado à camada terciária e mais interna) e ao PEG (adsorvido na camada primária), apresentando então, diâmetros maiores (de 127 a 156 nm) (Tobim et al., 2013). As CNF propostas nesse estudo apresentaram diâmetro médio (149nm) consistente com o encontrado em outros nanocarreadores eficientes (Li et al., 2015; Tobim et al., 2013).

2. Funcionalização de CNF com PEG e AH

Sabe-se que o processo de funcionalização é responsável pela promoção de mudanças na carga superficial das nanopartículas. A funcionalização com o PEG é uma das alternativas usadas para a estabilização das cargas de nanopartículas de fosfato de cálcio, muitas vezes

aumentando sua eletronegatividade (Altinoglu et al., 2008; Kester et al., 2008; Mogan et al., 2011). Em CNF o processo de funcionalização provoca uma diminuição em suas cargas negativas, provavelmente devido às interações da matriz nanoestruturada com o ácido hialurônico.

O uso do PEG para a modificação de superfície de nanopartículas tem sido amplamente utilizado para melhorar a eficiência de nanocarreadores, especialmente aumentando o seu tempo de circulação na corrente sanguínea e impedindo a fagocitose por células do sistema reticular (Wang et al., 2010). Nos lipossomas, a adição de PEG pode ser feita através de métodos de pré e pós-conjugação (Kostarelos et al., 2005; Hoarau 2003). Em CNF, foi realizado o método de pós-conjugação, onde PEG400 foi adicionado a uma solução aquosa de CNF sem a participação de ligantes, à temperatura ambiente. O volume de PEG inserido na solução de CNF (3 μ L) durante o processo de funcionalização foi considerado satisfatório para a realização dos ensaios subsequentes. Assim, a ligação PEG pode ser extremamente vantajosa para CNF já que é sabido que a incorporação de uma camada de PEG aumenta a estabilidade coloidal dos sistemas nanoestruturados, embora a literatura não traga de forma mais ampla informações relacionadas ao papel do PEG na cinética de nanopartículas inorgânicas (Wang et al., 2010).

Adicionalmente, o uso de um ligante com afinidade por receptores super-expressos nas células-alvo pode aumentar a eficácia de nanopartículas à base de fosfato de cálcio, como sistemas de imageamento, diagnóstico e tratamento do câncer. Um bom número de nanomateriais foi conjugado com moléculas que aumentaram sua afinidade por células tumorais, mantendo a sua estabilidade coloidal. Muitos trabalhos relatam o papel do AH nas células alvo CD44⁺ e mostram bons resultados na redução da viabilidade celular ou do volume de tumores em muitos tipos de câncer (Barth et al., 2010; Li et al., 2010). Dadas às múltiplas funções biológicas do CD44 e do AH, essas moléculas também estão ligadas a propriedades associadas a células-tronco. Assim, CD44 é um marcador de Células-Tronco Tumorais (CTT) para um grande número de tipos de tumores, incluindo os de mama (Greve et al., 2012). Vários estudos elucidaram os mecanismos pelos quais CD44 modula as propriedades funcionais das CTT. Desta forma, CD44 tem um papel relevante a ser explorado no diagnóstico de tumores e em terapias antitumorais, onde seria possível, inclusive, a erradicação de uma população de células tumorais em particular (Karousou et al., 2016).

O amplo uso de AH para melhorar o direcionamento de nanopartículas à células CD44⁺ se deve ao fato de que o AH se liga seletivamente a CD44, concentrando as nanopartículas funcionalizadas na superfície celular e internalizando-as, via endocitose mediada. A toxicidade de materiais associados a nanopartículas funcionalizadas com AH, é muitas vezes menor do que a de compostos livres como drogas ou corantes orgânicos (Toole, 2004). Uma massa molecular de 500 kDa de AH poderia se ligar a até 200 receptores CD44 (Harris et al., 2007). Essas evidências sugerem que o CD44 é considerado como uma das melhores escolhas para a funcionalização de nanopartículas para diagnóstico e tratamento do câncer. A funcionalização de CNF com AH (e PEG), pode aumentar a sua afinidade com, e permitir a sua internalização em células MDA-MB-231 e MCF-7, comprovadamente CD44⁺.

É muito importante enfatizar que o sistema molecular AH-CD44 fornece nanopartículas com grande afinidade por tumores específicos, (Skandalis et al., 2014) e, portanto, constitui uma ferramenta potencial para o diagnóstico e tratamento do câncer.

3. Associação de CNFF com fluorocromo rodamina 6G e imageamento

O uso de nanopartículas híbridas, fabricadas pela incorporação de moléculas de corante orgânico em uma nanopartícula sólida, constitui uma alternativa promissora, gerando o que chamamos de “marcadores adaptados”. Sabe-se que a encapsulação de corantes orgânicos fluorescentes pode aumentar o seu sinal de fluorescência, protegendo-os contra a fotodegradação e aumentar a precisão das análises (Tabacovick et al., 2012). Nanopartículas que encapsulam a rodamina WT, fluoresceínas e o corante Cy3 foram utilizadas para detectar melanoma e células musculares lisas, com administração simultânea de fármaco (Kester et al., 2008; Morgan et al., 2008). As nanopartículas baseadas em fosfato de cálcio e Cy3 também foram usadas para determinar a eficiência quântica das moléculas de corante encapsuladas em comparação com as do corante livre. O estudo mostrou um aumento nesta propriedade uma vez que as moléculas de corante foram protegidas dos efeitos do solvente (Muddana et al., 2009). Deste modo, estudos como esse demonstraram a versatilidade de nanopartículas de fosfato de cálcio como potenciais marcadores de pouca ou nenhuma citotoxicidade *in vitro*, e abriram caminho para pesquisas relacionadas com a associação de CNF e rodamina 6G, com os mesmos propósitos.

A rodamina 6G (C₂₈H₃₀N₂O₃HCl) é um corante altamente foto estável com rendimento quântico muito elevado (cerca de 0,95). Alguns trabalhos têm mostrado a sua associação com matrizes nanoestruturadas (Lasio et al., 2013; Sarkar et al., 2015) com o

objetivo de reduzir a sua taxa de degradação e melhorar a sua eficiência quântica. Muitas questões devem ser consideradas ao associar a rodamina 6G a nanomateriais, especialmente a matrizes sólidas, onde a agregação entre o corante e o material pode produzir dímeros que modificam os espectros de absorção e diminuem o rendimento quântico de fluorescência e o tempo de decaimento (Van der Auweraer et al., 1998). Em soluções aquosas, tal como as utilizadas na preparação de CNFFF, numa gama de concentrações (até 10^{-5}M), os dímeros de rodamina formados são responsáveis pela extinção da fluorescência e quando esses atingem uma concentração específica (10^{-4}M) a solução deixa de responder normalmente a lasers (Penzkofer e Lenpacher, 1987; Penzkofer e Lu, 1986). Em relação a esses achados, não observamos alterações na característica de rodamina 6G após associação com CNFF. CNFFF mostrou espectros de absorção semelhantes aos encontrados para a rodamina 6G livre, e mesmo após quatro processos de lavagem sucessivos, o sinal encontrado em CNFFF foi satisfatoriamente detectado nos ensaios biológicos subsequentes. O uso de metanol ou etanol como solvente diminui a formação de dímeros de rodamina 6G, porém, a preparação de CNFFF deve ser feita em meio aquoso. Isso acontece porque as soluções alcoólicas alteram o estado de estabilidade coloidal de CNF, especialmente na presença de AH. O aumento de fluorescência e modificações de propriedades não lineares de corantes com nanopartículas de prata (AgNPs) também foram demonstrados recentemente (Sarkar et al., 2015).

4. Toxicidade de CNF, CNFF e CNFFF

O cálcio e o fosfato são íons presentes na circulação sanguínea e nas células em concentrações milimolares, entretanto, o aumento rápido das concentrações de cálcio atingindo valores acima do fisiológico, pode levar à apoptose (Oyane et al., 2003). Por isso, a citotoxicidade das nanopartículas à base de fosfato de cálcio tem sido investigada em ensaios *in vitro* em várias linhagens celulares.

Nanopartículas contendo fosfatos de cálcio cristalino sob forma de hidroxiapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) (19nm de diâmetro médio) induziram stress oxidativo em células de tumor mamário humano (MCF-7) levando-as a um estado “apoptose-like” (Meena et al, 2012), e em macrófagos derivados de monócitos humanos (HMMs), nanopartículas de hidroxiapatita mostraram toxicidade em concentrações superiores a $250\mu\text{g/mL}$, sugerindo que a interferência com a homeostase do cálcio seria a principal causa de morte celular (Motskin et al., 2009). Em contraste, outro estudo demonstrou que as nanopartículas de fosfato de cálcio dopadas com fluoresceína não produziram qualquer citotoxicidade ou alteração no

metabolismo em neurónios de gânglios estrelados de ratos (Kester et al., 2008). Similarmente, nanopartículas de fosfato de cálcio, de natureza amorfa, muito similares a CNF foram utilizadas com sucesso para transfecção de cardiomiócitos de ratos neonatos, células do gânglio da raiz dorsal de ratos (DRG), células de neuroblastoma humano (U37311), células de tumor glial de ratos (C612) e espermatogônias de peixe sem produzir qualquer efeito citotóxico (Tonelli et al., 2015 a e b). Essas nanopartículas se mostraram atóxicas também em macrófagos murinos, o que possibilitou sua associação com o antimônio 5 (SbV) para tratamento eficiente de macrófagos infectados com Leishmaniose (Alvarenga et al., 2015).

CNF e CNFF não causaram efeitos citotóxicos em células de câncer de mama humano CD44⁺ (MDA-MB-231 e MCF-7), provavelmente pela ausência das fases cristalinas em sua matriz, e por sua natureza essencialmente amorfa comprovada por difração de raio-x. Considerando a internalização de CNFF e a ausência de qualquer agente citotóxico ou fármaco antimitótico na sua composição, esse compósito não provocou redução da viabilidade celular, como esperado. CNFFF que contém rodamina 6G, um agente citotóxico, potencialmente causaria reduzir a viabilidade das células tratadas. No entanto, tal como as outras formulações de CNF, CNFFF não se mostrou citotóxico. Resultados similares foram obtidos com a incorporação de NPs de fosfato de cálcio a antimônio V (Sb5) (Alvarenga et al., 2015). A rodamina 6G livre causou a redução da viabilidade celular mesmo na menor concentração aplicada, causando um efeito dose dependente.

Com estas descobertas, podemos sugerir que para além de não alterar as principais propriedades ópticas de rodamina 6G, a sua associação com CNF reduz os efeitos citotóxicos do corante, o que torna CNFFF uma potencial alternativa menos invasiva e danosa de diagnóstico.

5. Internalização de CNFFF

Sabe-se que as nanopartículas são internalizadas pelas células por endocitose. Porém, os mecanismos de translocação através da membrana ainda não estão completamente elucidados e os métodos existentes para a caracterização físico-química de nanopartículas não são adequados para pesquisas com células vivas (Hemmerick 2013). Após a translocação através da membrana celular, as nanopartículas atingem o citoplasma, que por sua vez, contém complexos de proteínas, vesículas e organelas, com as quais as nanopartículas interagem de forma transitória ou estável. Graças ao uso de técnicas como microscopia

confocal e de fluorescência, variáveis interações biológicas entre nanopartículas e células foram identificadas. É importante enfatizar que essas interações estão amplamente correlacionadas com as características específicas de cada nanopartícula (Hemmerick 2013).

As nanopartículas de polietilenoimina são internalizadas no citoplasma e escapam das vesículas endossomais, sendo transportadas de uma forma dependente de microtúbulos para a região perinuclear dentro de 10 minutos. Por outro lado, os *quantum-dots* permanecem associados aos lisossomos e aos compartimentos endossômicos durante dias (Cambi et al., 2007), enquanto as nanopartículas de poliestireno catiônico causam ruptura lisossômica, dano mitocondrial e estresse oxidativo, menos de 1 hora após a adição do nanomaterial (Xia et al., 2009; Xia et al., 2008). Nanopartículas de sílica foram capazes de penetrar no núcleo celular e induzir a formação de inclusões de proteínas. Eles também causaram a inibição da expressão gênica levando à proliferação celular reduzida e à senescência celular (Chen et al., 2008; Chen et al., 2005). Considerando estas descobertas, poderíamos prever que as nanopartículas podem exercer efeitos intracelulares dependendo da sua localização subcelular e da sua interação com os compartimentos celulares (Hemmerick et al., 2013). A confirmação dessa ideia é mostrada em células HepG2 incubadas com três tipos de nanopartículas, uma delas de sílica, marcada com FITC por 1 hora e que apresentaram forte acúmulo desses materiais no citoplasma e no núcleo, seguindo um padrão difuso. A medição de fluorescência através de seções confocais do núcleo confirmou que uma quantidade substancial de nanopartículas acumulou-se neste compartimento. Esses eventos ocorreram após uma hora de interação célula-nanopartícula, e é possível notar que a acumulação no citoplasma é mais intensa que no compartimento nuclear. Adicionalmente, uma nanopartícula de óxido de ferro ligada por ligação cruzada a uma proteína ativadora de transcrição (tat-CLIO) associada aos fluorocromos FITC e Cy3 (tat-(FITC)-Cy3-CLIO), também foi internalizada por células HeLa, atingindo 100% de marcação dentro de 45 minutos. A concentração de marcador por célula aumentou linear e temporalmente até 3 horas após a administração das nanopartículas. Células tratadas durante 1 hora retiveram de 40 a 60% dos marcadores FITC e Cy3. O uso de microscopia confocal mostrou que ambos os corantes atingiram domínios nucleares e perinucleares após a adição de tat-(FITC)-Cy3-CLIO ao meio de cultura (Koch et al., 2003). Após 3 horas de internalização em células HeLa, nanopartículas fluorescentes catiônicas e aniônicas de fosfato de cálcio começam a dissolver-se sob condições ácidas nos lisossomos. De forma semelhante, os lipossomas TATp, apresentaram uma translocação rápida e eficiente, migrando para a zona perinuclear. Os lipossomas TATp marcados com rodamina e

FITC-dextram, translocaram-se rapidamente para o interior de células de adenocarcinoma mamário humano (BT20) (Torchilin et al., 2003).

O comportamento do CNFFF vai de acordo com essas observações, uma vez que observamos sua internalização em células tumorais (MCF-7 e MDA-MB-231). O aspecto diferencial de CNFFF a ser destacado é o fato de que podemos encontrar uma marcação considerável dentro de poucos (10 a 20) minutos, confirmado pelas imagens adquiridas pela observação em tempo real. É possível supor que CNFFF integra o grupo de nanopartículas que atinge o núcleo em um curto espaço de tempo. A ligação de rodamina 6G à matriz CNFFF resistiu à lavagem, fixação e ao processo de coloração anterior à aquisição de imagens por microscopia confocal, que removeu o fluorocromo não aderido (excesso) à superfície das nanopartículas.

6. Potencial uso de CNFF-DOX como carreador de doxorubicina

Nas últimas décadas, novos e potentes agentes terapêuticos foram desenvolvidos a partir de moléculas como proteínas, DNA e peptídeos. Embora promissores no tratamento de doenças como o câncer, os métodos de administração usual, incluindo as vias oral e intravenosa, mostraram-se ineficazes ou geraram toxicidade (Davis e Illum, 1998). Estudos pioneiros relatam que a associação desses agentes terapêuticos a nanopartículas representa uma alternativa eficaz para superar os inconvenientes dos métodos de administração convencionais. Isso porque nanopartículas possuem um tamanho reduzido que permite sua penetração através dos capilares teciduais, com eficiente acumulação da droga em locais-alvo no corpo (Unezaki et al., 1996; Hobbs et al., 1998). Dessa forma, a toxicidade sistêmica dos fármacos é reduzida e a eficiência do tratamento é aumentada (Yih e Al-Fandi, 2006).

Em nanopartículas paramagnéticas de óxido de ferro associadas à Doxorubicina, ao PLGA e a um aptâmero com afinidade por células de câncer de cólon murino (C26), o carregamento médio de Doxorubicina à matriz nanoestruturada foi de 3% da droga adicionada ao sistema (a concentração de 10mg/mL) (Mosafer et al., 2017). Já em nanopartículas de sílica mesoporosa funcionalizadas com PEG e ácido imino-diacético, o carregamento da mesma droga foi de 9,3% da concentração usada na síntese (0,1mg/mL) (Zhang et al., 2017). Em um nanomaterial polimérico estável, obtido por “flash” nanoprecipitação, o carregamento de Doxorubicina à nanopartícula foi de 14%, partindo de uma concentração de síntese de 2mg/mL (Yu Thong et al., 2016).

Em CNFF-DOX, o carregamento de doxorubicina foi de aproximadamente 18% de uma concentração inicial de 0,1mg/mL. Comparado a alguns nanomateriais descritos recentemente, CNFF-DOX uma maior taxa de associação a partir de uma concentração menor de fármaco. Desse modo, o uso de CNFF como plataforma para associação de Doxorubicina constitui um método potencialmente eficiente e econômico.

A associação de doxorubicina com nanopartículas de naturezas diversas tem se mostrado uma alternativa eficaz no tratamento de tumores *in vivo* e *in vitro* (Liang et al., 2012; Wang et al., 2013; Victor et al., 2014). Nanopartículas de sílica mesoporosa funcionalizadas com o anticorpo monoclonal para CD44 (CD44 McAb) foram associadas à doxorubicina e testadas em células MCF-7/MRD1 (consideradas multi-resistentes). Concentrações superiores a 1,83µg/mL causaram queda na viabilidade celular de aproximadamente 20%, e a concentração de 18,3 µg/mL levou a aproximadamente 50% de morte celular. Esses valores, no entanto não diferem significativamente dos obtidos para a doxorubicina livre (Wang et al., 2015). Outro tipo de nanopartícula de sílica mesoporosa, modificada com carboxil e projetada para o “delivery” de Doxorubicina causou queda da viabilidade de células MCF-7 após 24 horas de tratamento, de modo dose-dependente. A concentração de 2µg/mL de doxorubicina na partícula causou 40% de morte, tendo sido ligeiramente mais eficiente que a droga livre (Jing et al., 2016).

Nanopartículas lipídicas sólidas associadas com α -tocoferil succinato e com doxorubicina, foram comparadas com a doxorubicina livre em relação ao potencial citotóxico em células MDA-MB-231. A droga associada ao nanomaterial se mostrou mais eficiente que a versão livre, porém o aumento da concentração do fármaco na nanopartícula (de 2 a 16µM) não provocou mudanças significativas no efeito citotóxico (Oliveira et al., 2016).

CNFF-DOX teve um maior efeito citotóxico em células MDA-MB-231 quando em comparação ao efeito causado em células MCF-7. Isso vai de acordo com a resistência relatada para células MCF-7. Assim como a maioria das nanopartículas empregadas para o mesmo fim, CNFF-DOX apresentou um efeito dose dependente em ambos os tipos celulares testados, causando cerca de 40% de morte em células MDA-MB-231 na concentração de 0,17µM e 53% a 1,7µM. Em MCF-7, as mesmas concentrações causaram aproximadamente 23 e 47% de morte. CNFF-DOX, nesse caso, é tão eficiente quanto outras nanopartículas recentemente associadas à doxorubicina para o tratamento de células tumorais.

VII. CONCLUSÃO

Os compósitos nanoestruturados fosfatados (CNF) possuem boa reprodutibilidade de diâmetro e seu tamanho, carga superficial e natureza amorfa são desejáveis para possibilitar sua interação com a superfície de células CD44⁺. CNF é uma boa plataforma para funcionalização com AH e PEG, e o produto deste processo (CNFF) pode ser ligado a um corante orgânico fluorescente vermelho, mantendo as suas características ópticas e reduzindo o seu efeito citotóxico (CNFFF). Como CNFFF é rapidamente (de 10 a 20 minutos) internalizado em células de câncer de mama humano CD44⁺, podemos considerá-lo como um marcador nanoestruturado eficiente, não tóxico, de baixo custo e menos invasivo. Além disso, pode-se sugerir que CNFFF apresenta capacidade de auto-arranjo com doxorubicina formando composto CNFFF-DOX que apresenta padrão de citotoxicidade compatível para a sua utilização no direcionamento a células tumorais CD44⁺, evidenciadas neste trabalho com as linhagens MCF-7 e MDA-MB-231.

VIII. REFERÊNCIAS

ALEXIS, F.; PRIDGEN, E.; MOLNAR, L.K.; FAROKHZAD, O.C.; Factors affecting the clearance and bio distribution of polymeric nanoparticles. **Molecular Pharmaceutics**, v.5, p.505–515, 2008.

ALLEN, C.; DOS SANTOS, N.; GALLAGHER, R. et al. Controlling the physical behavior and biological performance of liposome formulations through use of surface grafted poly(ethylene glycol). **Bioscience Reports**, v.22, p.225-250, 2002.

ALTEKRUSE, S. F.; KOSARY, C. L.; KRAPCHO, M. et al. SEER Cancer Statistics Review, 1975-2007. **National Cancer Institute**, 2010. Disponível em: https://seer.cancer.gov/archive/csr/1975_2007/. (Acesso em 01/12/2016)

ALTINOGLU, E. I.; RUSSIN, T. J.; KAISER, J. M.; BARTH, B. M.; EKLUND, P. C.; KESTER, M.; ADAIR, J. H. Near-infrared emitting fluorophore-doped calcium phosphate nanoparticles for in vivo imaging of human breast cancer. **ACS Nano**, V.2, P.2075-2084, 2008.

ANDRIEU, N.; EASTON, D. F.; CHANG-CLAUDE, J. et al. Effect of chest X-rays on the risk of breast cancer among BRCA1/2 mutation carriers in the international BRCA1/2 carrier cohort study: a report from the EMBRACE, GENEPSO, GEO-HEBON, and IBCCS Collaborators' Group. **Journal of Clinical Oncology**, v.24, n.21, p.3361-3366, 2006.

Annual Review of Biophysics, v.37, p.247–263, 2008.

BAE, Y. H.; PARK, K. Targeted drug delivery to tumors: myths, reality and possibility. **Journal of Controlled Release**, v.153, n.3, p.198-205, 2013.

BARTH, B. M.; SHARMA, R.; ALYINOGLU, E. I.; MORGAN, T. T.; SHANMUGAVELANDY, S. S.; KAISER, J. M.; MCGOVERN, C.; MATTERS, G. L.; SMITH, J. P.; KESTER, M. et al. Bioconjugation of calcium phosphosilicate composite nanoparticles for selective targeting of human breast and pancreatic cancers in vivo. **ACS Nano**, v.4, p.1279-1287, 2010.

BERAL, V. et al. Breast cancer and hormone replacement therapy: collaborative reanalysis of data from 51 epidemiological studies of 52,705 women with breast cancer and 108,411 women without breast cancer. Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. **Lancet**, v.350, n.9084, p.1047-1059, 1997.

- BERGMANN, A.; MATTOS, I. E.; KOIFMAN, R. J.; KOIFMAN, S. Morbidade após o tratamento para câncer de mama. **Fisioterapia Brasil**, v.1, p.101-108, 2000.
- BERGSTROM, K.; OSTERBERG, E.; HOLMBERG, K. et al. Effects of branching and molecular weight of surface-bound poly(ethylene oxide) on protein rejection. **Journal of Biomaterials Science - Polymer Edition**, v.6, p.123-132, 1994.
- BERTRAND, N.; LEROUX, J.C. The journey of a drug carrier in the body: an anatomophysiological perspective. **Journal of Controlled Release**, v.161, p.152–163, 2012.
- BLACKWOOD, M. A.; WEBER, B. L. BRCA1 and BRCA2: from molecular genetics to clinical medicine **Journal of Clinical Oncology**, v.16, n.5, p.1969-1977, 1998.
- BORNHOP, D. J.; CONTAG, C. H.; LICHA, K.; MURPHY, C. J. Advances in Contrast Agents, Reporters, and Detection. **Journal of Biomedical Science**, v.6, p.106–110, 2001.
- BOYD, N. F.; MARTIN, L. J.; ROMMENS, J. M. et al. Mammographic density: a heritable risk factor for breast cancer. **Methods in molecular biology**, v.472, p.343-360, 2009.
- BOYLE, P.; LEVIN, B. World Cancer Report 2008. **World Health organization. International Agency for Research on Cancer**, 2008.
- BRIGGER, I.; DUBERNET, C.; COUVREUR, P. Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.54, p.631-651, 2002.
- CAMBI, A.; LIDKE, D. S.; ARNDT-JOVIN, D. J.; FIGDOR, C. G.; JOVIN, T. Ligand-Conjugated Quantum Dots Monitor Antigen Uptake and Processing by Dendritic Cells. **Nano Lett**, v.7, p.970–977, 2007.
- CHEN, M.; SINGER, L.; SCHARF, A.; VON MIKECZ, A. Nuclear polyglutaminecontaining protein aggregates as active proteolytic centers. **Journal of Cell Biology**, v.180, p.697–704, 2008.
- CHEN, M.; VON MIKECZ, A. Formation of nucleoplasmic protein aggregates impairs nuclear function in response to SiO₂ nanoparticles. **Experimental Cell Research**, v.305, p.51–62, 2005.

COLDITZ, G. A.; KAPHINGS, K. A.; HANKINSON, S. E. et al. Family history and risk of breast cancer: nurses' health study. **Breast Cancer Research and Treatment**, v.133, n.3, p.1097-1104, 2012.

COLDITZ, G. A.; ROSNER, B. A.; SPEIZER, F. E. Risk factors for breast cancer according to family history of breast cancer. For the Nurses' Health Study Research Group. **Journal of the National Cancer Institute**, v.88, n.6, p.365-371, 1996.

CULTY, M.; SHIZARI, M.; THOMPSON, E. W.; UNDERHILL, C. B. Binding and degradation of hyaluronan by human breast cancer cell lines expressing different forms of CD44: correlation with invasive potential. **Journal of Cellular Physiology**, v.160, n.2, p.275-286, 1994.

CYBULSKI, C.; WOKOLORCZYK, D.; JAKUBOWSKA, A. et al. Risk of breast cancer in women with a CHEK2 mutation with and without a family history of breast cancer. **Journal of Clinical Oncology**, v.29, n.28, p.3747-3752, 2011.

DAVIS, S.; ILLUM, L. Drug delivery systems challenging molecules. **International Journal of Pharmaceutics**, v.176, p.1-8, 1998.

DEL BURGO, L. S.; PEDRAZ, J. L.; ORIVE, G. Advanced nanovehicles for cancer management. **Drug Discovery Today**, v.00, p.1447-1459, 2014.

DHRUBA, J. B.; SHAKER, A. M. *Pharm. Ther.* **2010**, 128.

DIX, J. A.; VERKMAN, A. S. Crowding effects on diffusion in solutions and cells.

EL-DAKDOUKI, M.H. et al. Development of multifunctional hyaluronan-coated nanoparticles for imaging and drug delivery to cancer cells. **Biomacromolecules**, v.13, p.1144-1151, 2012.

EYSTER, C. A.; COLE, N.B.; PETERSEN, S.; VISWANATHAN, K.; FRUH, K.; DONALDSON, J. G. MARCH ubiquitin ligases alter the itinerary of clathrin-independent cargo from recycling to degradation. **Molecular Biology of the Cell**, v.22, n.17, p.3218-3230, 2011.

FLORENCE, A. T. Pharmaceutical nanotechnology: more than size. Ten topics for research. **International Journal of Pharmaceutics**, v.339, p.1-2, 2007.

- FORTINA, P.; KRICKA, L. J.; SURREY, S.; GRODZINSKI, P. Nano biotechnology: the promise and reality of new approaches to molecular recognition. **Trends in Biotechnology**, v.23, p.168–173, 2005.
- FRANK, T. S.; MANLEY, S. A.; OLOPADE, O. I. et al. Sequence analysis of BRCA1 and BRCA2: correlation of mutations with family history and ovarian cancer risk. **Journal of Clinical Oncology**, v.16, n.7, p.2417-2425, 1998.
- GHANEM, G. E.; JOUBRAN, C.; ARNOULD, R.; LEJEUNE, F.; FRUHLING, J. Labelled polycyanoacrylate nanoparticles for human in vivo use. **Journal of Applied Radiation and Isotopes**, v.44, p.1219-1224, 1993.
- GHOSH, S. C.; NESLIHAN AALPAY, S.; KLOSTERGAARD, J. CD44: a validated target for improved delivery of cancer therapeutics. **Expert Opinion on Therapeutic Targets**, v.16, n.7, p.635-650, 2012.
- GOLDACRE, M. J.; ABISGOLD, J. D.; YEATES, D. G. et al. Benign breast disease and subsequent breast cancer: English record linkage studies. **Journal of Public Health**, v.32, n.4, p.565-571, 2010.
- GREVE, B.; KELSCH, R.; SPANIOL, K.; EICH, H. T.; GOTTE, M. Flow cytometry in cancer stem cell analysis and separation. **Cytometry A**, v.81, n.4, p.284-293, 2012.
- GULYAEV, A. E.; GELPERINA, S. E.; SKIDAN, I. N.; ANTROPOV, A. S.; KIVMAN, G. Y.; KREUTER, J. Significant transport of doxorubicin into the brain with polysorbate 80-coated nanoparticles. **Journal of Pharmacy Research**, v.16, p.1564-1569, 1999.
- GUO, J. et al. Aptamer-functionalized PEG-PLGA nanoparticles for enhanced anti-glioma drug delivery. **Biomaterials**, v.32, p.8010-8020, 2011.
- HAMAJIMA, N.; HIROSE, K.; TAJIMA, K. et al. Alcohol, tobacco and breast cancer-collaborative reanalysis of individual data from 53 epidemiological studies, including 58,515 women with breast cancer and 95,067 women without the disease. **British Journal of Cancer**, v.87, n.11, p.1234-45, 2002.
- HARRIS, E. N.; KYOSSEVA, S. V.; WEIGEL, J. A.; WEIGEL, P. H. Expression, processing, and glycosaminoglycan binding activity of the recombinant human 315-kDa

hyaluronic acid receptor for endocytosis (HARE), **The Journal of Biological Chemistry**, v.282, n.5, p.2785-2797, 2007.

HEMMERIC, P. H.; MICKECZ, A. H. Defining the Subcellular Interface of Nanoparticles by Live-Cell. **Plus One**, v.8, n.4, 2013.

HOARAU, D.; DELMAS, P.; DAVID, S.; ROUX, E.; LEROUX, J. C. Novel long-circulating lipid nanocapsules. **Journal of Pharmacy Research**, v.21, p.1783-1789, 2004

HOBBS, K.; MONSKY, W.; YUAN, F.; ROBERTS, W.; GRIFFITH, L.; TORCHILLIN, P.; JAIN, R. Regulation of transport pathways in tumor vessels: Role of tumor type and microenvironment. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.95, p.4607-4612, 1998.

HOFFMAN, A. S. The origins and evolution of “controlled” drug delivery systems. **Journal of Controlled Release**, v.132, n.3, p.153-163, 2008.

HOOD, J.D. et al. Tumor regression by targeted gene delivery to the neovasculature. **Science**, v.296, p.2404-2407, 2002.

JAIN, A.; and JAIN, S. K. In vitro and cell uptake studies for targeting of ligand anchored nanoparticles for colon tumors. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.35, p.404–416, 2008.

JOSEPHSON, L.; LEWIS, J.; JACOBS, P.; HAHN, P. F.; STARK, D. D. The effects of iron oxides on proton relaxivity. **Magnetic Resonance Imaging**, v.6, p.647–653, 1988.

KAACKS, R.; BERRINO, F.; KEY, T. et al. Serum sex steroids in premenopausal women and breast cancer risk within the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC). **Journal of the National Cancer Institute**, v.97, n.10, p.755-765, 2005.

KAACKS, R.; RINALDI, S.; KEY, T. J. et al. Postmenopausal serum androgens, oestrogens and breast cancer risk: the European prospective investigation into cancer and nutrition. **Endocrine-Related Cancer**, v.12, n.4, p.1071-1082, 2005.

KAROUSOU, E. et al. Roles and targeting of the HAS/hyaluronan/CD44 molecular system in cancer. **Matrix Biology**, 2016.

KESTER, M.; HEAKAL, Y.; FOX, T.; SHARMA, A.; ROBERTSON, G. P.; MORGAN, T.T.; ALTINOGLU, E. I.; TABACOVIC, A.; PARETTE, M. R.; ROUSE, S. M. et al. Calcium phosphate nanocomposite particles for in vitro imaging and encapsulated chemotherapeutic drug delivery to cancer cells. **Nano Lett**, v.8, p.4116-4121, 2008.

KOCH, A. M.; REYNOLDS, F.; KIRCHER, M. F.; MERKLE, H. P.; WEISSIEDER, R.; JOSEPHSON, L. Uptake and Metabolism of a Dual Fluorochrome Tat-nanoparticle in HeLa Cells. **Bioconjugate Chemistry**, v.14, p. 1115-1121, 2003.

KOO, O. M.; RUBINSTEIN, I.; ONYUKSEL, H. Role of nanotechnology in targeted drug delivery and imaging: a concise review. **Nanomedicine**, v.1, p.193–212, 2005.

KOSTARELOS, K.; MILLER, A. D. Synthetic, self-assembly ABCD nanoparticles; a structural paradigm for viable synthetic non-viral vectors. **Chemical Society Reviews**, v.34, p.970-994, 2005

KUMAR, A. et al. A Review: Role of Doxorubicin in Treatment of Cancer. **IJPSR**, v.5, n.10, p.4117-4128, 2014.

LANKELMA, J.; DEKKER, H.; RAFAEL, F. Doxorubicin Gradients in Human Breast Cancer. **Clinical Cancer Research**, v.5, p.1703-1707, 1995.

LASIO, B.; MALFATTI, L.; INOCENZZI, P. Photodegradation of rhodamine 6G dimers in silica sol-gel films. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**. v.271, p.93-98, 2013.

LI, J.; CHEN, Y. C.; TSENG, Y. C.; MOZUMDAR, S.; HUANG, L. Biodegradable calcium phosphate nanoparticle with lipid coating for systemic siRNA delivery. **Journal of Controlled Release**, v.142, p.416-421, 2010.

LIA, J.; DUB, X.; ZHENG, N.; XUA, L.; XUB, J.; LIA, S. Contribution of carboxyl modified chiral mesoporous silicanano particles in delivering doxorubicin hydrochloride in vitro: pH-response controlled release, enhanced drug cellular uptake and cytotoxicity. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v.141, p.374–381, 2016.

LIANG, P.; ZHAO, D.; WANG, C.; ZONG, J.; ZHUO, R.; CHENG, S. Facile Preparation of heparin/CaCO₃/CaP hybrid nano-carriers with controllable size for anticancer drug delivery. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v.102, p.783-788, 2012.

LIN, A. W. H.; LEWINSKI, N. A.; WEST, J. L.; HALAS, N. J.; DREZEK, R. A. Optically Tunable Nanoparticle Contrast Agents for Early Cancer Detection: Model-Based Analysis of Gold Nanoshells. **Journal of Biomedical Science**, v.10, n.6, p.1-10 (0604035), 2005.

MALONE, K. E.; DALING, J. R.; DOODY, D. R. et al. Family history of breast cancer in relation to tumor characteristics and mortality in a population-based study of young women with invasive breast cancer. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, v.20, n.12, p.2560-2571, 2011.

MATSUMURA, Y.; MAEDA, H. A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: Mechanism of tumoritropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs. **Cancer Research**, v.46, p.6387-6392, 1986.

MCCOMARCK, V. A.; SANTOS SILVA, I. Breast density and parenchymal patterns as markers of breast cancer risk: a meta-analysis. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, v.15, n.6, p.1159-1169, 2006.

MCNEIL, S. E. Nanotechnology for the biologist. **Journal of Leukocyte Biology**, v.78, p.585-594, 2005.

MISRA, S.; HELDIN, P.; HASCALL, V. C.; KARAMANOS, N. K.; SKANDALIS, S. S. et al. Hyaluronan-CD44 interactions as potential targets for cancer therapy. **FEBSJ**, v.27, n.9, p.1429-1443, 2011

MOGHIMI, S.M.; HUNTER, A.C.; MURRAY, J.C.; Nanomedicine: current status and future prospects. **FASEB**, v.19, p.311-330, 2005.

MORAWSKI, A. M.; LANZA, G. A.; WICKLINE, S. A. Targeted Contrast Agents for Magnetic Resonance Imaging and Ultrasound. **Current Opinion in Biotechnology**, v.16, p.89-92, 2005.

MORGAN, T. T.; GOFF, T. M.; ADAIR, J. H. The colloidal stability of fluorescent calcium phosphosilicate nanoparticles: the effects of evaporation and redispersion on particle size distribution. **Nanoscale**, v.3, p.2044-2053, 2011.

MORGAN, T. T.; MUDDANA, H.S.; ALTINO~GLU, E. I.; ROUSE, S. M.; TABAKOVI'Ć, A.; TABOUILLOT, T.; RUSSIN, T. J.; SHANMUGAVELANDY, S. S.; BUTLER, P. J.; EKLUND, P. C. et al. Encapsulation of organic molecules in calcium phosphate

nanocomposite particles for intracellular imaging and drug delivery. **Nano Letters**, v.8, p.4108-4115, 2008.

MORIMOTO, L. M.; WHITE, E.; CHEN, Z. et al. Obesity, body size, and risk of postmenopausal breast cancer: the Women's Health Initiative (United States). **Cancer Causes Control**, v.13, n.8, p.741-751, 2002.

MOSAFER, J.; ABNOUS, K.; TAFAGHODI, M.; MOKHTARZADEH, A.; RAMEZANI, M. In vitro and in vivo evaluation of anti-nucleolin-targeted magnetic PLGA nanoparticles loaded with doxorubicin as a theranostic agent for enhanced targeted cancer imaging and therapy. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.113, p.60–74, 2017.

MOTSKIN, M.; WRIGHT, D.; MULLER, K.; KYLE, N.; GARD, T.; PORTER, A. E.; SKEPPER, J. N. Hydroxyapatite nano and microparticles: correlation of particle properties with cytotoxicity and biostability. **Biomaterials**, v.30, p.3307–3317, 2009.

MUDDANA, H. S.; MORGAN, T. T.; ADAIR, J. H.; BUTLER, P. J. Photophysics of Cy3-encapsulated calcium phosphate nanoparticles. **Nano Letters**, v.9, p.1559-1566, 2009.

NAHRENDORF, M.; KELIHER, E.; MARINELLI, B.; WATERMAN, P.; FERUGLIO, P. F.; FEXON, L. et al. Hybrid PET-optical imaging using targeted probes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.107, p.7910-7915, 2010.

OLIVEIRA, M.; MUSSIA, S.; GOMES, D.; YOSHIDAC, M.; FREZARD, F.; CARREGAL, V. M.; FERREIRA, L. Tocopherol succinate improves encapsulation and anticancer activity of doxorubicin loaded in solid lipid nanoparticles. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v.140, p.246–253, 2016.

OYANE, A.; KIM, H.; FURUYA, T.; KOBUKO, T.; MIYAZAKI, T.; NAKAMURA, T. Preparation and assessment of revised simulated body fluids. **Journal of Biomedical Materials Research**, v.65A, p.188–195, 2003

PEER, D.; MARGALIT, R. Loading mitomycin C inside long circulating hyaluronan targeted nano-liposomes increases its antitumor activity in three mice tumor models. **International Journal of Cancer**, v.108, p.780–789, 2004.

PENZKOFER, A.; LU, Y. Fluorescence quenching of rhodamine 6G in methanol at high concentration, *Journal of Chemical Physics*, v.103, p.399-405, 1986.

PENZKOFER, A.; LENPACHER, W. Fluorescence behaviour of highly concentrated rhodamine 6G solutions, *Journal of Luminescence*, v.37, p.61-72, 1987.

PRENCIPE, G.; TABAKMAN, S. M.; WELSHER, K.; ZHUANG, L.; GOODWIN, A. P.; LI, Z.; HENRY, J.; HONGJIE, D. PEG branched polymer for functionalization of nanomaterials with ultra-long blood circulation. *Journal of the American Chemical Society*, v.131, n.13, p.4783-4787, 2008.

RAO, J.; DRAGULESCU-ANDRASI, A.; YAO, H. Fluorescence Imaging In Vivo: Recent Advances. *Current Opinion in Biotechnology*, v.18, p.17–25, 2007.

RAZZAGHI, H.; TROESTER, M. A.; GIERACH, G.L. et al. Mammographic density and breast cancer risk in White and African American Women. *Breast Cancer Research and Treatment*, v.135, n.2, p.571-580, 2012.

RIVANKAR, S. Doxorubicin formulations in cancer. *Journal of Cancer Research and Therapeutics*, v.10, n.4, 2014.

RUENRAROENGSACK, P.; COOK, J. M.; FLORENCE, A. T. Nano system drug targeting: facing up to complex realities. *Journal of Controlled Release*, v.141, p.265-276, 2010.

RUGHEIMER, L.; OLERUD, J.; JOHNSON, C.; TAKAHASHI, T.; SHIMIZU, K.; HANSELL, P. Hyaluronan synthases and hyaluronidases in the kidney during changes in hydration status. *Matrix Biology*, v.28, n.7, p.390-395. 2009.

SARKAR, A.; LINSLAL, C.L.; NAMPOORI, V.P.N. Spectral modification of mode structures in silver nanoparticle doped Rhodamine 6G. *Optic And Laser Technology*, v. 75, p.182-187. 2015.

SHUBAYEV, V. I.; PISANIC, T. R.; JIN, S. Magnetic nanoparticles for theragnostics. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v.61, p.467–477, 2009.

SKANDALIS, S. S.; GIALELI, C.; THEOCHARIS, A. D.; KARAMANOS, N.K. Advances and advantages of nanomedicine in the pharmacological targeting of hyaluronan-CD44 interactions and signaling in cancer. *Advances in Cancer Research*, v.123, p.277-317, 2014.

- SKANDALIS, S. S.; KOZLOVA, I.; ENGSTROM, U.; HELLMAN, U.; HELDIN, P. Proteomic identification of CD44 interacting proteins. **IUBMB Life**, v.62, n.11, p.833-840, 2010.
- SUN, C.; LEE, J. S.; ZHANG, M. Magnetic nanoparticles in MR imaging and drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.60, p.1252-1265, 2008.
- TABAKOVICK, A; KESTER, M; ADAIR, J.H. Calcium phosphate-based composite nanoparticles in bioimaging and therapeutic delivery applications. **WIREs Nanomed Nanobiotechnol**, V.4, P.96-112, 2012.
- TAM, Y. T.; WAH TO, K. K.; CHOW, A. Fabrication of doxorubicin nanoparticles by controlled anti solvent precipitation for enhanced intracellular delivery. **Colloids and Surfaces B: Bio interfaces**, v.139, p.249–258, 2016.
- TAMMI, R.; RILLA, K.; PIENIMAKI, J. P.; MACCALLUM, D. K.; HOGG, M.; LUUKKONEM, M. et al. Hyaluronan enters keratinocytes by a novel endocytic route for catabolism. **Journal of Biological Chemistry**, v.276, n.37, p.35111-35122, 2001.
- TEYMOURI, M.; FARZANEH, H.; BADIEE, A.; GOLMOHAMMADZADEH, S.; Sadri, K.; JAAFARI, M. R. Investigation of Hexadecylphosphocholine (miltefosine) usage in Pegylated liposomal doxorubicin as a synergistic ingredient: In vitro and in vivo evaluation in mice bearing C26 colon carcinoma and B16F0 melanoma. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.80, p.66–73, 2015.
- THANKAMONY, S.P.; KNUDSON, W. Acylation of CD44 and its association with lipid rafts are required for receptor and hyaluronan endocytosis. **Journal of Biological Chemistry**, v.281, n.45, p.34601-34609, 2006.
- THRALL, J. H. Nanotechnology and medicine. **Radiology**, v.230, p.315-318, 2004.
- TOBIN, L. et al. Pegylated siRNA-loaded calcium. **Biomaterials**, v.34, 2012.
- TOKUMITSU, H.; CHIKAWAL, H.; FUKUMORI, Y. Chitosan-gadopentetic acid complex nanoparticles for gadolinium neutron-capture therapy of cancer: Preparation by novel emulsion-droplet coalescence technique and characterization. **Journal of Pharmacy Research**, v.16, p.1830-1835, 1999.

F.M.P. Tonelli, S.M.S.N. Lacerda, N.C.O. Paiva, F.G. Pacheco, S.R.A. Scalzo Jr., F.H.P. de Macedo, J.S. Cruz, M.C.X. Pinto, J.D. Corrêa Jr., L.O. Ladeira, L.R. França, S. Guatimosime, R.R. Resende. Functionalized nanomaterials: are they effective to perform gene delivery to difficult-to-transfect cells with no cytotoxicity? *Nanoscale*. 7 (2015) 18036- 18043.

F. M. P. Tonelli, S. M. S. N. Lacerda, N. C. O. Paiva, M. S. Lemos, A. C. de Jesus, F. G. Pacheco, J. D. Correa-Junior, L. O. Ladeira, C. A. Furtado, L. R. França, R. R. Resende. Efficient and safe gene transfection in fish spermatogonial stem cells using nanomaterials, *RSC. Adv.* 6 (2016) 52636-52641.

TOOLE, B.P. Hyaluronan: from extracellular glue to pericellular cue. **Nature Reviews Cancer**, v.4, n.7, p.528-539, 2004.

TORCHILIN, V. P.; LEVCHENCO, T. S.; RAMMOHAN, R.; VOLODINA, N.; PAPAHAADJOPOULOS- STERNBERG, B.; D'SOUZA, G. G. M. Cell transfection in vitro and in vivo with nontoxic TAT peptide-liposome-DNA complexes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.100, p.1972–1977, 2003

TZIRCOTIS, G; THORNE, R. F; ISACKE, C. M. Chemotaxis towards hyaluronan is dependent on CD44 expression and modulated by cell type variation in CD44–hyaluronan binding. **Journal of Cell Science**, v.118, p.5119-5128, 2005.

UNEZAKI, S.; MARUYAMA, K.; HOSODA, J.; NAGAE, I.; KOYANAGI, Y.; NAKATA, M.; ISHIDA, O.; IWATSURU, M.; TSUCHIYA, S. Direct measurement of the extravasation of polyethyleneglycol-coated liposomes into solid tumor tissue by in vivo fluorescence microscopy. **International Journal of Pharmaceutics**, v.144, p.11-17, 1996.

VAN DER AUWERAER, M.; VERSHUERE, B.; DE SCHRYVER, F. C. Absorption and fluorescence properties of rhodamine B derivatives forming Langmuir–Blodgett films. **Langmuir**, v.4, p.583-588, 1998.

VEISEH, O.; GUNN, J. W.; ZHANG, M. Design and fabrication of magnetic nanoparticles for targeted drug delivery and imaging. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.62, p.284-304, 2010.

VICTOR, S.; PAUL, W.; JAYABALAN, M.; SHARMA, C. Curcubituril/hydroxyapatite based nanoparticles for potential use in theranostic application. **Journal of Chemistry**, 2016.

WANG, M. D.; SHIN, D. M.; SIMONS, J. W.; NIE, S. Nanotechnology for targeted cancer therapy. **Expert Review of Anticancer Therapy**, v.7, p.833–837, 2007.

WANG, X.; LIUA, Y.; WANGA, S.; SHIA, D.; ZHOUB, X.; WANGA, C.; WUA, J.; ZENGA, Z.; LI, Y.; SUNA, J.; WANGC, J.; ZHANGA, L. CD44-engineered mesoporous silica nanoparticles for overcoming multidrug resistance in breast cancer. **Applied Surface Science**, v.332, p.308–317, 2015.

WOLIN, K. Y.; CARSON, K.; COLDITZ, G. A. Obesity and cancer. **Oncologist**, v.15, n.6, p.556-565, 2010.

XIA, T.; KOVOCHICH, M.; BRANT, J.; HOTZE, M.; SEMPF, J. et al. Comparison of the abilities of ambient and manufactured nanoparticles to induce cellular toxicity according to an oxidative stress paradigm. **Nano Lett**, v.6, p.1794–1807, 2006.

XIA, T.; KOVOCHICH, M.; LIONG, M.; ZINK, J. I.; NEL, A. E. Cationic polystyrene nanosphere toxicity depends on cell-specific endocytic and mitochondrial injury pathways. **ACS Nano**, v.2, p.85–96, 2008.

YADAV, A. K. et al. Development and characterization of hyaluronic acid decorated PLGA nanoparticles for delivery of 5-fluorouracil. **Drug Delivery**, v.17, p.561–572, 2010.

YIH, T. C.; AL-FANDI, M. Engineered Nanoparticles as Precise Drug Delivery Systems. **Journal of Cellular Biochemistry**, v.97, p.1184-1190, 2006.

YIYAO, L.; HIROZAKU, M.; MICHIRIRO. Nanomedicine for drug delivery and imaging: A promising avenue for cancer therapy and diagnosis using targeted functional nanoparticles. **International Journal of Cancer**, v.120, p.2527-2537, 2007.

ZHANG, Q.; ZHAO, H.; LI, D.; LIU, L.; DU, S. A surface-grafted ligand functionalization strategy for coordinate binding of doxorubicin at surface of PEGylated mesoporous silica nanoparticles: Toward pH-responsive drug delivery. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v.149, p.138–145, 2017.

ZHANG, X. et al. Size-dependent in vivo toxicity of PEG-coated gold nanoparticles. **International Journal of Nanomedicine**, v.6, p.2071-2081, 2011.

