



Universidade de Brasília  
Instituto de Ciências Biológicas  
Departamento de Biologia Celular  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biologia Molecular)

**ANA LUÍSA DE GOUVÊA DA SILVA**

**Avaliação do potencial anti-tumoral de nanopartículas  
magnéticas conjugadas a azul de metileno para carcinoma  
de mama e de ovário**

Brasília 2020

Ana Luísa de Gouvêa da Silva

Avaliação do potencial anti-tumoral de nanopartículas magnéticas conjugadas a azul de metileno para carcinoma de mama e de ovário

**Orientadora:** Prof. Dra. Sônia Nair Bão

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Biologia Molecular), do Departamento de Biologia Celular, Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade de Brasília, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Mestre em Biologia Molecular.

Brasília

2020

Ana Luísa de Gouvêa da Silva

Avaliação do potencial anti-tumoral de nanopartículas magnéticas conjugadas a azul de metileno para carcinoma de mama e de ovário

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Biologia Molecular), do Departamento de Biologia Celular, Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade de Brasília, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Mestre em Biologia Molecular.

Aprovada em \_\_/\_\_/\_\_

BANCA EXAMINADORA

---

Profa. Dra. Sônia Nair Bão (Presidente)

---

Profa. Dra. Kelly Grace Magalhães (Membro Titular)

---

Prof. Dr. Anderson de Jesus Gomes (Membro Titular)

---

Dra. Bruna Cândido Guido (Membro Suplente)

Dedico este trabalho a minha família, o maior motivo de eu acordar todos os dias e agradecer por mais um dia de vida e pelas oportunidades que tenho, meus grandes amores: meus pais, Regina e Osvaldo, meu irmão, Mateus e, meu amor, Cristiano. Sem vocês eu não seria nada!

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus, sempre presente em minha vida me concedendo graças e bênçãos principalmente nos momentos mais difíceis.

Aos meus amados pais, Regina e Osvaldo, por serem o meu maior exemplo, minha inspiração, minha força e meu amor. Obrigada por estarem presentes em todos os meus passos, por me apoiarem nas minhas decisões e me impulsionarem a seguir meus sonhos, mesmo quando ninguém mais acreditava. Vocês sempre serão meus maiores incentivadores e meu eterno porto seguro. Eu e Mateus somos muito sortudos em ter vocês como pais! Eu amo vocês.

Ao meu querido irmão, que me ensina todos os dias novas formas de viver e encarar os fatos. Você é a minha saudade diária, eu te amo!

Ao meu esposo Cristiano, aquele a quem eu confiei a minha vida e o meu amor, que me escuta e está todos os dias me incentivando a seguir meus sonhos e passar pelas dificuldades. Obrigada por escolher compartilhar sua vida comigo, eu tenho o maior orgulho de ter você comigo. Eu te amo!

À minha orientadora Sônia Nair Bão pela orientação, pela oportunidade e por acreditar em meu trabalho. Carrego comigo não só a orientação acadêmica que recebi durante esse projeto, mas também os exemplos de profissionalismo e de força que a Senhora me mostrou. Meus sinceros agradecimentos.

Ao Professor Dr. Leonardo Giordano Paterno por acreditar em meu trabalho e sempre me socorrer nas horas mais difíceis. Agradeço também ao grupo do Laboratório de Polímeros e Nanomateriais, em especial aos alunos Alan e Cleber por me auxiliarem ao longo do trabalho.

À Professora Dra. Eneida de Paula e ao grupo do laboratório de Biomembranas do Departamento de Bioquímica da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) por me acolherem e contribuírem com a realização deste trabalho. Uma universidade que jamais esquecerei e que tive a honra de trabalhar.

Ao Laboratório de Microscopia Eletrônica e a todos os responsáveis por deixar meus dias mais leves e engraçados, Guilherme, Nihi, Bárbara Yasmin, Nabylla, Melissa, Bárbara, Karen, Ingrid, Núbia, Karine, Stefanny, Márcia, Marina, Ana Brígida. Construí uma família que levarei para o resto da vida!

À minha amiga e irmã Ludmilla David, por, mesmo distante, estar presente em todos os momentos mais especiais de minha vida. Obrigada por me incentivar, por ser meu exemplo e por me acolher em sua vida. Saiba que aprendi muito com você, não só em meio acadêmico, mas também como aproveitar a vida de todas as maneiras e valorizar todos aqueles que amamos. Eu te amo amiga, sinto muito sua falta!

À Natália Viana, minha filha científica. Sem você eu não teria conseguido. Obrigada por todas as palhaçadas, por me apoiar, me acompanhar nesse meu ritmo particular, me dizer “tudo vai dar certo, não fica louca” e até mesmo por brigar comigo quando necessário. Eu te desejo todo o sucesso do mundo e sinto sua falta todos os dias.

À Bruna Guido por ter me ensinado a viver a ciência da maneira mais especial que existe. Você é o maior exemplo de pesquisadora que conheço, sempre carrego um pedacinho

de “Bruna Guido” comigo para me socorrer nos momentos difíceis e me alegrar nos momentos mais especiais.

Ao CNPq, às agências de fomento – CAPES, FINEP, FAPDF, e ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Biologia Molecular) pelo financiamento deste trabalho. À Universidade de Brasília, que foi minha segunda casa por seis anos e me proporcionou momentos incríveis.

*“L’essentiel est invisible pour les yeux”*

(Le Petit Prince)

## RESUMO

O câncer, conjunto de doenças responsáveis pela segunda maior causa de morte global, é considerado um dos principais problemas de saúde pública atual. O diagnóstico precoce dessa doença, associada à melhor escolha da estratégia terapêutica, é fundamental para o sucesso de seu tratamento. O câncer de mama, segundo tipo mais incidente, e o de ovário, que, apresenta a letalidade mais elevada quando comparada com os demais tipos de câncer do sistema genital feminino, são aqueles que se destacam em mulheres. Nesse contexto, a nanobiotecnologia vem sendo desenvolvida e ganhando destaque para o diagnóstico precoce e a entrega direcionada de fármacos. Com isso, o presente trabalho sugere a associação de azul de metileno a nanopartículas de maghemita (MAGCIT-AM) para o tratamento de câncer de mama e de ovário. Foram utilizadas duas diferentes linhagens de carcinoma mamário humano (MDA-MB-231 e T-47D) e de ovário (A2780). As MAGCIT-AM foram obtidas por meio de uma reação da maghemita com ácido cítrico. Posteriormente, a amostra permaneceu em diálise por 72 horas e o azul de metileno foi adicionado à solução. MAGCIT-AM apresentou diâmetro hidrodinâmico de 60,93 nm com índice de polidispersão de 0,199 e potencial zeta de -20,9 mV. Nos estudos *in vitro* as linhagens celulares T47D e A2780, apresentaram uma redução significativa da viabilidade celular após o tratamento com MAGCIT-AM, fato não observado nas linhagens não tumorais (HNTMC e HUVEC) e MDA-MB-231. Por citometria, pode-se concluir que o principal mecanismo de endocitose envolvido na interiorização de MAGCIT-AM é a via da clatrina e que, a morte celular lítica e a necrose são os principais tipos de morte celular causada pelo nanossistema. Pode-se observar por microscopia eletrônica de varredura e de luz a alteração da morfologia celular das células tratadas. Experimentos de avaliação da produção de EROs confirmam o mecanismo citotóxico causado por MAGCIT-AM, evidenciando a importância da produção de espécies reativas de oxigênio para o tratamento de células tumorais. Estudos realizados com os compostos separados, demonstram que a associação entre o azul de metileno e o núcleo magnético é o responsável pelo potencial terapêutico do nanossistema desenvolvido para o tratamento de câncer de mama e de ovário *in vitro*, tendo em vista que o azul de metileno teve sua atividade mais evidenciada quando acoplado ao núcleo de MAGCIT.

**Palavras chave:** câncer de mama; câncer de ovário; nanotecnologia; azul de metileno; nanopartículas magnéticas.



## **ABSTRACT**

Cancer, a group of diseases responsible for the second largest cause of global death, is considered one of the main public health problems today. The early diagnosis associated with the best choice of therapeutic strategy, is essential for the success for the treatment of these diseases. Breast cancer, the second most common type, and ovarian cancer, which has the highest lethality when compared to other types of cancer on the female genital system, are those that stand out in women. In this context, nanobiotechnology has been developed for early diagnosis and targeted drug delivery. In this context, the present work suggests the association of methylene blue with maghemite nanoparticles (MAGCIT-AM) for the treatment of breast and ovarian cancer. In this work two different human breast carcinoma line (MDA-MB-231 and T-47D) and one ovary cancer line (A2780) were used. MAGCIT-AM was obtained by chemical reaction with maghemite and citric acid. Subsequently, the sample is kept on dialysis for 72 hours and methylene blue was added to the solution. MAGCIT-AM presented a hydrodynamic diameter of 60,93 nm with a polydispersity index of 0,199 and zeta potential of -20,9 mV. *In vitro* studies showed that T-47D and A2780 cell lines, had a significant reduction in cell viability after treatment with MAGCIT-AM, event not observed in non-tumor lines (HNTMC and HUVEC) and MDA-MB-231. By cytometry, it can be concluded that the main mechanism of endocytosis involved in the interiorization of MAGCIT-AM is the clathrin pathway and both lytic death and necrosis are the main types of cell death caused by the nanosystem. It can be observed by scanning electron microscopy and light microscopy the change in cell morphology. Experiments to evaluate ROS production confirm the cytotoxic mechanism caused by MAGCIT-AM, showing the importance of producing reactive oxygen species for the treatment of tumor cells. Studies carried out with separate compounds, show that the association between methylene blue and the magnetic nucleus is responsible for the therapeutic potential of the nanosystem to the treatment of breast and ovarian cancer *in vitro*, considering that methylene blue activity was more evident when coupled to the MAGCIT core.

**Keywords:** Breast Cancer; Ovarian Cancer; Nanotechnology; Methylene Blue; Magnetic Nanoparticles.

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estimativas para o ano de 2020 das taxas brutas de incidência por 100 mil habitantes e do número de casos novos de câncer segundo sexo e localização primária.....	20
Figura 2. Características fundamentais para o desenvolvimento do câncer.....	21
Figura 3. Processo de carcinogênese.....	22
Figura 4. Comparativo da Incidência e Mortalidade dos cânceres ginecológicos femininos, dados da Organização Mundial da Saúde.....	25
Figura 5. Modelo proposto para o desenvolvimento do câncer epitelial de ovário (CEO) a partir de células-tronco.....	26
Figura 6. Diferentes tipos de nanopartículas (NPS).....	29
Figura 7. Estrutura molecular do azul de metileno.....	31
Figura 8. Progressão tumoral e espécies reativas de oxigênio (EROs).....	34
Figura 9. Diagrama do delineamento experimental desenvolvido no trabalho.....	38
Figura 10. Estabilidade coloidal de MAGCIT-AM no período de 180 dias.....	46
Figura 11. Variação do potencial zeta, diâmetro hidrodinâmico e índice de polidispersão em valores graduais de pH.....	47
Figura 12. Ultraestrutura e tamanho médio de MAGCIT-AM por meio de microscopia eletrônica de transmissão.....	48
Figura 13. Gráfico da composição elementar química de MAGCIT-AM.....	48
Figura 14. Espectros de FTIR de AM livre (azul), de MAGCIT (verde) e de MAGCIT-AM (vermelho).....	49
Figura 15. Espectroscopia de UV-Vis de azul de metileno livre (AM), de nanopartículas de maghemita associadas ao citrato (MAGCIT) e de nanopartículas de maghemita associadas ao citrato e ao azul de metileno (MAGCIT-AM).....	50
Figura 16. Espectroscopia de absorção e de emissão de azul de metileno livre.....	51
Figura 17. Resultado do efeito filtro na emissão de AM livre.....	52

Figura 18. Efeito supressor na emissão de AM.....	53
Figura 19. Avaliação da viabilidade celular por alamarBlue™ da linhagem A2780 após 24, 48 e 72 horas de tratamento com AM livre, MAGCIT e MAGCIT-AM.....	54
Figura 20. Avaliação da viabilidade celular por alamarBlue™ da linhagem T-47D após 24, 48 e 72 horas de tratamento com AM livre, MAGCIT e MAGCIT-AM.....	55
Figura 21. Avaliação da viabilidade celular por alamarBlue™ da linhagem MDA-MB-231 após 24, 48 e 72 horas de tratamento com AM livre, MAGCIT e MAGCIT-AM.....	56
Figura 22. Avaliação da viabilidade celular por alamarBlue™ da linhagem HUVEC após 24, 48 e 72 horas de tratamento com AM livre, MAGCIT e MAGCIT-AM.....	57
Figura 23. Avaliação da viabilidade celular por alamarBlue™ das células HNTMC após 24, 48 e 72 horas de tratamento com AM livre, MAGCIT e MAGCIT-AM.....	58
Figura 24. Avaliação morfológica da linhagem A2780 após 24, 48 e 72 horas de tratamento com MAGCIT-AM por microscopia de luz.....	61
Figura 25. Avaliação morfológica da linhagem T-47D após 24, 48 e 72 horas de tratamento com MAGCIT-AM por microscopia de luz.....	61
Figura 26. Avaliação morfológica da linhagem MDA-MB-231 após 24, 48 e 72 horas de tratamento com MAGCIT-AM por microscopia de luz.....	62
Figura 27. Avaliação morfológica da linhagem HUVEC após 24, 48 e 72 horas de tratamento com MAGCIT-AM por microscopia de luz.....	63
Figura 28. Avaliação morfológica da linhagem HNTMC após 24, 48 e 72 horas de tratamento com MAGCIT-AM por microscopia de luz.....	63
Figura 29. Avaliação morfológica por microscopia eletrônica de varredura das linhagens A2780, MDA-MB-231 e T-47D após 48 horas de tratamento com MAGCIT-AM.....	65
Figura 30. Efeito do tratamento com MAGCIT-AM na capacidade de formação de colônias das células A2780 e T-47D.....	66
Figura 31. Efeito do tratamento com MAGCIT-AM na capacidade de recuperação celular de HUVEC, HNTMC e MDA-MB-231.....	67

Figura 32. Efeito da inibição de vias de endocitose sobre a internalização de MAGCIT-AM por 6 horas.....	68
Figura 33. Avaliação do ciclo celular em células A2780, T-47D, MDA-MB-231, HUVEC e HNTMC tratadas com MAGCIT-AM (IC <sub>50</sub> , 24 horas).....	71
Figura 34. Avaliação do perfil de morte celular induzido por MAGCIT-AM (0,78 µg/mL, 48 horas) em células A2780, T-47D, MDA-MB-231, HUVEC e HNTMC.....	74
Figura 35. Produção de EROs pela linhagem A2780 após tratamento com MAGCIT-AM (0,78 µg/mL de AM), AM livre e MAGCIT analisados por espectrofotometria.....	76
Figura 36. Produção de EROs pela linhagem T-47D após tratamento com MAGCIT-AM (0,78 µg/mL de AM), AM livre e MAGCIT analisados por espectrofotometria.....	76
Figura 37. Produção de EROs pela linhagem MDA-MB-231 após tratamento com MAGCIT-AM (0,78 µg/mL de AM), AM livre e MAGCIT analisados por espectrofotometria.....	77
Figura 38. Produção de EROs pela linhagem HUVEC após tratamento com MAGCIT-AM (0,78 µg/mL de AM), AM livre e MAGCIT analisados por espectrofotometria.....	78
Figura 39. Produção de EROs pelas células HNTMC após tratamento com MAGCIT-AM (0,78 µg/mL de AM), AM livre e MAGCIT analisados por espectrofotometria.....	78
Figura 40. Produção de EROs nas linhagens tumorais tratadas e não tratadas com MAGCIT-AM.....	80

## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Propriedades de MAGCIT-AM.....	45
Tabela 2. Concentração inibitória de 50% de MAGCIT-AM das linhagens MDA-MB-231, A2780, T-47D, HUVEC e HNTMC nos tempos de 24, 48 e 72 horas.....	59
Tabela 3. Concentração inibitória de 50% de AM livre das linhagens MDA-MB-231, A2780, T-47D, HUVEC e HNTMC nos tempos de 24, 48 e 72 horas.....	60

## **ÍNDICE DE QUADROS**

Quadro 1. Espécies Reativas de Oxigênio.....	32
Quadro 2. Reagentes utilizados para a realização dos experimentos.....	37

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C	Graus Celsius
$^1\text{O}_2$	Oxigênio Singleteo
A2780	Linhagem de carcinoma de ovário
AKT	Proteína quinase B
AM	Azul de metileno
AMPK	<i>AMP-activated protein kinase</i>
ATP	Adenosina Trifosfato
BCRJ	Banco de Células do Rio de Janeiro
BRAF	Proto-oncogene que expressa B-Raf
BRCA1	Proteína do tipo 1 de susceptibilidade ao câncer de mama
BRCA2	Proteína do tipo 2 de susceptibilidade ao câncer de mama
CA-125	Marcador tumoral de câncer de ovário
$\text{CaCl}_2$	Cloreto de cálcio
CEO	Câncer Epitelial de Ovário
Cl	Cloro
$\text{CO}_2$	Dióxido de Carbono
DAPI	<i>4',6-Diamidino-2-Phenylindole, Dihydrochloride</i>
DCFH-DA	<i>2'7'-Dichlorofluorescein diacetate</i>
DH	Diâmetro hidrodinâmico
DLS	Espalhamento de luz dinâmica
DMEM	<i>Dubelcco's Modified Eagle Medium</i>
DMEM-F12	Meio de Eagle modificado por Dulbecco: Mistura de nutrientes F-12
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EDS/EDX	Espectroscopia de raio X por dispersão de energia
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
ESO	Célula tronco de epitélio de superfície do ovário
Fe	Ferro
$\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$	Maghemita

Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	Magnetita
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FITC	Fluoresceína
FTIR	Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier
HEPES	<i>(4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid)</i>
HER2	Receptor do fator de crescimento epidermal humano 2 ( <i>Human Epidermal growth factor Receptor 2</i> ).
HNTMC	Células mesenquimais não tumorais humanas de polpa dentária
HNO <sub>3</sub>	Ácido Nítrico
HUVEC	Células endoteliais de veia umbilical humana
IC <sub>50</sub>	Concentração Inibitória de 50%
IDH1	Isocitrato desidrogenase 1
INCA	Instituto Nacional do Câncer
KBr	Bromídeo de Potássio
KRAS	Oncogene que codifica GTPase KRas
L-15	<i>Leibowitz medium</i>
MAGCIT	Nanopartícula composta por maghemita e citrato
MAGCIT-AM	Nanopartícula de maghemita associada a azul de metileno
MDA-MB-231	Linhagem celular de adenocarcinoma mamário
MET	Microscopia Eletrônica de Transmissão
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
mTOR	<i>Mammalian target of rapamycin</i>
Na	Sódio
NaCl	Cloreto de Sódio
NADPH	Fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina
NaOH	Hidróxido de sódio
NPs	Nanopartículas
NPM	Nanopartícula magnética
NRF2	Fator nuclear relacionado ao eritróide 2
O	Oxigênio molecular
PBS	Tampão Fosfato Salina ( <i>Phosphate buffered saline</i> )



PdI	Índice de Polidispersão
PET	<i>Positron Emission Tomography</i>
PI3K	<i>Phosphoinositide 3-kinase</i>
PPP	Via pentose fosfato
PTEN	Gene que expressa a proteína PTEN (Homólogo da fosfatase e tensina)
PI	Iodeto de Propídio ( <i>propidium Iodide</i> )
PZ	Potencial Zeta
RE	Receptor de estrógeno
RP	Receptor de progesterona
RPMI-1640	<i>Roswell Park Memorial Institute medium</i>
S	Enxofre
SFB	Soro Fetal Bovino
SPECT	<i>Single Photon Emission Computed Tomography</i>
T-47D	Linhagem celular de carcinoma ductal mamário
TECs	Tumores do estroma do cordão sexual
TN	Câncer de mama triplo-negativo
WHO	<i>World Health Organization</i>

## SUMÁRIO

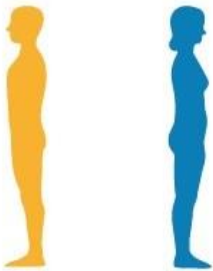
<b>1. Introdução</b> .....	20
1.1 <i>Câncer</i> .....	20
1.1.1 <i>Câncer de mama</i> .....	23
1.1.2 <i>Câncer de ovário</i> .....	24
1.2 <i>Tratamentos convencionais para o câncer</i> .....	27
1.3 <i>Nanobiotecnologia e terapias alternativas</i> .....	28
1.3.1 <i>Nanopartículas magnéticas</i> .....	29
1.4 <i>Azul de Metileno (AM)</i> .....	30
1.5 <i>Espécies reativas de oxigênio (EROs) e câncer</i> .....	31
<b>2. Justificativa</b> .....	35
<b>3. Objetivos</b> .....	36
3.1 <i>Objetivo geral</i> .....	36
3.2 <i>Objetivos específicos</i> .....	36
<b>4. Materiais e Métodos</b> .....	37
4.1 <i>Reagentes</i> .....	37
4.2 <i>Delineamento experimental</i> .....	37
4.3 <i>Síntese das nanopartículas de maghemita associadas ao azul de metileno (MAGCIT-AM)</i> .....	38
4.4 <i>Caracterização e Estabilidade Termodinâmica de MAGCIT-AM</i> .....	38
4.5 <i>Espectroscopia do Ultravioleta (UV)-Visível e Espectroscopia do Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)</i> .....	39
4.6 <i>Espectroscopia de Fluorescência</i> .....	39
4.7 <i>Manutenção das linhagens celulares</i> .....	40
4.8 <i>Ensaio de Viabilidade Celular</i> .....	40
4.9 <i>Ensaio de Formação de Colônia e Recuperação Celular</i> .....	40
4.10 <i>Análise da ultraestrutura de MAGCIT-AM por microscopia eletrônica de transmissão</i> .....	41
4.11 <i>Caracterização da morte celular induzida por MAGCIT-AM</i> .....	41
4.12 <i>Análise do ciclo celular por marcação com iodeto de propídio (PI)</i> .....	42

4.13	<i>Análise da morfologia celular das linhagens por microscopia eletrônica de varredura.....</i>	42
4.14	<i>Análise da morfologia celular por microscopia de luz.....</i>	43
4.15	<i>Análise qualitativa da produção de EROs por Microscopia de Fluorescência.....</i>	43
4.16	<i>Quantificação da produção de EROs por Espectrofotometria e Citometria de fluxo.....</i>	43
4.17	<i>Estudo da endocitose.....</i>	44
4.18	<i>Análise estatística.....</i>	44
<b>5.</b>	<b>Resultados.....</b>	<b>45</b>
5.1	<i>Obtenção e caracterização de MAGCIT-AM.....</i>	45
5.2	<i>FTIR, espectroscopia do UV-Visível e estudo fotofísico de MAGCIT-AM.....</i>	49
5.3	<i>Estudo Fotofísico de MAGCIT-AM por meio de espectroscopia de absorção e de emissão.....</i>	50
5.4	<i>Análise da citotoxicidade de AM livre, MAGCIT e MAGCIT-AM.....</i>	53
5.5	<i>Cálculo da Concentração Inibitória de 50% de AM livre e de MAGCIT-AM (IC<sub>50</sub>).....</i>	58
5.6	<i>Avaliação das alterações morfológicas decorrentes do tratamento com MAGCIT-AM.....</i>	60
5.7	<i>Avaliação da capacidade de formação de colônias e recuperação celular das células tratadas MAGCIT-AM.....</i>	65
5.8	<i>Internalização de MAGCIT-AM por vias endocíticas.....</i>	67
5.9	<i>Alterações no perfil do ciclo celular de células A2780, T-47D, MDA-MB-231, HUVEC e HNTMC decorrente do tratamento com MAGCIT-AM.....</i>	69
5.10	<i>Análise do tipo de morte celular causada pelo tratamento com MAGCIT-AM.....</i>	71
5.11	<i>Produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) pelas linhagens celulares em decorrência do tratamento com MAGCIT-AM.....</i>	75
<b>6.</b>	<b>Discussão.....</b>	<b>82</b>
<b>7.</b>	<b>Conclusão.....</b>	<b>87</b>
<b>8.</b>	<b>Perspectivas.....</b>	<b>89</b>
<b>9.</b>	<b>Referências Bibliográficas.....</b>	<b>90</b>

## 1. Introdução

### 1.1 Câncer

O câncer, um conjunto de doenças responsáveis pela segunda maior causa de mortes global, ficando apenas atrás das doenças cardiovasculares, é considerado um dos principais problemas de saúde pública atual (Siegel *et al.*, 2018). Segundo dados da World Health Organization (WHO), estima-se que uma a cada seis mortes globais sejam ocasionadas pelas neoplasias, correspondendo a aproximadamente 9,6 milhões de mortes durante o ano de 2018 (WHO, 2018; INCA, 2018). No Brasil, são estimados a ocorrência de 450 mil novos casos de câncer, excetuando-se o câncer de pele não melanoma, entre os anos de 2020 a 2022. Os seus tipos mais incidentes são os de próstata, pulmão, cólon e reto e estômago para o sexo masculino; e os cânceres de mama, cólon e reto, colo do útero e pulmão para o sexo feminino (figura 1) (INCA, 2020).

Localização Primária	Casos	%			Localização Primária	Casos	%
Próstata	65.840	29,2%		Homens	Mama feminina	66.280	29,7%
Cólon e reto	20.520	9,1%		Mulheres	Cólon e reto	20.470	9,2%
Traqueia, brônquio e pulmão	17.760	7,9%			Colo do útero	16.590	7,4%
Estômago	13.360	5,9%			Traqueia, brônquio e pulmão	12.440	5,6%
Cavidade oral	11.180	5,0%			Glândula tireoide	11.950	5,4%
Esôfago	8.690	3,9%			Estômago	7.870	3,5%
Bexiga	7.590	3,4%			Ovário	6.650	3,0%
Linfoma não Hodgkin	6.580	2,9%			Corpo do útero	6.540	2,9%
Laringe	6.470	2,9%			Linfoma não Hodgkin	5.450	2,4%
Leucemias	5.920	2,6%			Sistema nervoso central	5.220	2,3%

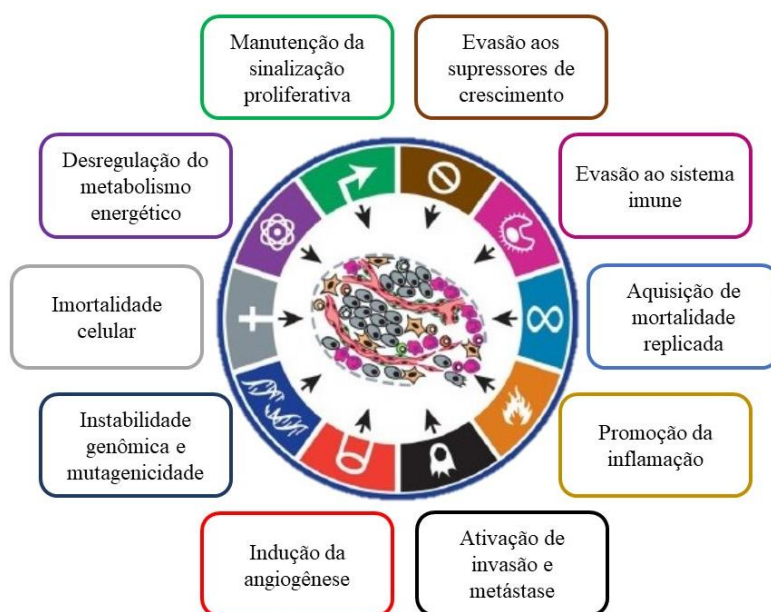
\*Números arredondados para múltiplos de 10.

**Figura 1. Estimativas para o ano de 2020 das taxas brutas de incidência por 100 mil habitantes e do número de casos novos de câncer segundo sexo e localização primária.** Fonte: INCA, 2020.

O desenvolvimento tumoral é resultado da interação entre os fatores genéticos e agentes externos biológicos, químicos ou físicos, que podem agir em conjunto iniciando ou promovendo o processo de carcinogênese. Os fatores genéticos, mutações no DNA, desarranjos hormonais, fatores imunes e epigenéticos, são responsáveis por apenas 5% a 10% de todos os cânceres, já os demais números são resultados de comportamentos individuais, como o tabagismo, má alimentação, alcoolismo, exposições à agentes mutagênicos, sedentarismo, descontrole hormonal, processos inflamatórios crônicos, infecções virais, entre outros (Flavahan *et al.*, 2016; Gharibvand *et al.*, 2017; INCA, 2018).

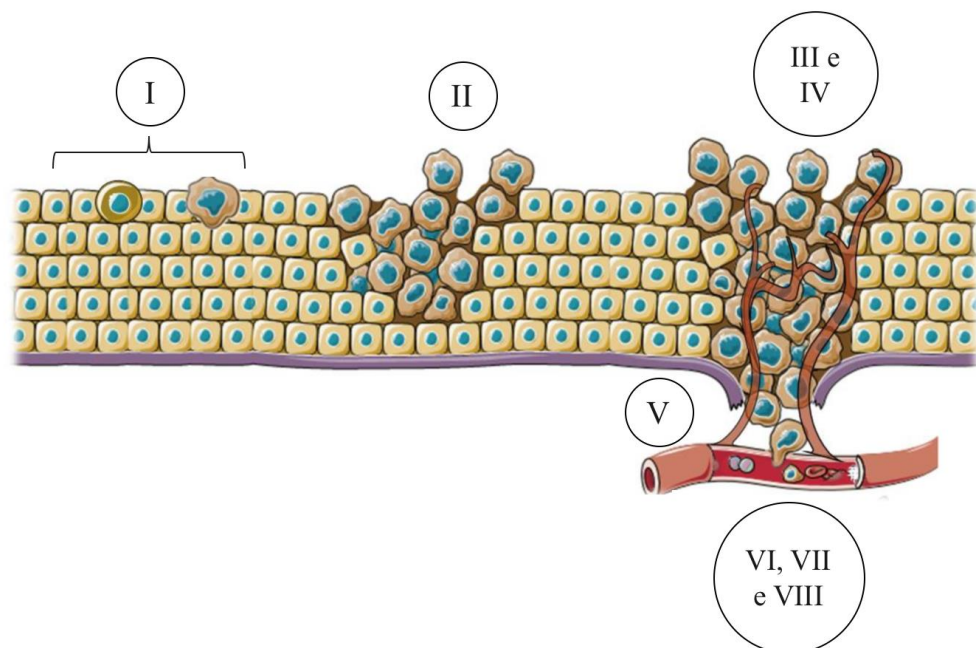
Além dos fatores externos e genéticos que estão relacionados ao desenvolvimento do câncer, o envelhecimento também é considerado um elemento fundamental para o progresso dessa doença, considerando-se que a neoplasia aumenta de forma proporcional conforme a idade dos indivíduos. Estudos justificam essa associação devido ao acúmulo de tempo de exposição a fatores de risco combinado com a tendência natural de perda de eficiência dos mecanismos de manutenção e reparo das funções celulares (Heitz *et al.*, 2017; Ellison *et al.*, 2017).

A neoplasia é ocasionada por uma sequência de eventos mutacionais que levam a duas principais características, a proliferação descontrolada e a imortalidade de células somáticas. Esses fatores são os considerados mais preocupantes no ponto de vista clínico, tendo em vista que eles interferem na capacidade celular de invadir o tecido adjacente e de se estabelecer em novos órgãos, o que é denominado metástase (INCA, 2018). Dentre as características fundamentais para o desenvolvimento do câncer, estão a evasão ao sistema imune, a promoção da inflamação no ambiente tumoral, a imortalidade celular, a capacidade de invasão, a indução da angiogênese, a instabilidade genômica, a resistência a apoptose, a desregulação do metabolismo energético, a proliferação descontrolada e, finalmente, a evasão aos supressores de crescimento celular (figura 2) (Hanahan *et al.*, 2011).



**Figura 2. Características fundamentais para o desenvolvimento do câncer.** Na figura estão representados os principais fatores relacionados a evasão ao sistema imune, a promoção da inflamação no ambiente tumoral, a imortalidade celular, a capacidade de invasão, a indução da angiogênese, a instabilidade genômica, a resistência a apoptose, a desregulação do metabolismo energético, a proliferação descontrolada e a evasão aos supressores de crescimento celular. (Adaptada de Hanahan *et al.*, 2011).

Os tumores podem se apresentar de duas maneiras distintas, como uma massa tumoral benigna ou maligna. As neoplasias benignas são aquelas em que ocorre o aparecimento da massa tumoral, porém, as células que a compõe não apresentam a capacidade de migrar para outras regiões corporais, fato distinto nas neoplasias malignas, em que essa massa possui a capacidade de romper a membrana basal e invadir os tecidos adjacentes. Estudos de Fouad & Aanei (2017) descrevem as oito principais etapas para o surgimento do câncer após as células sofrerem diferenciação (I), sendo elas: II) crescimento seletivo e avanço da proliferação celular, III) desenvolvimento das células tumorais a partir da adaptação ao estresse local (falha no reparo de DNA, proliferação descontrolada, evasão à apoptose, senescência e autofagia); IV) formação de vasos sanguíneos (angiogênese); V) invasão e metástase; VI) alterações metabólicas (captação desregulada de glicose e aminoácidos, aumento da demanda de nitrogênio, alterações na regulação de genes controlados por metabólitos); VII) modificações no microambiente por meio da comunicação parácrina entre as células cancerígenas e estromais e VIII) modulação imunitária (figura 3).



**Figura 3. Processo de carcinogênese.** I) diferenciação de uma célula normal em maligna, II) crescimento seletivo e avanço da proliferação celular, III) favorecimento do desenvolvimento do tumor a partir da promoção de alterações locais pelo estresse, IV) formação de vasos sanguíneos, V) invasão e metástase, VI) alterações metabólicas, VII) modificações no microambiente e VIII) modulação imunitária. (Adaptada de Rodrigues, 2018).

O câncer é considerado um grupo de doenças silenciosas, podendo permanecer assintomático durante longos períodos até se tornar detectável (Weimberg, 2014). O

diagnóstico precoce dessa doença, associada à melhor escolha da estratégia terapêutica, é fundamental para o sucesso do tratamento e aumentar a sobrevivência do paciente (WHO, 2018). Porém, apesar do avanço nas técnicas para a detecção tumoral, elas ainda apresentam limitações em relação à sensibilidade e/ou à resolução para tumores em estágios iniciais, ou seja, detectam apenas tumores sólidos com aproximadamente  $10^9$  células (Fragioni, 2008). A demora pela obtenção do diagnóstico é uma das principais características ligadas à elevada taxa de mortalidade dessa doença, tendo em vista que, quando descoberta, a doença já se encontra em fases avançadas, podendo até mesmo inviabilizar a cura do paciente (Salzman *et al.*, 2009).

### 1.1.1 Câncer de mama

O adenocarcinoma mamário é o segundo tipo de câncer mais incidente no mundo, representando aproximadamente 25,2% de todos os tipos de câncer diagnosticados em mulheres; para o Brasil, foram estimados cerca de 66280 novos casos para o ano de 2020, (INCA, 2020).

O câncer de mama é considerado uma doença heterogênea na clínica e na morfologia, sendo reconhecidos mais de 20 subtipos diferentes da doença. Fatores genéticos, vida reprodutiva, comportamento e estilo de vida estão intimamente relacionados com o desenvolvimento dessa doença. Envelhecimento, histórico familiar, densidade do tecido mamário, uso de anticoncepcionais orais, menopausa tardia, terapia de reposição hormonal e menarca precoce são os fatores de risco mais bem conhecidos para o desenvolvimento do câncer de mama (WHO, 2018; INCA, 2018).

A hereditariedade, em menor proporção, também é outro fator que está relacionado ao surgimento dessa doença, uma vez que cerca de 4-9% dos casos são geralmente causados pela mutação nos genes das proteínas BRCA1 e BRCA2 em que, sua expressão, aumenta consideravelmente o risco do aparecimento da doença, principalmente em mulheres que possuem casos familiares com câncer de mama ou de ovário (Fackenthal & Olopade, 2007; Narod & Salmena, 2011; Semmler *et al.*, 2019).

O gene BRCA1, encontrado no braço longo do cromossomo 17, codifica uma proteína que participa na regulação do ciclo celular, tendo um papel essencial na regulação da expressão gênica. Atuando como supressor tumoral, esse gene está relacionado com o reparo de DNA por excisão de nucleotídeos, a regulação dos pontos de controle do ciclo celular, a ubiquitinação de proteínas, o remodelamento da cromatina e o silenciamento do cromossomo X. O gene BRCA2, encontrado no cromossomo 13 é responsável por codificar uma proteína que, assim como a

BCRA1, apresenta um papel na regulação da transcrição, sendo responsável pela manutenção da estabilidade genômica por meio de suas atividades de recombinação homóloga, de checkpoint mitótico e de localização do centrôssomo durante a citocinese (Escobar, 2011).

A principal classificação molecular utilizada para esse tipo de câncer, baseou-se na análise de biomarcadores tumorais, expressão de HER2 e receptores de estrogênio (RE) e progesterona (RP), para o melhor diagnóstico e escolha da terapia a ser utilizada. Nos últimos anos, o câncer de mama foi classificado, pela técnica de microarray, em cinco subtipos principais de acordo com os perfis de marcadores moleculares, dentre eles estão o luminal A, luminal B, normal similar, HER2 e basaloide (Geyer *et al.*, 2009).

O subtipo luminal A é caracterizado pela presença do receptor de RP e/ou RE e ausência na superexpressão de HER2 em suas células, já o luminal B exibe ambos os receptores hormonais e possui uma alta expressão de HER2. Os normais similares, agrupam-se com fibroadenomas e amostras normais de mama contendo uma alta concentração de células estromais, não sendo considerado o subtipo mais incidente desse tipo de câncer (Geyer *et al.*, 2009).

Dentre os subtipos classificados, tem-se o câncer HER2+ e o basaloide, contribuindo com a maior incidência e mortalidade decorrentes dessa doença. As células HER2+ não possuem os receptores hormonais, porém, superexpressam a proteína HER2. O câncer de mama basaloide não expressa os receptores hormonais nem a proteína HER2, contribuindo com cerca de 80% dos cânceres de mama considerados triplo-negativos (TN) (Almeida *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2017; Pedraza-Arévalo *et al.*, 2017; Hilton *et al.*, 2017).

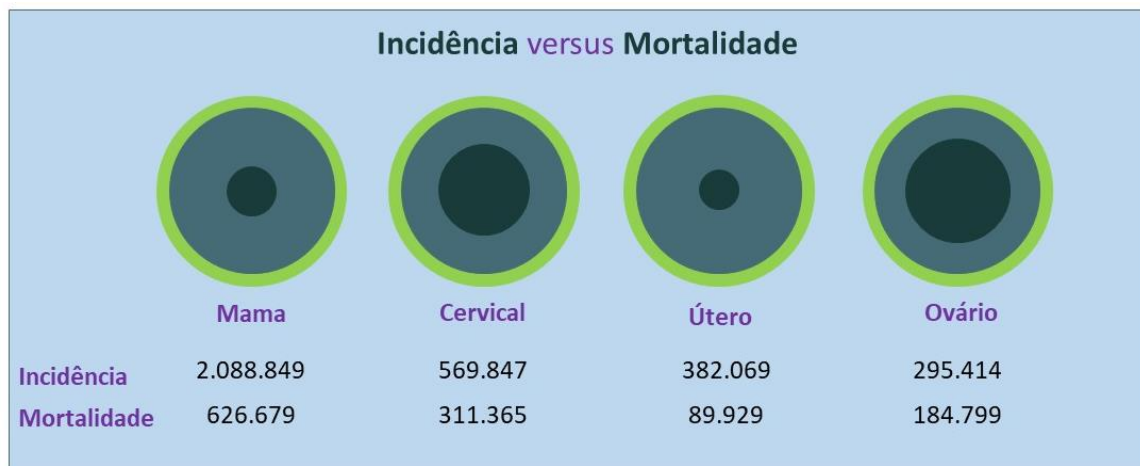
Assim como nos outros tipos de câncer, o diagnóstico precoce da neoplasia de mama reflete significativamente em um bom prognóstico da doença, com a taxa de aproximadamente 65% de sobrevivência das pacientes. A descoberta desse tipo de câncer se dá principalmente com os exames periódicos de toque e de mamografia, entretanto, o número de mulheres que chegam ao óbito antes do fim do tratamento ainda continua elevado (Nounou *et al.*, 2015; INCA, 2018; Nelson *et al.*, 2020).

### 1.1.2 Câncer de ovário

O câncer de ovário é um grupo heterogêneo de neoplasias que possuem características clinicopatológicas e moleculares distintas. No Brasil, são esperados cerca de 6650 novos casos dessa doença para o ano de 2020. Apesar de ser caracterizado pela sua baixa incidência, a letalidade do câncer de ovário é mais elevada quando comparados aos outros tipos de câncer dos órgãos reprodutores femininos (Webb & Jordan, 2017). Estudos apontam que o câncer



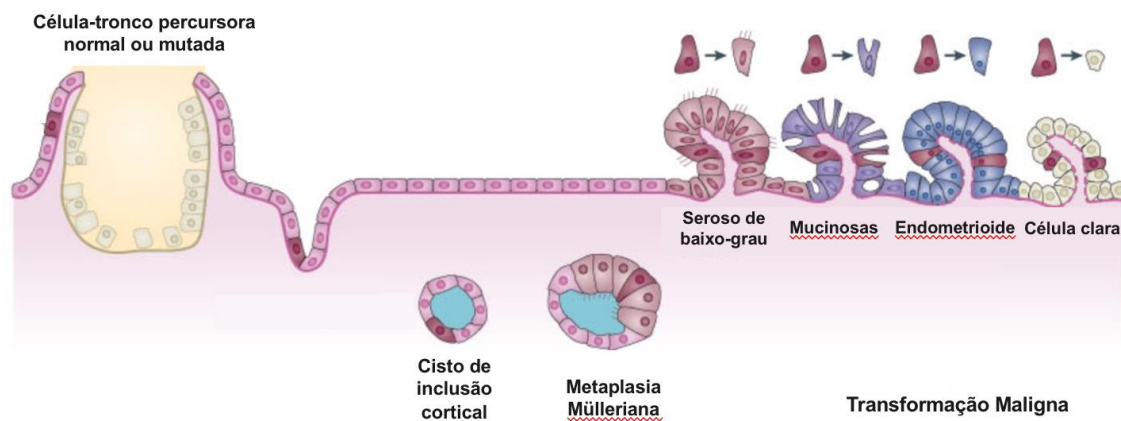
epitelial de ovário (CEO) é considerado o tipo de câncer ginecológico com o maior índice de mortalidade mundial mesmo possuindo uma taxa de incidência reduzida (figura 4) (Matz *et al.*, 2017; Andrade, 2018).



**Figura 4. Comparativo da Incidência e Mortalidade dos cânceres ginecológicos femininos, dados da Organização Mundial da Saúde.** Números referentes à incidência e à mortalidade. Fonte: <<https://gco.iarc.fr/>>, acesso em janeiro de 2020.

Os três principais tumores malignos encontrados nos ovários são aqueles originados a partir do epitélio superficial (95%), das células germinativas e do estroma do cordão sexual (5%) (Webb & Jordan, 2017). Os tumores ovarianos de células germinativas são derivados das células germinativas primitivas das gônadas embrionárias, comumente são diagnosticados na adolescência cujo principais sintomas são, dores abdominais, surgimento de massa palpável e elevados níveis de marcador tumoral sérico (Shaaban *et al.*, 2014; Decherney *et al.*, 2016). Os tumores do estroma do cordão sexual (TECs) são aqueles com menor incidência. Eles se originam a partir das células da matriz do ovário e, uma de suas principais características, é a capacidade de produzir hormônios.

O câncer epitelial de ovário (CEO), ou carcinoma de ovário, é o sétimo tipo de câncer mais incidente em mulheres, representando 3,6% das neoplasias femininas e 4,3% das mortes em mulheres e o oitavo com maior taxa de mortalidade, causando mais de 140.000 mortes por ano (La vecchia, 2017; INCA, 2018). Ele pode ser dividido em cinco principais tipos correspondentes aos seus respectivos graus histológicos: carcinomas serosos de alto grau (70%) e de baixo grau (<5%), endometriais (10%), células claras (10%) e mucinosas (3%), representando 95% dos novos casos diagnosticados (figura 5) (Stewart, 2017).



**Figura 5. Modelo proposto para o desenvolvimento do câncer epitelial de ovário (CEO) a partir de células-tronco.** A célula tronco de epitélio de superfície do ovário (ESO) é considerada célula de origem. Durante o período da ovulação contínua, uma célula tronco ESO normal ou mutada (rosa escuro) nas margens da ferida ovulatória fica retida no córtex do ovário formando um cisto de inclusão cortical. A célula-tronco retida é exposta a sinais parácrinos aberrantes do nicho estromal ativado (área alaranjada) e/ou sinais autócrinos dentro do lúmen cístico (área azulada). Com o tempo essa célula sofre metaplasia Mülleriana, seguida de transformação maligna. Dependendo da origem dos sinais de nicho e da aquisição das mutações, a célula-tronco ESO transformada pode se diferenciar em diferentes linhagens Müllerianas gerando diferentes tipos de célula CEO. (Adaptada de Ng & Barker, 2015).

Os diversos fatores genéticos como, histórico familiar de câncer de mama ou de ovário, mutações nos genes BRCA1 e BRCA 2, menopausa tardia, menarca precoce, endometriose e nuliparidade, são de extrema importância, tendo em vista que 5%-10% dos casos estão relacionados com a predisposição genética das pacientes (Stewart, 2014). Molecularmente, o CEO se caracteriza pela sua heterogeneidade, podendo ser dividido em dois tipos, I e II. Os tumores do tipo I possuem, frequentemente, mutações nos genes BRAF, KRAS e PTEN, já nos de tipo II, encontram-se os genes p53, BRCA1 e BRCA2 alterados (Jayson *et al.*, 2014). Um dos principais problemas encontrados para o tratamento dessa doença é o diagnóstico tardio, em que cerca de 70% dos tumores de ovário são diagnosticados em estágios avançados e apenas 30% dessas pacientes têm chances de sobrevivência de cinco anos (Alune *et al.*, 2015).

Diferenciado de muitos cânceres epiteliais, em que a carcinogênese é acompanhada por uma interrupção na diferenciação, o epitélio do ovário sofre metaplasia, ou seja, as células modificam seus tipos celulares adquirindo características histológicas de outros tipos de tecidos provenientes da mesma linhagem germinativa, como das tubas uterinas (tumor seroso), do endométrio (tumor mucinoso), o endocervix (endometrióide) ou até mesmo a vagina (CEO de célula transparente) (Ng & Barker, 2015).

O diagnóstico tardio, ocasionado pela falta de sintomas em estágios iniciais, é considerado um dos principais problemas relacionados a esse tipo de neoplasia, tendo em vista que até mesmo as pacientes que descobrem esse câncer nos primeiros estágios possuem apenas cerca de 45% de chance de sobrevivência, número que reduz para 15-25% quando diagnosticadas em estágios avançados (Webb & Jordan, 2017). Atualmente as metodologias mais utilizadas para a descoberta dessa doença é a dosagem de CA-125, marcador tumoral para câncer de ovário, e o exame de imagem ecografia endovaginal. Além da falha no diagnóstico precoce, a resistência a multifármacos também é um fator que afeta diretamente o tempo de sobrevida da paciente. A evolução da resistência à quimioterápicos nessa neoplasia acontece de forma gradual e tardia, onde as células tumorais passam a superexpressar transportadores de efluxo ATP-dependentes, sendo os mais comuns as P-glicoproteínas (Patch *et al.*, 2015; Chen *et al.*, 2016)

### 1.2 *Tratamentos convencionais para o câncer*

Anos de pesquisa forneceram diversas alternativas terapêuticas para o combate do câncer incluindo cirurgia, radioterapia, quimioterapia, terapia hormonal e terapia alvo, sendo determinada de acordo com o seu tipo, estágio e localização. Atualmente, sabe-se que as abordagens terapêuticas comumente aplicadas para o tratamento dessa doença, apesar de promoverem um bom prognóstico ao paciente, oferecem dano a tecidos saudáveis, erradicação incompleta das células tumorais, inúmeros efeitos adversos além de comprometer o sistema imunológico do paciente (Castano *et al.*, 2006; Gonzalez-Ângulo *et al.*, 2007; Pedraza-Arévalo *et al.*, 2017).

Em grande parte dos casos, a primeira metodologia realizada é a cirurgia visando a remoção total ou parcial do tumor primário para que posteriormente, se prossiga com as demais terapias. O processo cirúrgico realizado na remoção do tumor de mama é denominado mastectomia que, dependendo da massa tumoral, é necessário a remoção do órgão por completo, podendo levar a diminuição da autoestima com a mutilação do órgão (Howes *et al.*, 2016; Blackburn *et al.*, 2017; Boero *et al.*, 2019). A radioterapia considerada um tratamento primário, é baseada em radiações ionizantes. Sua eficiência se baseia em cálculos prévios da radiação e do tempo de exposição de acordo com o estágio e o tamanho tumoral. Apesar de se mostrar eficaz, essa terapia é comumente associada a quimioterapia e promove diversos efeitos nocivos a tecidos normais, ocasionando edemas, disfunção de junta ou até mesmo desencadear complicações cardíacas (Taylor & Kirby, 2015; Falco *et al.*, 2016).

A quimioterapia é a mais amplamente utilizada para o combate do câncer. Esse tipo de tratamento consiste na utilização de agentes quimioterápicos que visam atingir e eliminar preferencialmente células com elevadas taxas de proliferação. Como já demonstrado, a utilização dessas drogas não é completamente direcionada, ou seja, as células normais também são comprometidas, fato que leva ao desencadeamento de inúmeros efeitos adversos nos pacientes como, comprometimento nas funções cognitivas, morte de células sanguíneas, queda de cabelo (alopecia), alterações gastrointestinais, perda de apetite e em alguns casos a infertilidade (Galluzzi *et al.*, 2015; Madmoli *et al.*, 2018; Chang *et al.*, 2019; Widiанти *et al.*, 2019).

Outras formas de tratamento que estão sendo desenvolvidas para o tratamento do câncer são aquelas denominadas hormonioterapia e imunoterapia. A hormonioterapia, utilizada mais comumente no tratamento do câncer de mama e de próstata, consiste na utilização de medicamentos para bloquear a ação de hormônios específicos visando a inibição do crescimento de células malignas. E a imunoterapia, uma técnica que vem demonstrando resultados eficazes na estimulação do sistema imune para o tratamento de diversos tipos de câncer (Abbas *et al.*, 2015). Apesar dos crescentes avanços no desenvolvimento da hormonioterapia e da imunoterapia, os pacientes submetidos a essas técnicas ainda exibem inúmeros efeitos adversos ocasionados pela modificação do sistema hormonal e pela quebra da tolerância imunológica sistêmica, respectivamente (Lobo, 2017; Beral *et al.*, 2019; Goldberg, 2019).

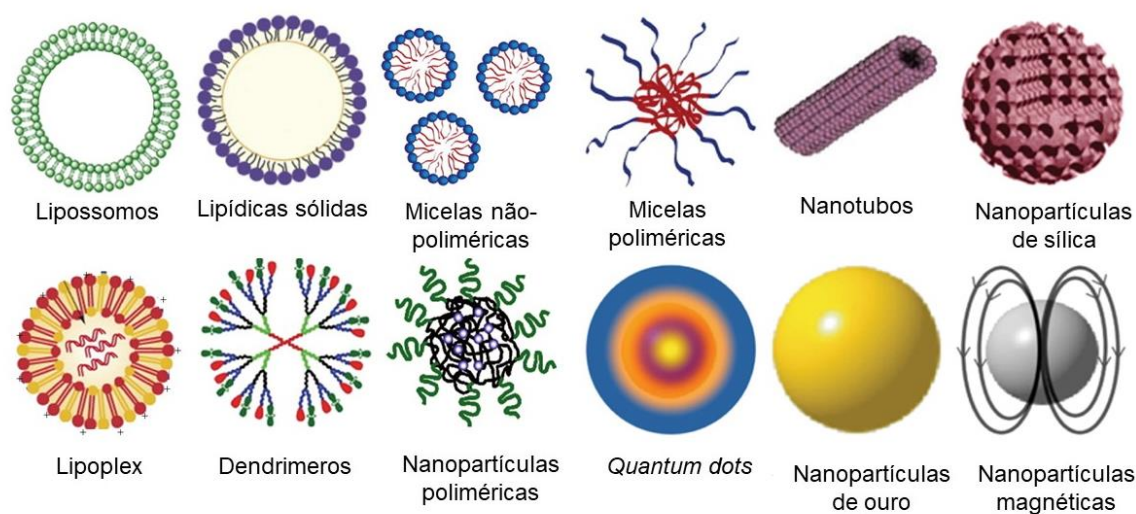
Observando os diversos problemas associados aos tratamentos atuais para o combate ao câncer, tem-se buscado por novas terapias que ofereçam uma natureza não invasiva e uma baixa toxicidade sistêmica, como a nanobiotecnologia.

### *1.3 Nanobiotecnologia e terapias alternativas*

A nanobiotecnologia, criação de materiais em escala nanométrica aplicados à biologia, vem sendo desenvolvida e ganhando destaque para o diagnóstico precoce e a entrega direcionada de fármacos (Jahangirian *et al.*, 2017; Goldberg, 2019). Os sistemas controlados de administração de medicamentos vêm sendo amplamente estudados ao longo das últimas décadas, resultando em mais de 32.000 artigos sobre os sistemas coloidais (Gorain *et al.*, 2016).

Os nanocarreadores possuem o tamanho de 1-1000 nm e podem ser compostos de diversos materiais e serem modificados para apresentarem características específicas (figura 6). A utilização de nanopartículas no câncer possui duas principais vertentes, o diagnóstico e/ou a terapia. Para o diagnóstico, as nanopartículas são sintetizadas para identificar as células

tumorais, podendo ser utilizadas como agentes de contraste que auxiliam no diagnósticos por diversas técnicas como ressonância magnética, tomografia computadorizada, ultrassom, tomografia por emissão de pósitrons (PET – *Positron Emission Tomography*) e tomografia computadorizada por emissão de fóton único (SPECT – *Single Photon Emission Computed Tomography*) (Mishra *et al.*, 2017). Dentre os nanossistemas que estão sendo desenvolvidos para o diagnóstico, estão as nanopartículas de ferro que atualmente são utilizadas para a detecção de tumores primários e metástases como agentes de contraste para a ressonância magnética (Li *et al.*, 2012).



**Figura 6. Diferentes tipos de nanopartículas (NPs).** Representação gráfica das NPs comumente utilizadas para aplicações biomédicas. Possuem entre 1-1000 nm e exibem grande potencial para a entrega de drogas. (Adaptada de Masserini, 2013).

Visando o tratamento, as nanopartículas podem ser projetadas para se associar à fármacos ou moléculas com o objetivo de agirem de modo direcionado e com segurança, além de aumentar a disponibilidade do agente. O aumento da biodisponibilidade de fármacos associado ao acúmulo do mesmo nos tumores, confere à nanobiotecnologia um aumento da eficácia terapêutica e uma redução da toxicidade sistêmica derivada dos diversos tratamentos (Werner *et al.*, 2012).

### 1.3.1 Nanopartículas magnéticas

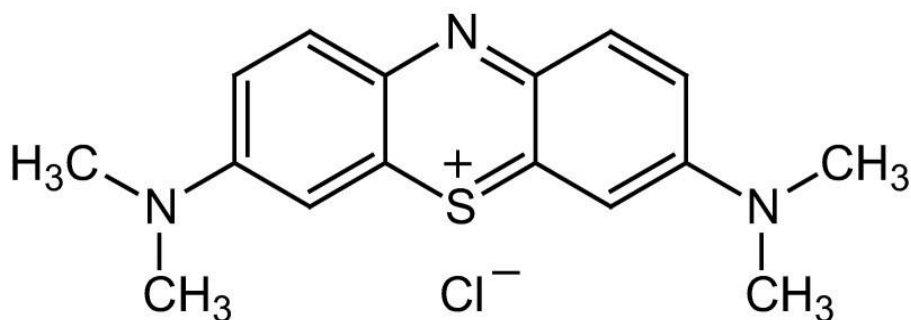
As nanopartículas magnéticas (NPM) podem ser constituídas de diferentes ferritas, como ferro, manganês, zinco, cobalto, sendo as mais comuns as compostas por óxidos de ferro magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) e maghemita ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ). Devido ao reduzido tamanho nanométrico, geralmente variando entre 10 e 20 nm, as nanopartículas de ferro exibem propriedades

superparamagnéticas, comportando-se como uma estrutura paramagnética que responde rapidamente a um campo magnético com magnetismo residual e coercividade quase nulas (Gupta & Gupta, 2005; Lu *et al.*, 2007). Os nanossistemas magnéticos podem estar ou não associados à diferentes fármacos (Duncan & Gaspar, 2011) e, uma vez funcionalizados, eles possuem um vasto campo de aplicação biomédica, sendo utilizados preferencialmente para o tratamento e diagnóstico do câncer (Carneiro *et al.*, 2013). As NPMs estão sendo amplamente utilizadas como carreadores de quimioterápicos, em terapias fotodinâmicas e em técnicas como a magnetohipertermia, terapia baseada na aplicação de um campo magnético alternado para a liberação de energia térmica gerando um aquecimento local e levando à morte das células malignas (Portilho *et al.*, 2010). Além da capacidade terapêutica, devido ao fato de possuírem um núcleo magnético, elas também estão sendo utilizadas no diagnóstico por ressonância magnética apresentando alta sensibilidade e resolução, evidenciando sua penetração ilimitada em tecidos biológicos (Yigit *et al.*, 2012). Uma das vantagens no desenvolvimento NPM diagnósticas é a maior biocompatibilidade e apresentação de um maior tempo de circulação que o agente de contraste comumente utilizado na clínica, o gadolínio (Kim *et al.*, 2011).

Observando tanto as funções terapêuticas como de diagnóstico, conclui-se que as NPMs são consideradas importantes promissores de teragnósticos, tendo em vista que se pode combinar o direcionamento magnético com o biológico para a detecção de tumores e células tumorais circulantes aumentando, assim, a detecção e destruição de micrometástases (Lim *et al.*, 2011; Cheng *et al.*, 2012; Lopes, 2012).

#### 1.4 Azul de metileno (AM)

O azul de metileno (figura 7) é um corante histológico pertencente à classe dos compostos fenotiazínio que possui forte absorção na banda larga de luz vermelha (550-700 nm,  $\lambda$  máximo 664 nm) e forte eficiência fotodinâmica. No ano de 2011, foi aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA) para administração oral e intravenosa no tratamento de metahemoglobinemia, uma desordem caracterizada pela presença de meta-hemoglobina no sangue em nível um pouco mais elevado do que o normal. Por não se ligar ao oxigênio, a meta-hemoglobina pode levar a uma injúria eritrocitária, anemia funcional, hipóxia, ácidos tecidual, cianose e morte (Hejtmancik *et al.*, 2002; Jaffey *et al.*, 2017).



**Figura 7. Estrutura molecular do azul de metileno.** Retirado de Moubarak *et al.*, 2018.

Esse agente tem sido amplamente utilizado para a foto-oxidação de moléculas naturais e sintéticas por meio de duas principais vias fotoquímicas, aquela em que a energia tripla é transferida para o oxigênio originando o oxigênio singlete ( $\text{^1O}_2$ ) e aquela em que a redução de agentes doam um elétron ao AM formando um radical semi-reduzido (Tardivo *et al.*, 2005).

Em altas concentrações, as moléculas de AM podem funcionar como agentes redutores e seus radicais semi-reduzidos podem agir como um superóxido e levar a formação de oxigênio seguida de outras espécies reativas de oxigênio (EROs), incluindo o radical hidroxila. Devido a sua elevada capacidade de geração de EROs e a sua baixa toxicidade, esse composto vem sendo estudado como um agente no tratamento de diversos tipos de câncer (DeRosa & Crutchley, 2002; Rozenholc *et al.*, 2019; Yaroslavsky *et al.*, 2019). Sabe-se que as reações induzidas pela excitação de AM causam diversos danos a biomoléculas como, ácidos nucleicos, proteínas e lipídeos (Tardivo *et al.*, 2005; Silman *et al.*, 2013; Wu *et al.*, 2018). Um dos obstáculos limitantes para a aplicação biomédica de AM é a dificuldade na preparação de formulações farmacêuticas que permitam sua administração sem perda da eficiência terapêutica. Tendo isso em vista, a funcionalização de nanossistemas com esse agente vem sendo estudada para possibilitar seu uso no tratamento de diversos tumores.

### 1.5 Espécies reativas de oxigênio (EROs) e câncer

As espécies reativas de oxigênio (EROs) são um grupo de moléculas (quadro 1), altamente reativas que podem induzir danos a diversas biomoléculas como, ácidos nucleicos, proteínas e lipídeos. Sua forma mais reativa e danosa é o oxigênio singlete ( $\text{^1O}_2$ ), uma forma excitada que não possui elétrons desemparelhados em sua última camada.

**Quadro 1. Espécies Reativas de Oxigênio.**

RADICAIS	NÃO RADICAIS
Superóxido $\cdot^-$	Peróxido de hidrogênio $H_2O_2$
Hidroxila $OH\cdot$	Ácido hipocloroso $HOCl$
Peroxila $LO_2$	Ozônio $O_3$
Alcoxila $LO\cdot$	Oxigênio <i>singlete</i> $^1O_2$
Hidroperoxila $HO_2$	Peróxidos lipídicos $LOOH$

Fonte: Halliwell, 1993.

A produção de EROs ocorre em consequência de diversos processos metabólicos nos organismos, suas principais fontes são: reações catalisadas por metais, produção pelos neutrófilos, eosinófilos e macrófagos durante a inflamação, subprodutos de mitocôndrias catalisados pelas reações de transporte de elétrons, entre outros (Halliwell & Gutteridge, 1993; Halliwell & Cross, 1994; Halliwell & Whiteman, 2004; Valko *et al.*, 2006). A síntese dessas espécies reativas é uma característica intrínseca do metabolismo aeróbico que, quando produzidas em larga escala, exercem efeitos danosos em biomoléculas podendo acarretar mutações genéticas, comprometimento de membranas, agregação de proteínas e até mesmo morte celular.

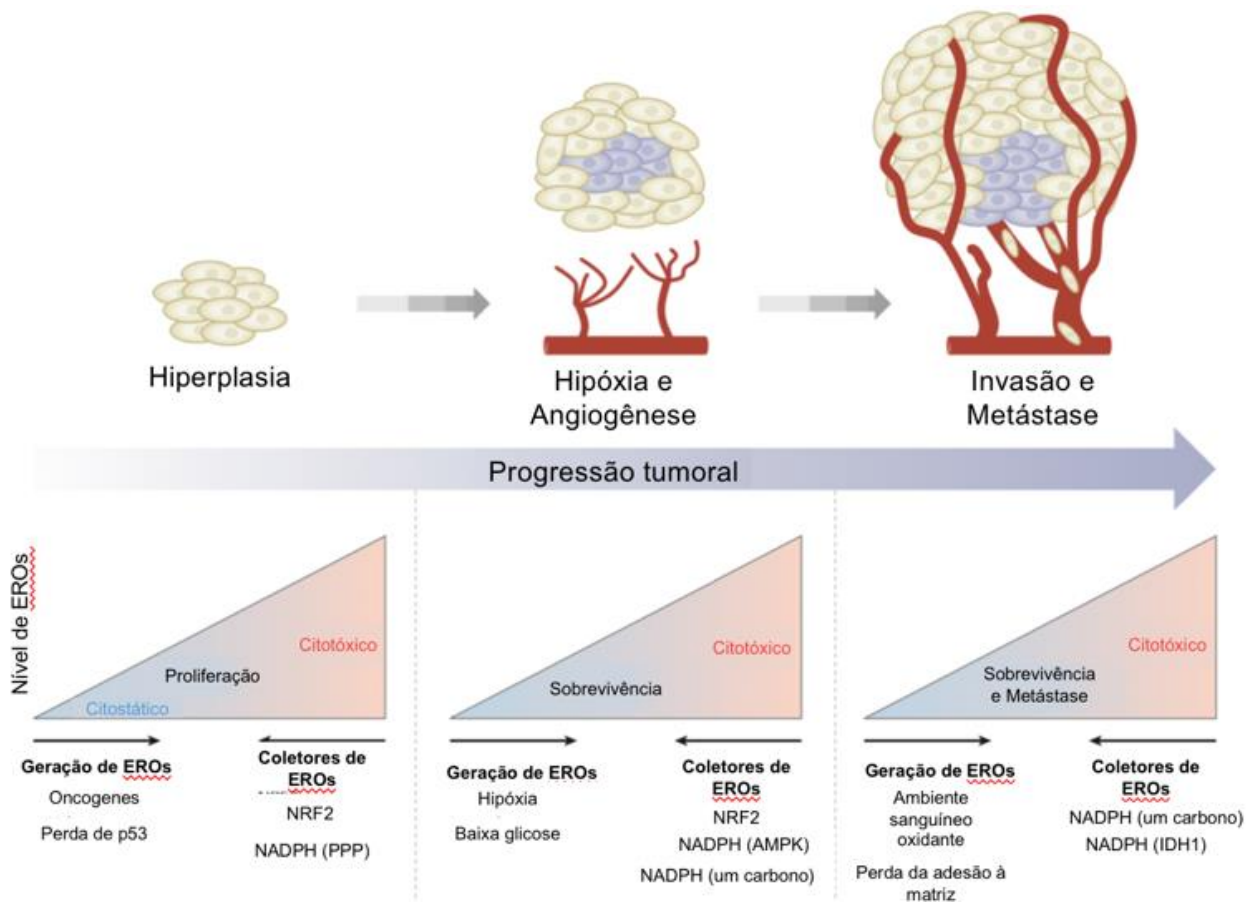
Diante do desequilíbrio entre os sistemas oxidantes, também foram averiguados e comprovados a existência de moléculas antioxidantes responsáveis por proteger os sistemas biológicos contra os efeitos danosos de processos ou trações que promovam a oxidação de macromoléculas ou estruturas celulares (Borut, 2011; Halliwell, 2012). As principais substâncias antioxidantes protegem os alvos celulares dos ataques dos radicais livres das seguintes formas: (I) removendo as espécies reativas de oxigênio utilizando enzimas catalíticas ou por reações químicas diretas, (II) minimizando a produção de radicais livres, (III) blindando os íons de metais requeridos para aumentar a reatividade das espécies, (IV) reparando os danos sofridos nos alvos celulares ou (V) destruindo ou reparando moléculas (Thomas, 2003; Vasconcelos *et al.*, 2007; Barbosa *et al.*, 2010).

Esses antioxidantes agem em três linhas de defesa principais, a de prevenção, proteção contra a formação de substâncias danosas; a interceptação de radicais livres e, por último a de reparo, remoção de danos da molécula de DNA e reconstituição de membranas celulares danificadas, sendo que essa ocorre quando as duas primeiras linhas descritas não forem completamente efetivas.



Estudos atuais mostram evidências do envolvimento de EROs na regulação de inúmeras vias de sinalização que controlam importantes processos biológicos como, migração, diferenciação, proliferação, apoptose, adaptação ao estresse e até mesmo expressão gênica. O estresse oxidativo ocasionado pela grande quantidade de EROs se associa com a iniciação, promoção e progressão da carcinogênese, vias PI3K/Akt/mTOR e MAPK/ERK, entretanto já se é comprovado que níveis elevados de EROs pode aumentar o estresse oxidativo e induz a morte de células cancerígenas (Reczek & Chandel, 2017). Para evitar o acúmulo de EROs e posterior morte celular decorrente do estresse, as células cancerígenas aumentam sua capacidade antioxidante e mantém esses níveis que permite a ativação de vias de sinalização pró-tumorigênica sem induzir a morte celular (Freitas, 2014).

Atualmente, inúmeras terapias com a finalidade de aumentar a produção de espécies reativas de oxigênio e ocasionar estresse oxidativo vem sendo estudadas como um possível tratamento para diversos tipos de câncer isso por que, quando os níveis de EROs estão muito altos, pode ocorrer a interrupção do ciclo celular, senescência e morte de células cancerígenas (Reczek & Chandel, 2017). Tendo em vista que as células cancerígenas apresentam níveis elevados de EROs em comparação com as células normais, elas se tornam mais vulneráveis à morte celular induzida por estresse oxidativo (figura 8).



**Figura 8. Progressão tumoral e espécies reativas de oxigênio (EROs).** A ativação do oncogene e a perda do supressor de tumor podem gerar EROs para promover a sinalização pró-proliferativa e hiperplasia. Para evitar o acúmulo de EROs, as células cancerígenas regulam positivamente o regulador antioxidante NRF2 (fator nuclear relacionado ao eritróide 2) e aumentam o fluxo através da via pentose fosfato (PPP) para gerar NADPH. À medida que o tumor sólido cresce, a acessibilidade da vasculatura torna-se limitada, desse modo, as regiões tumorais internas tornam-se hipóxicas, ou seja, possuem baixos níveis de oxigênio, e são privadas de glicose, aumentando ainda mais os níveis de EROs. Quando os níveis de glicose estão reduzidos, o PPP é o principal caminho para o aumento da produção de NADPH. Em vez disso, as células tumorais ativam as vias do AMPK e de um carbono para melhorar a produção de NADPH e manter a homeostase redox. Os níveis de EROs aumentam ainda mais quando as células cancerígenas desadere da matriz extracelular, invadem a membrana basal e entram no ambiente antioxidante sanguíneo. Para continuar o seu crescimento independente da ancoragem e as metástases à distância, as células aumentam sua capacidade antioxidante, aumentando a produção de NADPH por meio da carboxilação reductiva dependente de isocitrato desidrogenase 1 (IDH1) e das vias de metabolismo de um carbono. Ao perturbar a homeostase redox das células tumorais, a progressão do tumor e a metástase podem ser evitadas. (Adaptada de Reczek & Chandel, 2017).

## 2. Justificativa

Apesar dos avanços terapêuticos, o câncer ainda é um grupo de doenças com alta incidência mundial. Seu diagnóstico tardio e impreciso associado aos tratamentos convencionais utilizados para o combate dessas doenças ainda não foram capazes de reduzir seus prejuízos socioeconômicos. Dentre os cânceres que acometem as mulheres, destacam-se o câncer de mama, segundo tipo mais incidente, e o de ovário, que, apesar de não apresentar uma alta incidência, sua letalidade é a mais elevada quando comparada aos demais tipos de câncer do sistema genital feminino. Atualmente, as estratégias terapêuticas utilizadas no tratamento desses tumores apresentam reações adversas comprometendo a saúde e a qualidade de vida do paciente, além da possibilidade de aparecimento de células tumorais resistentes.

Nesse contexto, a busca por novos agentes diagnósticos que possam levar a uma detecção precoce e precisa, e por novas alternativas terapêuticas visando um melhor direcionamento do fármaco e diminuição da toxicidade sistêmica tem sido amplamente estudado pela comunidade científica. Tendo em vista o desenvolvimento de terapias mais eficazes para o combate ao câncer, o presente trabalho sugere a associação de azul de metileno à nanopartículas de maghemita para o tratamento de câncer de mama e de ovário *in vitro*.

### **3. Objetivos**

#### *3.1 Objetivo geral*

Este trabalho tem como objetivo avaliar o potencial anti-tumoral de nanopartículas de maghemita associada ao azul de metileno em diferentes células de carcinoma mamário humano (MDA-MB-231 e T-47D) e de ovário (A2780) *in vitro*.

#### *3.2 Objetivos específicos*

- Síntese e caracterização coloidais e morfológicas das nanopartículas de maghemita associadas ao azul de metileno (MAGCIT-AM);
- Avaliação da viabilidade celular, do tipo de morte celular, e da produção de espécies reativas de oxigênio pelas células tumorais e normais (HUVEC e HNTMC) após tratamento com MAGCIT-AM;
- Avaliar a internalização e as alterações morfológicas nas células estudadas após tratamento com MAGCIT-AM;
- Investigar a capacidade de formação de colônias nas linhagens tumorais após tratamento com MAGCIT-AM;
- Verificar o perfil de endocitose de MAGCIT-AM e a alteração do ciclo celular em células tumorais de carcinoma de ovário e de mama;

## 4. Materiais e Métodos

### 4.1 Reagentes

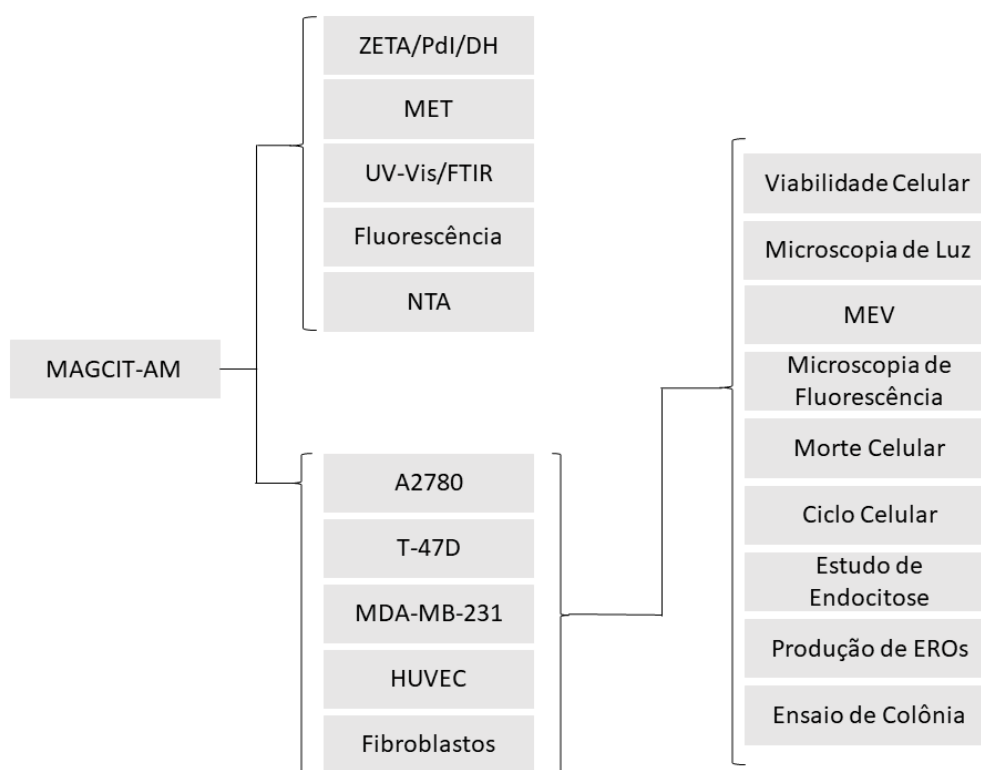
Os reagentes utilizados para a realização dos experimentos desse projeto estão listados no quadro 2 abaixo.

**Quadro 2. Reagentes utilizados para a realização dos experimentos**

<b>Fabricante</b>	<b>Materiais</b>
Dinâmica, Brasil	Formaldeído P.A. – ACS; Acetona P.A. - ACS
GE HealthCare, UK	Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagent
GIBCO,EUA	DMEM; RPMI; DMEM-F12; Soro Fetal Bovino (SFB); Tripsina 0,25% em EDTA; Solução Antibiótica (penicilina e estreptomicina)
Hatfield PA, EUA	Azul de metileno
Invitrogen, EUA	Alamar Blue; Anexina-V cj FITC
Laborclin, Brasil	Tampão Fosfato Salino (PBS)
Molecular Probes, EUA	Iodeto de Propídeo, Prolong Gold
Polysciences, EUA	Tetróxido de ósmio; Acetato de uranila
Roche, Suíça	Complete Tablets, Mini EDTA-Free
Sigma-Aldrich, EUA	Anticorpo anti-clatrina; Anticorpo anti-mouse cj. Alexa 546; Anticorpo $\alpha$ -tubulina, DCFH-DA; Bicinchoninic Acid Protein Assay Kit, DAPI; RNase A solution; Formvar solution
Vetec, Brasil	Paraformaldeído 37%

### 4.2 Delineamento experimental

Os experimentos realizados nesse trabalho estão esquematizados abaixo (figura 9).



**Figura 9. Diagrama do delineamento experimental desenvolvido no trabalho**

#### *4.3 Síntese das nanopartículas de maghemita associadas ao azul de metileno (MAGCIT-AM)*

A síntese das nanopartículas de maghemita foi realizada no Laboratório de Polímeros e Nanomateriais (LabPolN) do Instituto de Química da Universidade de Brasília, com a supervisão do Prof. Dr. Leonardo Giordano Paterno por meio da coprecipitação hidrotérmica em meio alcalino a 100°C (Filomeno, 2015). Para o equilíbrio das cargas superficiais, as nanopartículas foram peptizadas em meio ácido aquoso ajustando-se o pH e a força iônica com uma solução de HNO<sub>3</sub>. A funcionalização da superfície da partícula com a solução de ácido cítrico foi realizada por meio da agregação da solução de ácido cítrico a 0,05 M à solução de nanopartículas de maghemita a 90 mg/L. Posteriormente, a solução foi deixada em ultrassom durante 1 h e em diálise em água deionizada por 72 h com troca de água a cada 24 h. Posteriormente, a solução foi sonicada por 10 min a amplitude de 25% e o pH foi ajustado para o valor de 6.6 por meio da adição de solução de NaOH a 1 M. A adição do azul de metileno (AM) às nanopartículas funcionalizadas com o citrato ocorreu por meio da junção, em agitação magnética constante, da solução de AM a 1 g/L às nanopartículas.

#### *4.4 Caracterização e Estabilidade Termodinâmica de MAGCIT-AM*

As nanopartículas de maghemita associadas ao azul de metileno foram caracterizadas em termos de seus diâmetros hidrodinâmicos (DH), potencial zeta e índices de polidispersão (PdI) em espalhamento de luz dinâmica (DLS) utilizando Zetasizer® NanoZS (Malvern Instruments Malvern, UK) em que as medições foram realizadas a 25 °C e ângulo de dispersão fixo de 90°, após a diluição da solução em água ultrapura. Para a caracterização do tamanho, da distribuição, da intensidade e da concentração das nanopartículas foi utilizado o equipamento NanoSight LM20 (NanoSight, Reino Unido) com o software NTA 2.0 Analytical (NanoSight, Reino Unido). Todas as medições foram realizadas no Laboratório de Biomembranas, Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) em parceria com a Profa. Dra. Eneida de Paula.

#### *4.5 Espectroscopia do Ultravioleta (UV)-Visível e Espectroscopia do Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)*

Para a confirmação da associação entre o AM ao núcleo magnético, as amostras de AM, MAGCIT e MAGCIT-AM foram diluídas em água ultrapura e analisadas por espectroscopia de absorção de UV-Vis em espectrofotômetro UV-Vis Cary 5000 UV-Vis-NIR (Agilent Technologies). Foram analisados os comprimentos de onda entre 200 – 800 nm. O estudo dos grupos funcionais presentes na amostra, assim como a confirmação de associação entre AM e MAGCIT foi realizado a partir de espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR). Os resultados foram adquiridos em microscópio de infravermelho de transformada de Fourier Continuum FTIR 6700 (Thermo Fisher, EUA) em modo de Brometo de Potássio (KBr). Ambas as análises foram realizadas no Laboratório Multiusuário do Instituto de Química da Universidade de Brasília-UnB, Brasília, DF.

#### *4.6 Espectroscopia de Fluorescência*

Os espectros de fluorescência de MAGCIT-AM foram adquiridos a partir de soluções aquosas das amostras MAGCIT, AM livre e MAGCIT-AM. As análises foram realizadas em cubeta de quartzo com caminho óptico de 1 cm a partir do espectrômetro Lumina Fluorescence (Thermo Scientific) disponível no Laboratório Multiusuário do Instituto de Química da Universidade de Brasília-UnB, Brasília, DF.

#### *4.7 Manutenção das linhagens celulares*

Para a realização dos ensaios biológicos *in vitro* foram selecionadas duas linhagens de carcinoma mamário, MDA-MB-231 (triplo negativa) e T-47D (positiva para receptores de

estrógeno e progesterona); uma linhagem de câncer de ovário, A2780 e uma não tumoral HUVEC (célula isolada do epitélio de cordão umbilical estabelecida em laboratório). As linhagens celulares foram adquiridas no Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ, RJ). As células de cultura primária de células mesenquimais não tumorais humanas de polpa dentária (HNTMC) foram obtidas a partir de cultivo primário de polpa dentária de voluntários saudáveis no Laboratório de Microscopia Eletrônica da Universidade de Brasília – UnB sob aprovação do Comitê de Ética Humana da Universidade de Brasília (UnBDOC 104934/2008).

As células HNTMC, HUVEC, A2780 e T-47D foram cultivadas em meio Dubelcco's Modified Eagle Medium (DMEM), DMEM-F12 e RPMI, respectivamente. Todos os meios foram suplementados com 10% de soro fetal bovino (SFB) e antibiótico (100 µg/mL penicilina e 100 µg/mL streptomicina) a 1%. As células foram mantidas em incubadora a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> e umidade de 80%. A linhagem MDA-MB-231 foi cultivada em meio L-15 acrescido de 10% de SFB e 1% de antibiótico e mantidas em incubadora a 37 °C e umidade de 80%.

#### 4.8 *Ensaio de Viabilidade Celular*

A viabilidade das células normais e tumorais humanas tratadas com nanopartículas de maghemita associadas ao azul de metileno foi determinada pelo ensaio padrão por Alamar Blue (alamarBlue™ Cell Viability Reagent, Invitrogen™). Células plaqueadas em placas de 96 poços e tratadas com diferentes concentrações de nanopartículas de maghemita associadas ao azul de metileno (MAGCIT-AM) (3,12; 1,56; 0,78 e 0,39 µg/mL) e seus respectivos controles, AM (5,0; 2,5; 1,25 e 0,625 µg/mL) e MAGCIT (3,894 µg/mL) por diferentes tempos (24, 48 e 72 h), foram incubadas com o reagente alamarBlue™ durante 2 h. Posteriormente, as células foram levadas ao espectrofotômetro SpectraMax M5 (Molecular Devices, EUA) e lidas por fluorescência ( $\lambda_{ex}$ . 560;  $\lambda_{em}$ . 590). O ensaio de Alamar Blue foi realizado em triplicata para cada concentração utilizada. Os experimentos ocorreram em série de três repetições.

#### 4.9 *Ensaio de Formação de Colônia e Recuperação Celular*

Com a finalidade de avaliar a capacidade de formação de colônias e recuperação celular após o tratamento com MAGCIT-AM, as células T-47D, A2780, HUVEC, MDA-MB-231 e HNTMC foram plaqueadas em placas de 24 poços (1x10<sup>5</sup> células/poço) e, após sua adesão, foram tratadas com as nanopartículas MAGCIT-AM (0,78 µg/mL de AM) por 48 horas. Passado esse tempo, as células sobreviventes foram lavadas com PBS 1X, contadas em Câmara de Neubauer e replaqueadas em placas de 6 poços (1x10<sup>3</sup> células/poço) com meio RPMI. As células ficaram em cultivo por 5 dias com renovação de meio de 2 em 2 dias. As colônias



formadas foram fixadas em dois banhos de metanol puro e coradas com cristal violeta 0,5% em água destilada. As imagens foram obtidas pelo estereoscópio LEICA M205 C (Leica – Alemanha) acoplado à câmera LEICA DFC295 (Leica – Alemanha) no aumento de 8x.

#### *4.10 Análise da ultraestrutura de MAGCIT-AM por microscopia eletrônica de transmissão*

A ultraestrutura de MAGCIT-AM foi analisada em microscópio eletrônico de transmissão (MET) JEOL JEM-1011 (JEOL, Japan). As nanopartículas foram diluídas em água ultrapura e, após esse processo, 5 µL da solução foram adicionadas nas telas de cobre de 300 “*mesh*” cobertas com o filme Formvar® 0,4%. As amostras foram analisadas em MET a 80 kV e processadas em câmera UltraScan® conectada ao programa Digital Micrograph 3.6.5® (Gatan, USA).

#### *4.11 Caracterização da morte celular induzida por MAGCIT-AM*

A análise do tipo de morte celular induzida pelo tratamento de MAGCIT-AM foi realizada pela marcação das células tumorais (MDA-MB-231, T-47D e A2780) e das células controle (HUVEC e HNTMC) com Anexina V-FITC e Iodeto de Propídio (PI). Para o ensaio  $5 \times 10^5$  células foram plaqueadas em placas de 12 poços e, após 24 h, as linhagens foram incubadas com o tratamento MAGCIT-AM (0,78 µg/mL de AM) ou com o volume equivalente de meio de cultivo (controle). Os tratamentos foram deixados durante 48 h e, 30 min antes de completar o tempo esperado, o grupo controle de apoptose foi tratado com 10 mM de peróxido de hidrogênio. Posteriormente, as células aderentes e em solução foram recolhidas e centrifugadas a 300g por 3 min para a retirada do meio. Os pellets obtidos foram lavados com PBS e, após esse processo, ressuspensos em 100 µL de tampão de ligação de anexina V (10 mM HEPES, 140 mM NaCl e 2,5 mM de CaCl<sub>2</sub> – pH 7,4). O grupo controle de necrose foi aquecido à 100°C por 10 min. Foram adicionados 3 µL de anexina-V nas amostras que ficaram incubadas com a solução por 15 min à temperatura ambiente e protegidas da luz. Passado esse período, 400 µL do tampão de ligação da Anexina V foram adicionados, seguido da adição de 500 µL da solução de PI (PBS e Iodeto de Propídeo, concentração final de 2 µg/mL). As células foram incubadas por mais 5 min no gelo, lavadas com PBS e, a partir desse momento, as amostras foram analisadas pelo citômetro FACSCalibur (Becton Dickinson), canais FL-2 e FL-1, com o auxílio do *software CellQuest-Pro* para análise dos dados. O estudo foi composto por 3 experimentos independentes realizados em triplicata e a quantificação do tipo de morte celular foi determinada utilizando-se a plataforma do *software FlowJo*.

#### 4.12 *Análise do ciclo celular por marcação com iodeto de propídio (PI)*

A fim de quantificar as populações celulares que estavam em G0/G1 (2N de DNA), em G2/M (4N de DNA) e em fase S (quantidade intermediária de DNA), foi realizado o ensaio de marcação de DNA com o PI e análise em citômetro de fluxo. As células ( $3 \times 10^5$ ) foram plaqueadas em placas de 12 poços, após 24 h, foram tratadas com meio de cultivo (controle) ou com MAGCIT-AM. Passadas 24 h, as células foram desaderidas e centrifugadas à 300 g por 3 min para a retirada do meio de cultura. O pellet foi lavado em 500  $\mu$ L de PBS 1X, 4,5 mL de etanol 70% e mantido por 2 h no gelo para fixação. Posteriormente, as células foram lavadas com PBS e incubadas em solução de PI (0,1% de triton X-100, 10  $\mu$ g/mL de PI e 100  $\mu$ g/mL de RNase livre de DNase) diluído em PBS por 10 min a temperatura ambiente. Após a incubação, as amostras passaram por um processo de centrifugação e foram ressuspensas em PBS 1X e 8000 eventos de cada amostra foram analisados por citometria de fluxo. O conteúdo de DNA das células nas diferentes fases do ciclo foi determinado pela plataforma de ciclo celular do *software FlowJo*. Foram realizados três experimentos independentes.

#### 4.13 *Análise da morfologia celular das linhagens por microscopia eletrônica de varredura*

A fim de analisar as diferenças morfológicas presentes na superfície celular em decorrência do tratamento com MAGCIT-AM, as células tumorais e não tumorais foram analisadas em microscópio eletrônico de varredura (MEV). (JEOL, Japan). Inicialmente,  $10^4$  células foram plaqueadas em lamínulas 18x18 mm colocadas em placas de 6 poços. Após 48 h de tratamento, ocorreu descarte do meio de cultivo e do tratamento e as células passaram pelo processo de lavagem com PBS 1X, e foram fixadas com fixador Karnovsky (2% de paraformaldeído, 2% de glutaraldeído em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7,2) overnight à 4 °C. Posteriormente ao descarte do fixador, as linhagens foram lavadas com tampão cacodilato de sódio 0,1 M. As células foram pós-fixadas, por 30 min, com tetróxido de ósmio 2% e lavadas com água destilada. As células passaram por uma desidratação seriada com concentrações crescentes de acetona (30%-100%), pela secagem ao ponto crítico CPD 030 (BALZERS, EUA) e metalização SCD 500 (LEICA, Germany) para serem analisada no Microscópio Eletrônico de Varredura JSM-7001F (JEOL, Japan). Além da análise morfológica, as amostras passaram pelo processo de análise de constituição elementar por EDS utilizando o mesmo equipamento. Foi realizada a técnica de Point&Shoot (NSS Spectral Imaging) sendo observado a quantidade relativa do elemento ferro (Fe).

#### *4.14 Análise da morfologia celular por microscopia de luz*

Para o estudo das alterações morfológicas das células tumorais (MDA-MB-231, T-47D e A780) e não tumorais (HUVEC e HNTMC) foram plaqueadas  $1 \times 10^5$  células de cada linhagem em placas de 12 poços. Após 24 h foi adicionado o tratamento MAGCIT-AM (0,78  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de AM) ou somente o meio de cultura a qual permaneceu incubada durante 48 h. As imagens foram obtidas com o auxílio do software AxioVision 100 no Microscópio de luz Axiovert (Zeiss, Alemanha) do Laboratório de Baculovírus, Universidade de Brasília, UnB.

#### *4.15 Análise qualitativa da produção de EROs por Microscopia de Fluorescência*

O estudo qualitativo da produção de espécies reativas de oxigênio foi realizado em Microscópio de Fluorescência Axiphot (Zeiss, Germany). As células ( $1 \times 10^4$ ) foram plaqueadas em placas de 12 poços sob lamínulas redondas previamente esterilizadas. Após 24 h, foi adicionado o tratamento MAGCIT-AM (0,78  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de AM), em determinados grupos, que foi mantido por 6 h. O reagente fluorescente utilizado para a visualização de EROs foi o 2',7'-Dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) a 0,01  $\text{g}/\text{mL}$  incubado por 30 min nos poços de interesse. Posteriormente, as lamínulas foram lavadas com PBS 1X e fixadas com formaldeído 3,7% por 15 min em agitação constante. Para a marcação do DNA celular, as lamínulas foram incubadas com DAPI 300 nM por 7 min em temperatura ambiente. Por fim, as lamínulas foram lavadas com PBS, novamente, e montadas com Prolong Gold Antifade.

#### *4.16 Quantificação da produção de EROs por Espectrofotometria e Citometria de fluxo*

Para a quantificação da produção de EROs antes e após tratamento, foram realizados dois experimentos, sendo um em Espectrofotômetro SpectraMax M5 (Molecular Devices, EUA) e outro em citômetro de fluxo FACSCalibur (BD, EUA). Em ambos os experimentos, foram plaqueadas  $1 \times 10^4$  células que, posteriormente, foram tratadas com MAGCIT-AM (0,78  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de AM). Após o tempo de tratamento de 6 h, as células foram incubadas com DCFH-DA por 30 min e levadas para a espectrofotometria a serem analisados pelo programa SoftMax Pro 6.2. Já para o estudo em citômetro de fluxo, as linhagens passaram pelos processos de desaderência, lavagem em PBS 1X e, somente após essas etapas, foram levadas ao equipamento para análise.

#### *4.17 Estudo de endocitose*

Para a análise das vias de endocitose que participavam da internalização celular de MAGCIT-AM, as células ( $1 \times 10^4$ ) foram semeadas em placas de 12 poços. Após 24 h, cada poço foi individualmente incubado com diferentes inibidores sendo, um de pinocitose (citocalasina D), dois de caveolina (Nistatina e Filipina) e um de clatrina (Óxido de Fenilarsina), mantidos nas células durante 30 min antes do tratamento. A inibição da via de endocitose mediada por ATP foi realizada através da incubação das amostras a 4 °C por 30 min. Passado o tempo necessário, realizou-se os tratamentos, MAGCIT-AM (0,78 µg/mL de AM) ou meio de cultivo somente, permanecendo durante 6 h. Posteriormente, as células foram desaderidas, lavadas com PBS 1X e levadas ao citômetro de fluxo para aquisição de dados pelo canal FL-4.

#### *4.18 Análise estatística*

Os dados obtidos foram analisados em programa Graphpad Prism 5.0 submetidos a testes específicos com confiança estatística de 95%. Foram utilizados os testes de Anova One Way, com pós testes Turkey e Bonferroni.

## 5. Resultados

### 5.1 Obtenção e caracterização de MAGCIT-AM

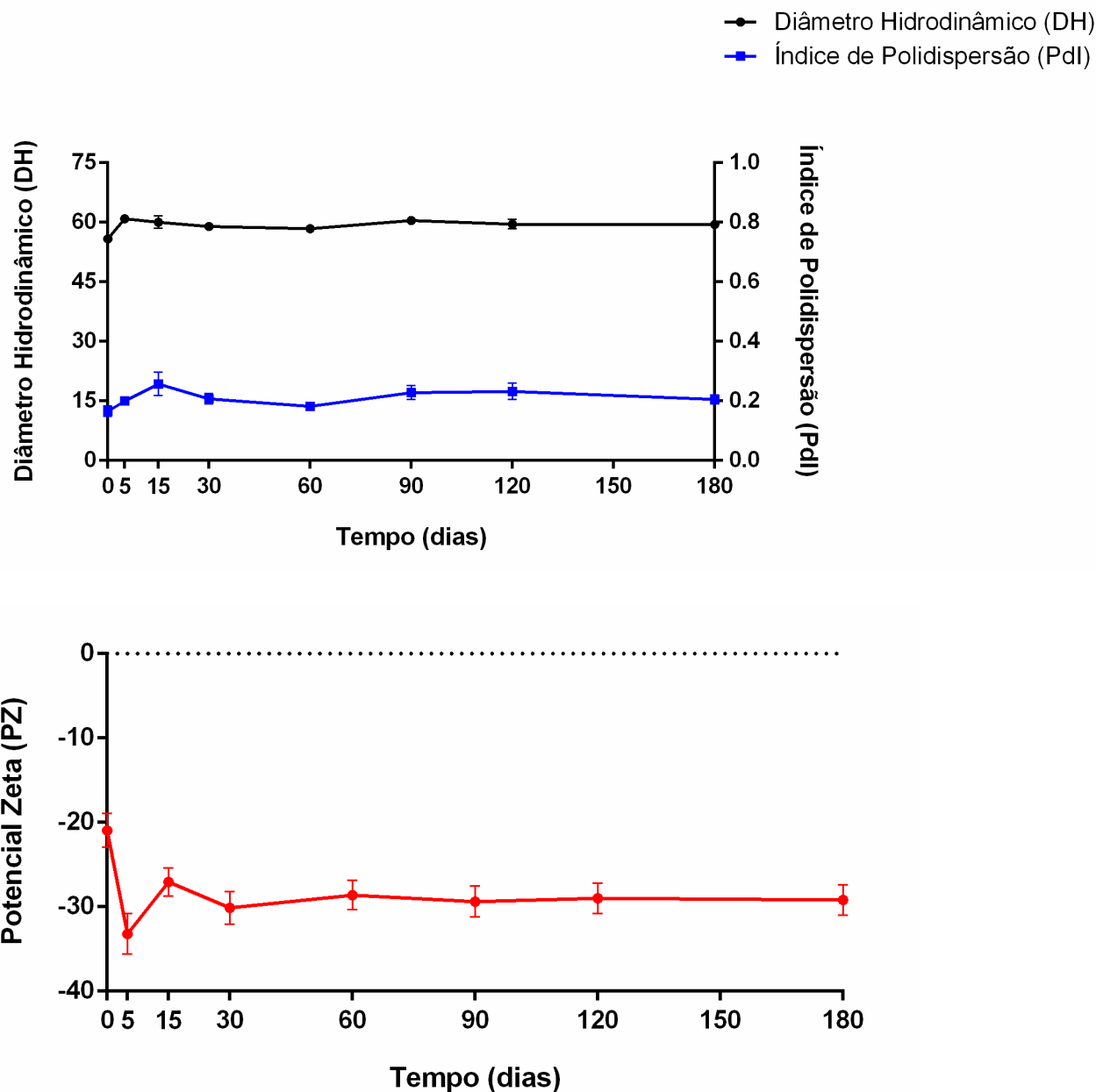
A solução de MAGCIT-AM obtida após a síntese apresentou uma coloração marrom-azulada translúcida, a qual era modificada à medida que se adicionava quantidades crescentes de azul de metileno (1 g/L). O nanossistema, apresentou o potencial zeta (PZ) decrescente e diâmetros hidrodinâmicos (DH) crescentes conforme se aumentava a concentração de azul de metileno (tabela 1). Para o desenvolvimento do trabalho foi escolhida a solução numerada como 3, que apresentou diâmetro hidrodinâmico de  $60,93 \pm 0,36$  nm e índice de polidispersão de  $0,199 \pm 0,009$ , indicando a presença de uma população de partículas monodispersas. O potencial Zeta da solução escolhida foi de  $-20,9 \pm 2,00$  mV.

**Tabela 1. Propriedades de MAGCIT-AM**

Amostras	DH médio (nm)	PdI	PZ (mV)	
<b>MAG-CIT (pH 6,6)</b>	$54,69 \pm 0,08$	$0,185 \pm 0,014$	$-31,9 \pm 1,58$	
<b>Solução 1 (11 µg/mL)</b>	$54,02 \pm 0,70$	$0,243 \pm 0,021$	$-30,5 \pm 2,69$	
<b>MAGCIT-</b>	<b>Solução 2 (20 µg/mL)</b>	$63,06 \pm 0,55$	$0,211 \pm 0,027$	$-31,0 \pm 1,72$
<b>AM</b>	<b>Solução 3 (31 µg/mL)</b>	$60,93 \pm 0,36$	$0,199 \pm 0,009$	$-20,9 \pm 2,00$
	<b>Solução 4 (53 µg/mL)</b>	$135,00 \pm 1,32$	$0,166 \pm 0,010$	$-26,5 \pm 1,55$

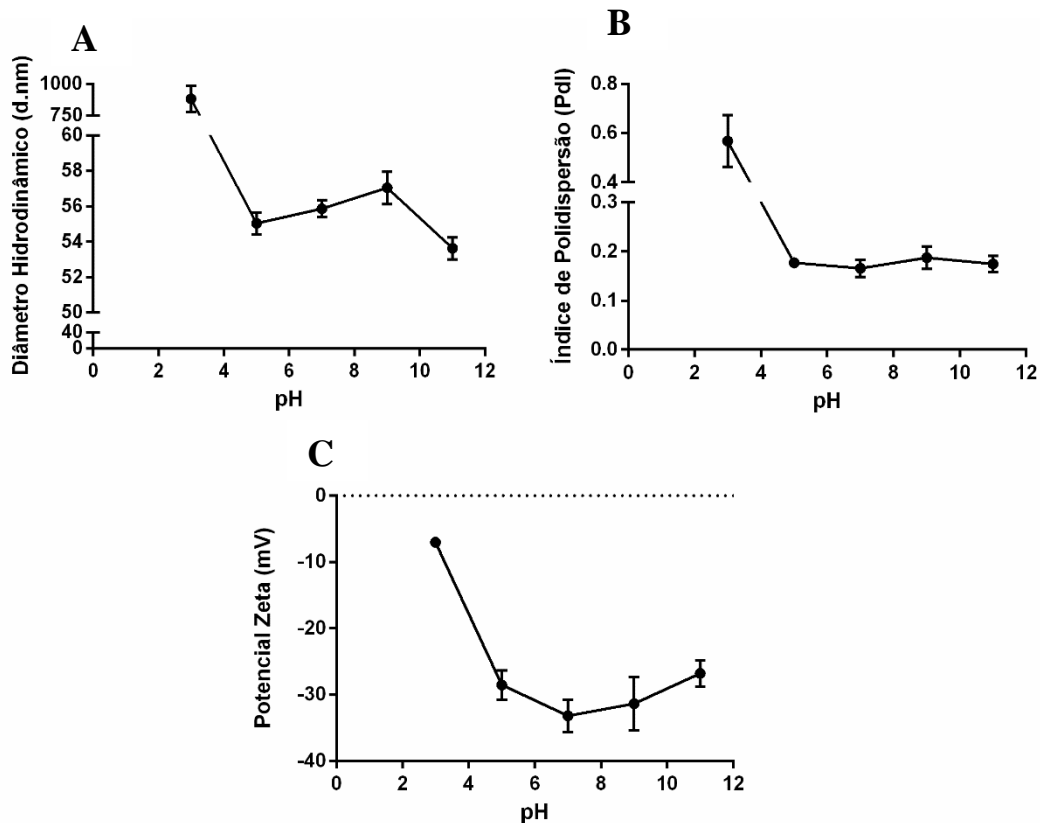
MAGCIT = solução de nanopartículas de maghemita associada ao citrato, MAGCIT-AM = nanopartículas de maghemita associadas ao citrato e ao azul de metileno, DH = diâmetro hidrodinâmico, PdI = índice de polidispersão, PZ = potencial zeta

Ressalta-se ainda que essas variáveis se mantiveram estáveis com pequenas alterações não significativas entre os tempos analisados (figura 10). Com os ensaios de NTA, foi possível observar que a concentração de nanopartículas na solução sintetizada é de  $1,53 \times 10^{13}$  partículas/mL.



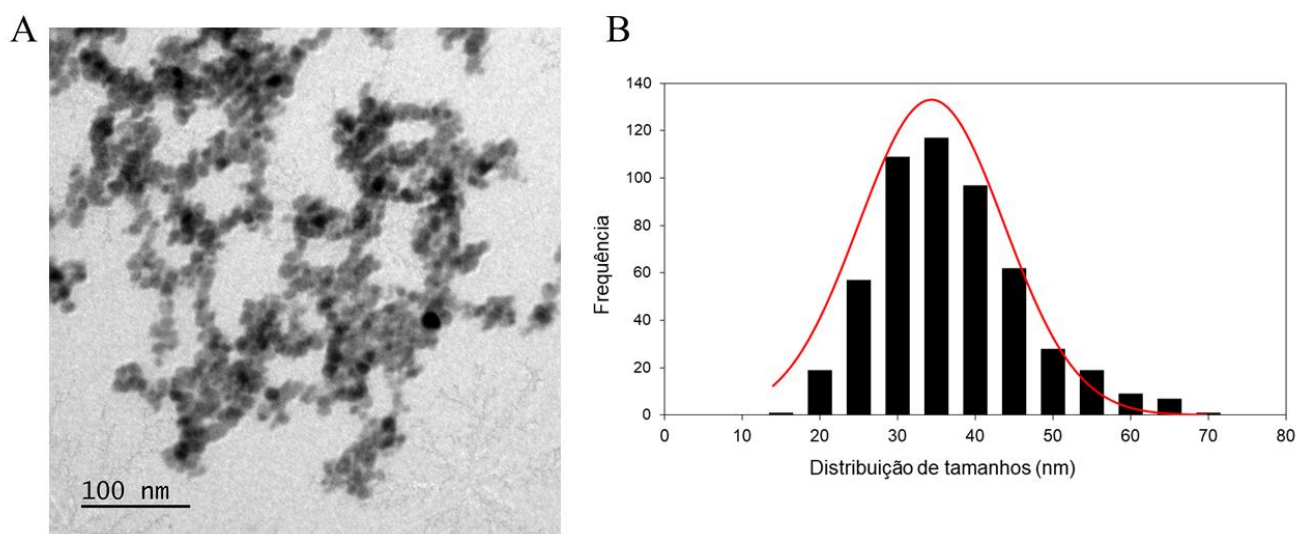
**Figura 10. Estabilidade coloidal de MAGCIT-AM no período de 180 dias. (A) Diâmetro Hidrodinâmico (DH) e Índice de Polidispersão (PdI) (B) Potencial Zeta (PZ).**

Com a finalidade de estudar as alterações dos parâmetros físico-químicos de MAGCIT-AM, a solução foi submetida a diferentes valores graduais de pH (3, 5, 7, 9 e 11) e, novamente foram obtidos os valores de DH, PdI e PZ. Na figura 11 observa-se que a partícula se mantém estável em pHs superiores a 5, tendo uma pequena variação em seu PZ. Em pH ácido, as partículas aglomeram, aumentando o DH, e o PZ adquire valores mais positivos.



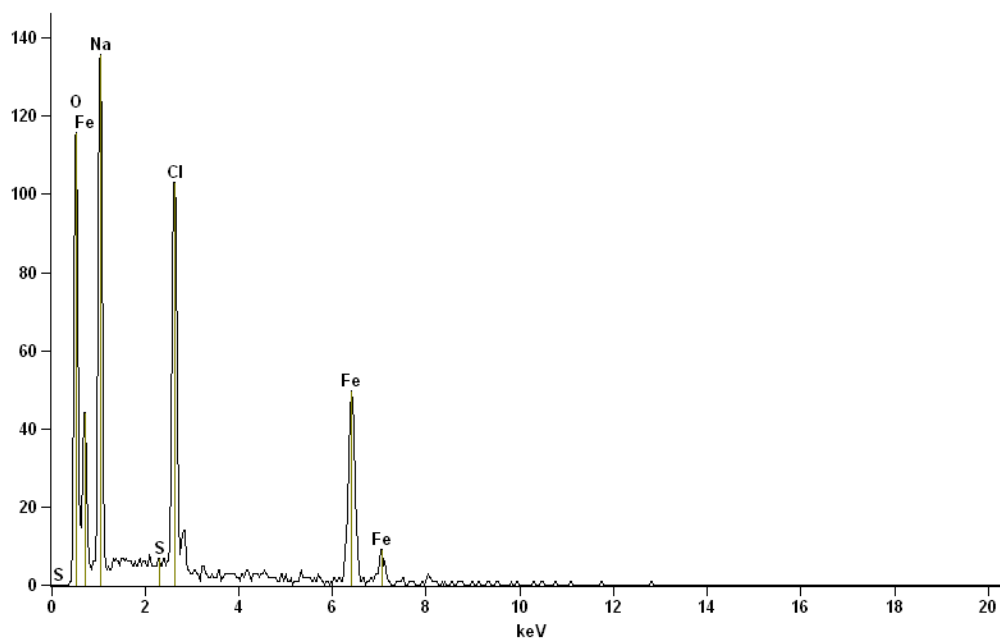
**Figura 11** Variação do potencial zeta, diâmetro hidrodinâmico e índice de polidispersão em valores graduais de pH. A amostra MAGCIT-AM foi diluída (1:100) em soluções com valores de pH 3, 5, 7, 9 e 11. (A) variação do DH, (B) variação do PdI, (C) variação do PZ, todos ao longo do gradiente de pH.

A figura 12, elucidada a ultraestrutura do nanossistema desenvolvido, MAGCIT-AM, que apresentou o formato esférico e tamanho médio de aproximadamente 34 nm obtido a partir do cálculo do perímetro de um grupamento de nanopartículas de diferentes micrografias, totalizando 500 partículas, correspondendo a 26 nm de diferença das análises de diâmetro hidrodinâmico obtidas por Zetasizer® Nano ZS.



**Figura 12. Ultraestrutura e tamanho médio de MAGCIT-AM por meio de microscopia eletrônica de transmissão.** (A) O nanossistema sintetizado exibe um formato arredondado e (B) um histograma de distribuição com tamanho médio de 34 nm. Barra de escala: 100 nm.

A composição elementar química qualitativa de MAGCIT-AM, foi elucidada através da análise de EDS/EDX (espectroscopia de raios X por dispersão em energia), podendo ser detectados os elementos S, Fe, Na, Cl e O (figura 13).

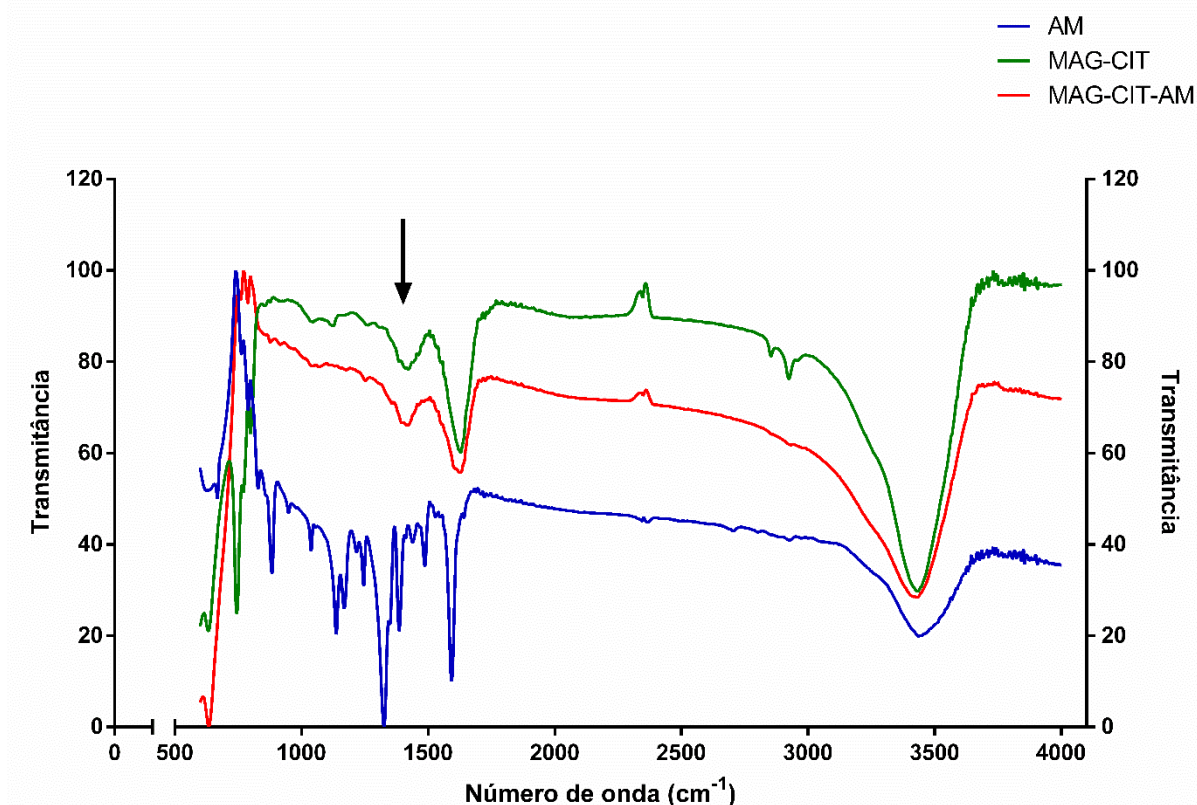


**Figura 13. Gráfico da composição elementar química de MAGCIT-AM.** A figura evidencia a detecção dos elementos Fe, S e Cl presentes no núcleo de maghemita e nas moléculas de azul de metilo adsorvidas, respectivamente.



## 5.2 FTIR, espectroscopia do UV-Visível e estudo fotofísico de MAGCIT-AM

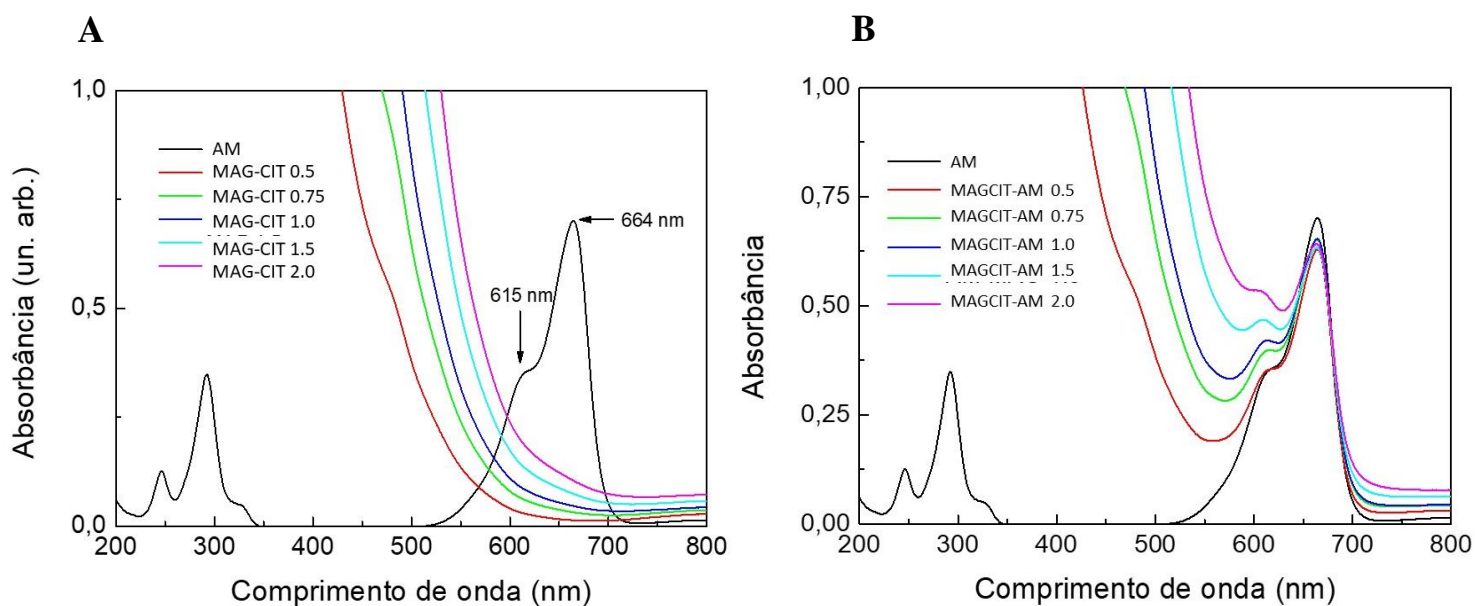
A análise de FTIR demonstra que ocorre uma interação eletrostática entre MAGCIT e AM. A comparação entre os espectros de MAGCIT-AM (vermelho) e MAGCIT (verde) confirma o deslocamento de  $+8\text{cm}^{-1}$  da banda de estiramento simétrico ( $\text{COO}^-$ ) da amostra de MAGCIT ( $1415,5\text{ cm}^{-1}$ ) para a amostra de MAGCIT-AM ( $1423,2\text{ cm}^{-1}$ ) (figura 14).



**Figura 14. Espectros de FTIR de AM livre (azul), de MAGCIT (verde) e de MAGCIT-AM (vermelho).** Deslocamento da banda de estiramento simétrico da amostra de MAGCIT para a amostra de MAGCIT-AM (seta preta).

As amostras de azul de metileno (AM) livre, MAGCIT e MAGCIT-AM apresentaram diferentes absorvâncias pela técnica de UV-Vis. Em que é possível observar que a razão entre a banda de dímero (613 nm) pela do monômero (665 nm) do azul de metileno é diferente para AM livre (0,288) e para MAGCIT-AM (0,543) (figura 15), sugerindo uma agregação entre as moléculas de azul de metileno que estão se adsorvendo nas partículas. Para averiguar se o AM estava formando interações com o núcleo magnético, além das análises descritas anteriormente, foi realizada a soma dos espectros individuais de AM e MAGCIT obtendo a razão de 0,337

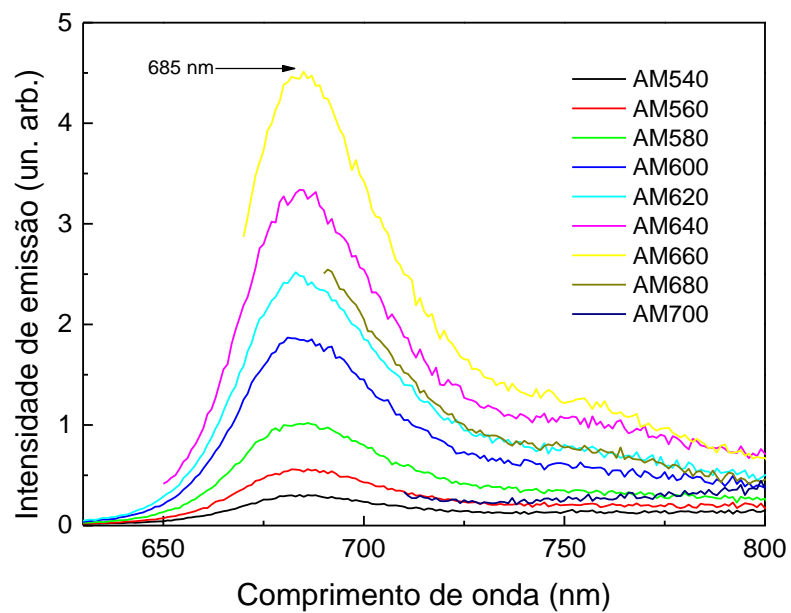
evidenciando a interação entre os compostos da partícula tendo em vista que esse valor não se iguala ao da formulação MAGCIT-AM.



**Figura 15. Espectroscopia de UV-Vis de azul de metileno livre (AM), de nanopartículas de maghemita associada ao citrato (MAGCIT) e de nanopartículas de maghemita associadas ao citrato e ao azul de metileno (MAGCIT-AM).** (A) análises das amostras de AM e MAGCIT nas concentrações de (0,5, 0,75, 1,0, 1,5 e 2,5  $\mu\text{g/mL}$ ) (B) análises das amostras de AM e MAGCIT-AM nas concentrações de (0,5, 0,75, 1,0, 1,5 e 2,5  $\mu\text{g/mL}$  de MAGCIT). Razão entre a banda do dímero pela do monômero do AM é diferente para as amostras de AM livre e MAGCIT-AM, evidenciando a interação eletrostática entre o azul de metileno e o núcleo de maghemita.

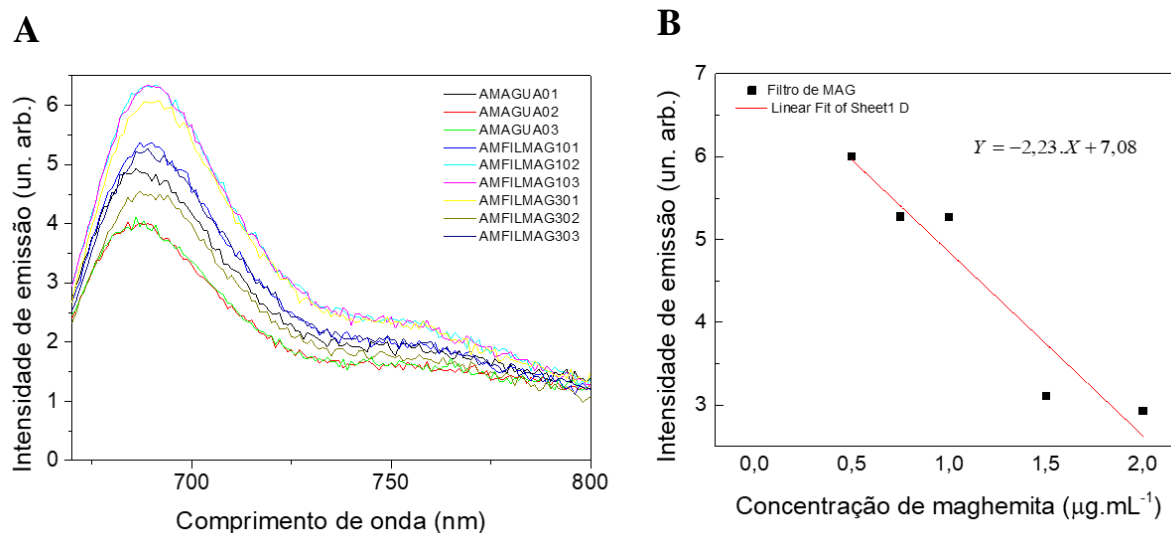
### 5.3 Estudo Fotofísico de MAGCIT-AM por meio de espectroscopia de absorção e de emissão

Com o objetivo de avaliar como a fluorescência de MAGCIT-AM se comportava após a formulação, primeiramente, a amostra de AM livre foi excitada em diferentes comprimentos de onda (540 – 700 nm) revelando que a emissão máxima de AM em meio aquoso é em 685 nm quando excitado em 660 nm (figura 16).



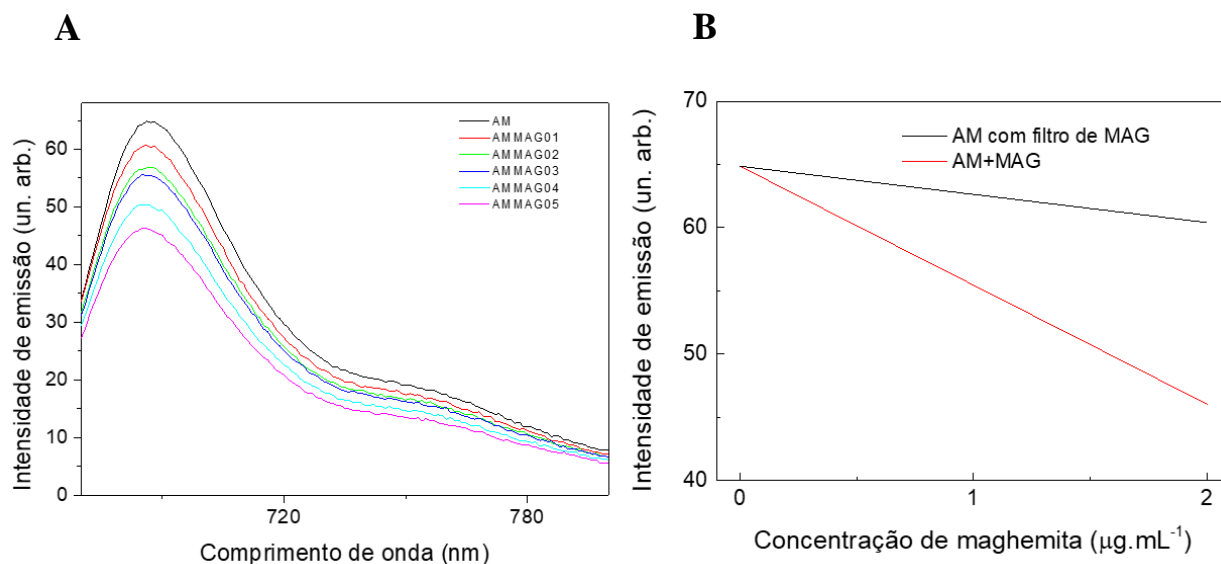
**Figura 16. Espectroscopia de absorção e de emissão de azul de metileno livre.** A emissão máxima de AM em meio aquoso é de 685 nm quando excitado em comprimento de onda de 660 nm.

Foi realizada a análise do efeito filtro na emissão de AM livre adicionando-se uma cubeta contendo diversas concentrações de MAGCIT entre o feixe de luz e a amostra de AM. Os resultados obtidos demonstram que a emissão do AM é inversamente proporcional ao aumento da concentração de MAGCIT na solução (figura 17).



**Figura 17. Resultado do efeito filtro na emissão de AM livre.** (A) Gráfico da intensidade de emissão em função da excitação com diversos comprimentos de onda (B) Equação da reta proveniente das análises do efeito filtro. A sigla AMAGUA corresponde a sobreposição com a cubeta preenchida com água e AMFILMAG a cubeta preenchida com variadas concentrações de MAGCIT (7,78; 5,84; 3,89; 2,92 e 1,94 mg/L).

Após o estudo do efeito filtro, a amostra de AM foi associada, em solução, com diversas concentrações de MAGCIT (figura 18A). Os resultados sugerem que a supressão de fluorescência é majoritariamente devido a uma interação intermolecular considerando a troca de carga e a transferência de energia ocasionada pelo acoplamento dos compostos (figura 18B). Apesar da redução da fluorescência estar presente, essa supressão não retira por completo esse sinal, possibilitando que essa propriedade ainda seja explorada ao longo dos experimentos.



**Figura 18. Efeito supressor na emissão de AM.** (A) Gráfico da intensidade de emissão em função da excitação com diversos comprimentos de onda após a formulação com diferentes concentrações de MAGCIT, no gráfico representado por MAG (B) Comparação da reta de supressão sofrida pelo AM quando a amostra está em formulação ou em efeito filtro.

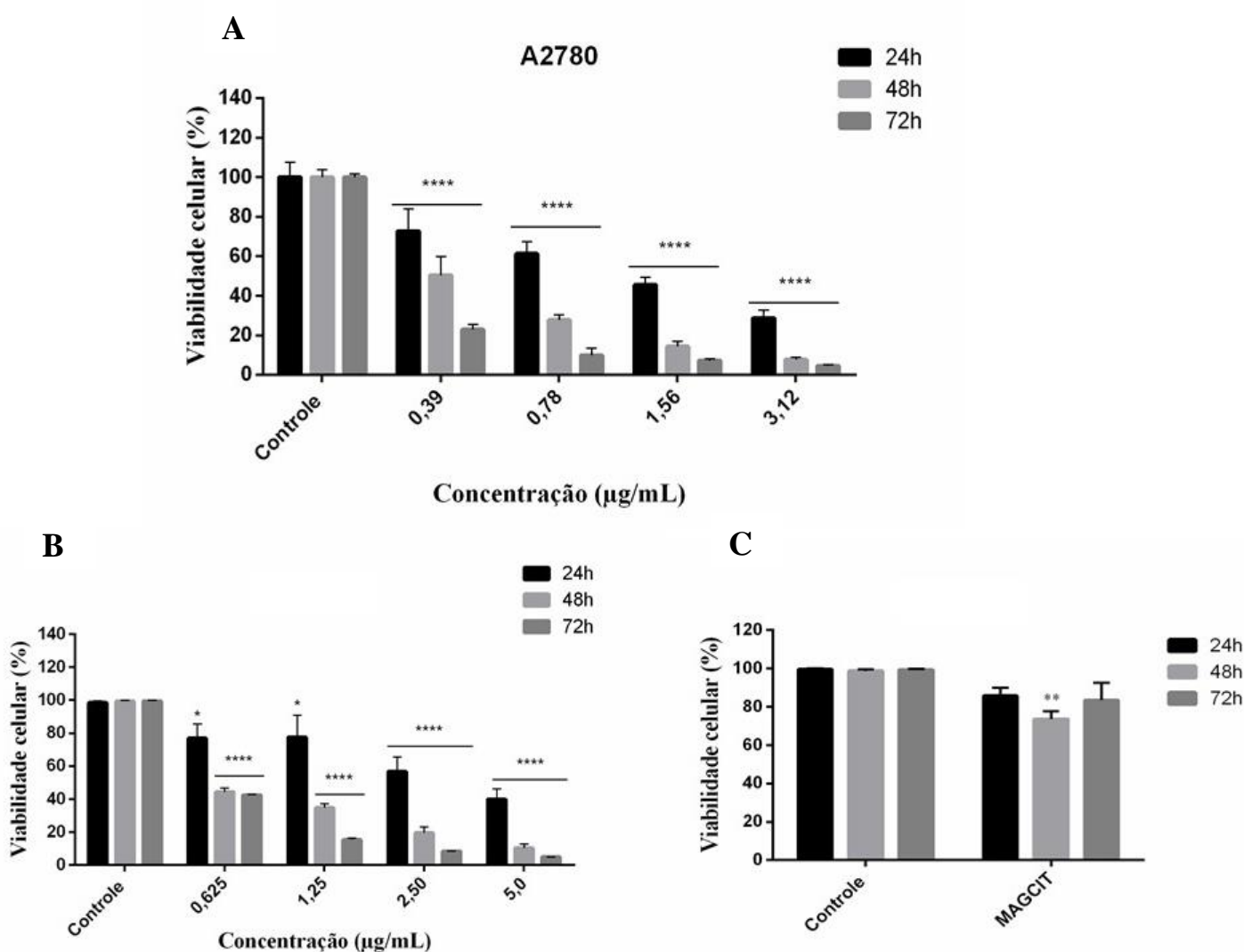
#### 5.4 Análise da citotoxicidade de AM livre, MAGCIT e MAGCIT-AM

Como um passo extremamente importante para a aplicação da formulação desenvolvida na terapia do câncer, foram avaliadas a citotoxicidade *in vitro* de MAGCIT-AM em duas linhagens de carcinoma mamário (T-47D, MDA-MB-231), em uma linhagem de carcinoma de ovário (A2780) e em duas linhagens de células normais (HUVEC e HNTMC). As concentrações selecionadas para o tratamento (3,12, 1,56, 0,78 e 0,39  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) basearam-se na quantidade de AM adsorvido na superfície magnética. Com a finalidade de averiguar a ocorrência de uma possível interação entre o núcleo de maghemita e o azul de metileno para a morte celular, foi avaliado a viabilidade celular após o tratamento com os compostos separados, ou seja, AM livre (5,0; 2,5; 1,25; 0,625  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) e MAGCIT. A partir dos resultados obtidos foi selecionada a concentração de 0,78  $\mu\text{g}/\text{mL}$  com o tempo de tratamento de 48 horas para prosseguir com os demais experimentos.

Para o estudo com MAGCIT foi utilizada apenas a concentração de maghemita escolhida para dar continuidade ao trabalho, ou seja, 3,84  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Com esse ensaio foi possível averiguar o efeito colaborativo da associação entre AM livre e MAGCIT para todas as linhagens estudadas tendo em vista que não houve alteração estatisticamente significativa da viabilidade celular quando comparada aos controles.

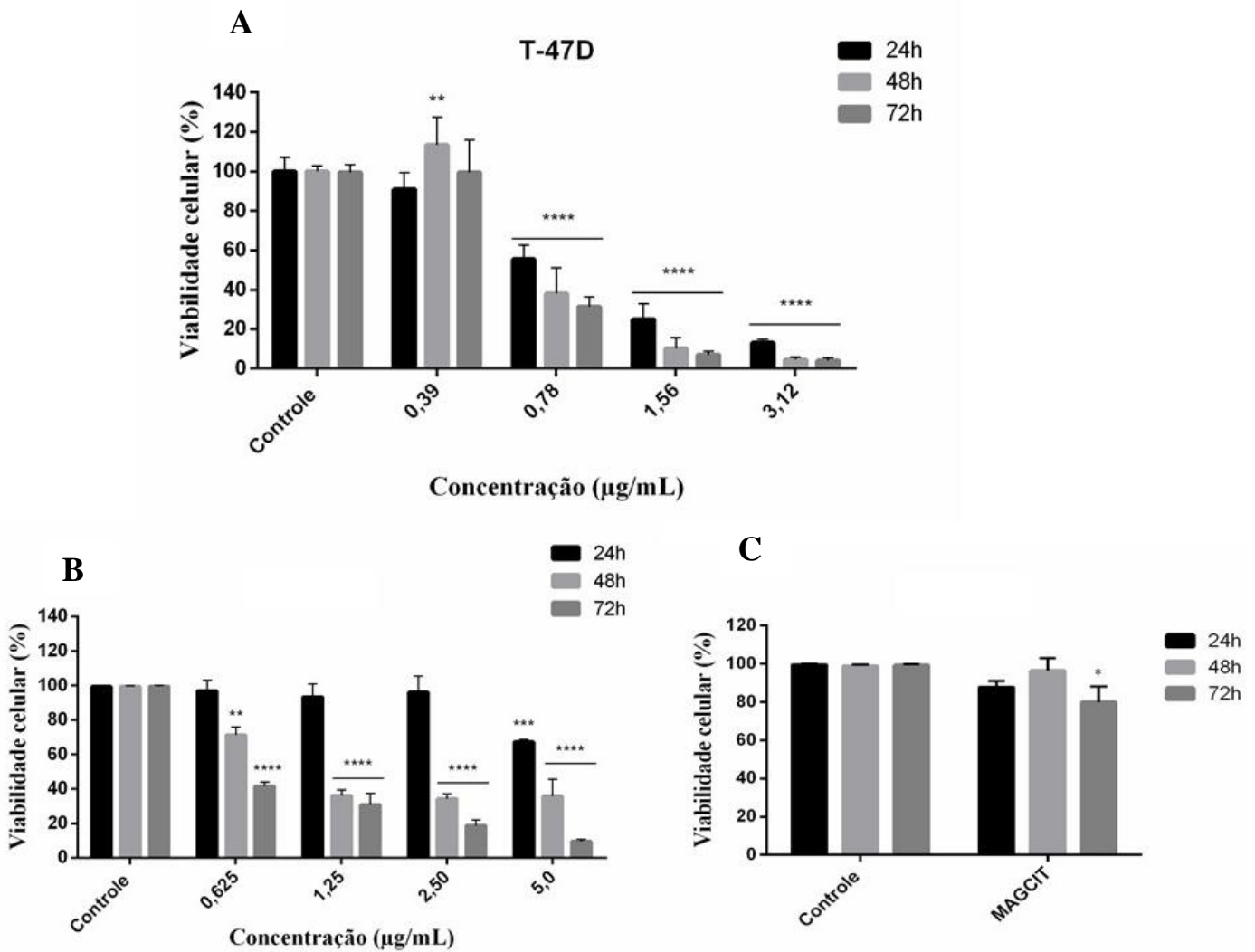
Os resultados obtidos através da análise por alamarBlue™, mostram que MAGCIT-AM apresenta toxicidade dose e tempo dependente nas linhagens estudadas, excluindo MDA-MB-231 que se mostrou resistente para todos os tempos e doses aplicados.

As linhagens tumorais, A2780 (figura 19) e T-47D (figura 20), mostraram-se mais sensíveis ao nanossistema desenvolvido, tendo em vista que apresentaram uma redução expressiva da viabilidade celular com todas ou com três de quatro das concentrações analisadas, respectivamente. Os resultados obtidos, para AM livre, com as linhagens tumorais, A2780 e T-47D, demonstram que a redução da viabilidade celular ocorre apenas em concentrações superiores de AM às utilizadas em sua maneira conjugada, sugerindo a ocorrência de um efeito colaborativo entre o AM e MAGCIT estudados



**Figura 19. Avaliação da viabilidade celular por alamarBlue™ da linhagem A2780 após 24, 48 e 72 horas de tratamento com AM livre, MAGCIT e MAGCIT-AM.** Gráfico de viabilidade da linhagem A2780 após os tratamentos com (A) MAGCIT-AM, (B) AM livre e (C) MAGCIT após

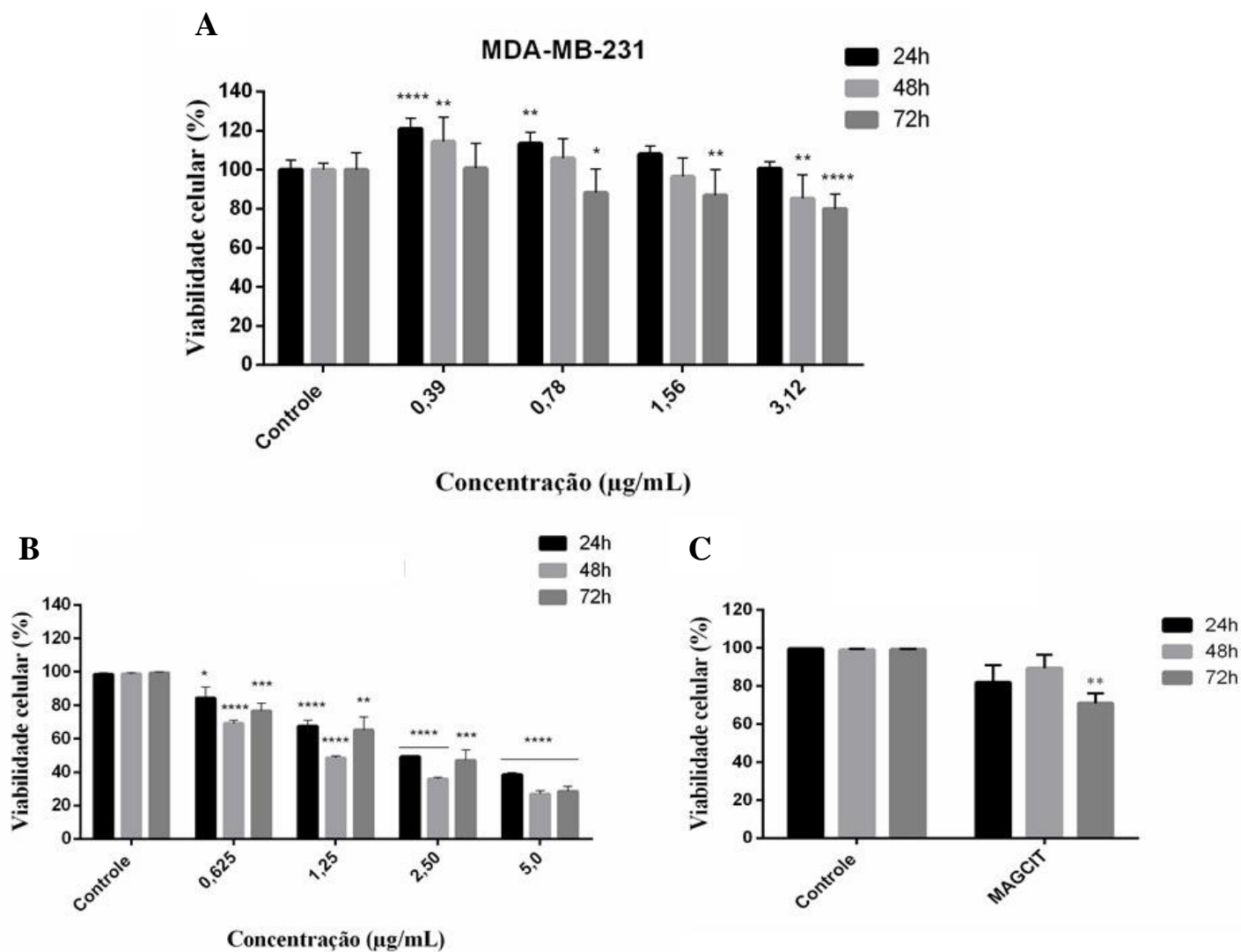
24, 48 e 72 horas de tratamento. As barras representam a viabilidade celular em percentual para cada linhagem após os tratamentos nas concentrações indicadas. Os dados representam a média  $\pm$  SEM de três experimentos independentes em triplicata \*P<0,05; \*\*P<0,01 e \*\*\*\*P<0.0001. \*tratamento comparado ao controle NT.



**Figura 20. Avaliação da viabilidade celular por alamarBlue™ da linhagem T-47D após 24, 48 e 72 horas de tratamento com AM livre, MAGCIT e MAGCIT-AM.** Gráfico de viabilidade da linhagem T-47D após os tratamentos com (A) MAGCIT-AM, (B) AM livre e (C) MAGCIT após 24, 48 e 72 horas de tratamento. As barras representam a viabilidade celular em percentual para cada linhagem após os tratamentos nas concentrações indicadas. Os dados representam a média  $\pm$  SEM de três experimentos independentes em triplicata \*P<0,05; \*\*P<0,01 e \*\*\*\*P<0.0001. \*tratamento comparado ao controle NT.



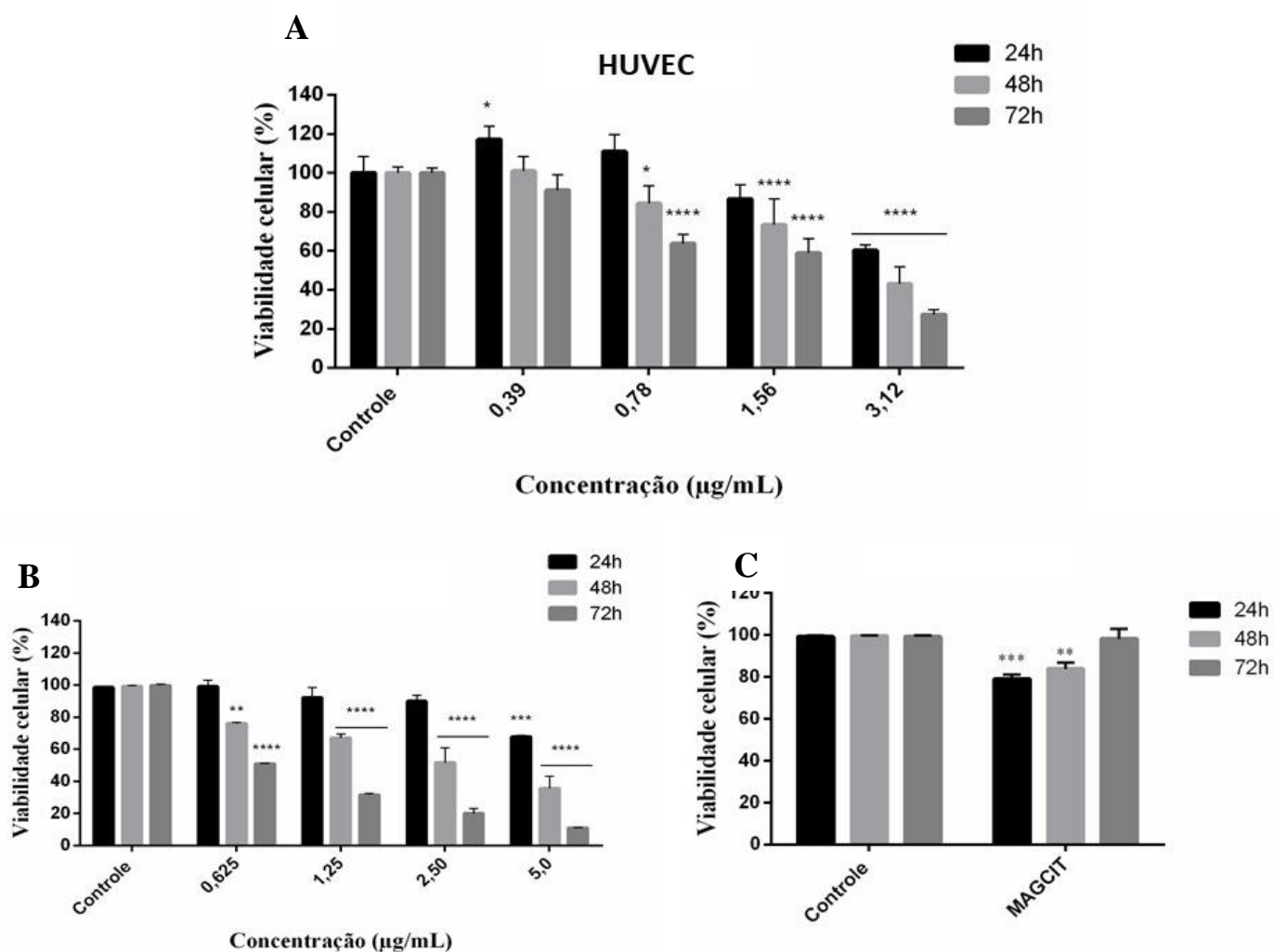
Em comparação, a linhagem MDA-MB-231 apresentou pouca ou nenhuma resposta ao tratamento, tendo 20% como sua maior porcentagem de redução da viabilidade celular obtida após 72 horas de tratamento com a concentração mais alta (3,12  $\mu\text{g/mL}$ ) (figura 21). Por fim, a linhagem MDA-MB-231, novamente, mostrou resultados bastante curiosos quando expostas a AM livre, que teve sua atividade mais evidenciada do que quando acoplado à MAGCIT.



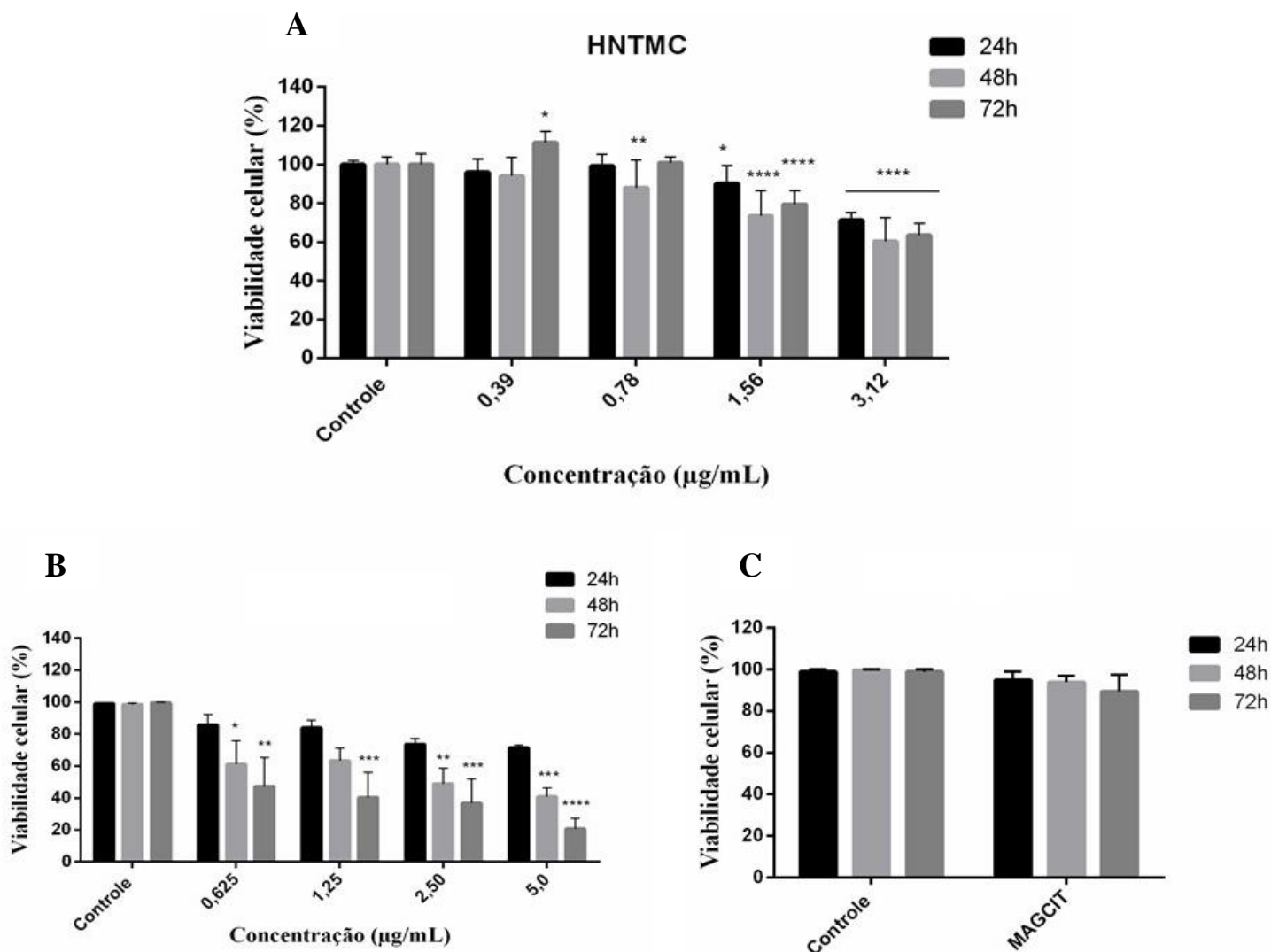
**Figura 21.** Avaliação da viabilidade celular por alamarBlue<sup>TM</sup> da linhagem MDA-MB-231 após 24, 48 e 72 horas de tratamento com AM livre, MAGCIT e MAGCIT-AM. Gráfico de viabilidade da linhagem MDA-MB-231 após os tratamentos com (A) MAGCIT-AM, (B) AM livre e (C) MAGCIT após 24, 48 e 72 horas de tratamento. As barras representam a viabilidade celular em percentual para cada linhagem após os tratamentos nas concentrações indicadas. Os dados representam a média  $\pm$  SEM de três experimentos independentes em triplicata \* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$  e \*\*\*\* $P < 0,0001$ . \*tratamento comparado ao controle NT.



As linhagens não tumorais demonstraram ser mais resistentes ao tratamento MAGCIT-AM em que, ambas obtiveram uma redução da viabilidade menos expressiva quando comparadas às células tumorais A2780 e T-47D (figuras 22 e 23). Para as linhagens não tumorais, os resultados referentes aos tratamentos com AM livre e MAGCIT foram antagônicos aos das células tumorais, ou seja, os níveis de citotoxicidade foram elevados com baixas concentrações de AM livre, demonstrando que a conjugação do fármaco com o núcleo magnético induz uma diminuição da citotoxicidade do mesmo para as linhagens controles.



**Figura 22. Avaliação da viabilidade celular por alamarBlue™ da linhagem HUVEC após 24, 48 e 72 horas de tratamento com AM livre, MAGCIT e MAGCIT-AM.** Gráfico de viabilidade da linhagem HUVEC após os tratamentos com (A) MAGCIT-AM, (B) AM livre e (C) MAGCIT após 24, 48 e 72 horas de tratamento. As barras representam a viabilidade celular em percentual para cada linhagem após os tratamentos nas concentrações indicadas. Os dados representam a média  $\pm$  SEM de três experimentos independentes em triplicata \* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$  e \*\*\*\* $P < 0,0001$ . \*tratamento comparado ao controle NT.



**Figura 23.** Avaliação da viabilidade celular por alamarBlue™ das células HNTMC após 24, 48 e 72 horas de tratamento com AM livre, MAGCIT e MAGCIT-AM. Gráfico de viabilidade das células HNTMC após os tratamentos com (A) MAGCIT-AM, (B) AM livre e (C) MAGCIT após 24, 48 e 72 horas de tratamento. As barras representam a viabilidade celular em percentual para cada linhagem após os tratamentos nas concentrações indicadas. Os dados representam a média  $\pm$  SEM de três experimentos independentes em triplicata \* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$  e \*\*\*\* $P < 0,0001$ . \*tratamento comparado ao controle NT.

### 5.5 Cálculo da Concentração Inibitória de 50% de AM livre e de MAGCIT-AM ( $IC_{50}$ )

Após as análises de viabilidade celular, foram calculados os  $IC_{50}$  de AM livre e de MAGCIT-AM, para todos os tempos, nas cinco linhagens estudadas. Para a linhagem MDA-MB-231, não foi possível obter, em nenhum dos tempos utilizados, uma concentração

determinada, pois o valor do IC<sub>50</sub> estava fora do intervalo das concentrações testadas, ou seja, superior a 3,12 µg/mL. Para as demais linhagens (T-47D, A2780, HUVEC e HNTMC) observa-se que, o valor de IC<sub>50</sub> diminui com o tempo corroborando com a análise tempo dependente observado com o ensaio de viabilidade celular (tabela 2).

**Tabela 2. Concentração inibitória de 50% de MAGCIT-AM das linhagens MDA-MB-231, A2780, T-47D, HUVEC e HNTMC nos tempos de 24, 48 e 72 horas.**

<b>Tempo</b>	<b>24h</b>	<b>48h</b>	<b>72h</b>
<b>MDA-MB-231</b>	> 3,12 µg/mL	> 3,12 µg/mL	> 3,12 µg/mL
<b>A2780</b>	0,53 µg/mL	0,25 µg/mL	0,08 µg/mL
<b>T-47D</b>	0,69 µg/mL	0,59 µg/mL	0,57 µg/mL
<b>HUVEC</b>	1,55 µg/mL	1,40 µg/mL	1,01 µg/mL
<b>HNTMC</b>	1,86 µg/mL	1,01 µg/mL	1,24 µg/mL

Os valores obtidos pelo cálculo do IC<sub>50</sub> após o tratamento com AM livre revelam que, para a linhagem A2780, a concentração inibitória é superior quando comparada aos resultados analisados para MAGCIT-AM (Tabela 3), em contrapartida, para T-47D os valores aumentam no tempo de 24 horas e decrescem expressivamente nos tempos de 48 e 72 horas. Para as células tumorais MDA-MB-231, diferentemente de MAGCIT-AM, foram possíveis obter os resultados referentes a essa análise, em que o AM mostrou ser mais citotóxico em sua forma livre do que associada.

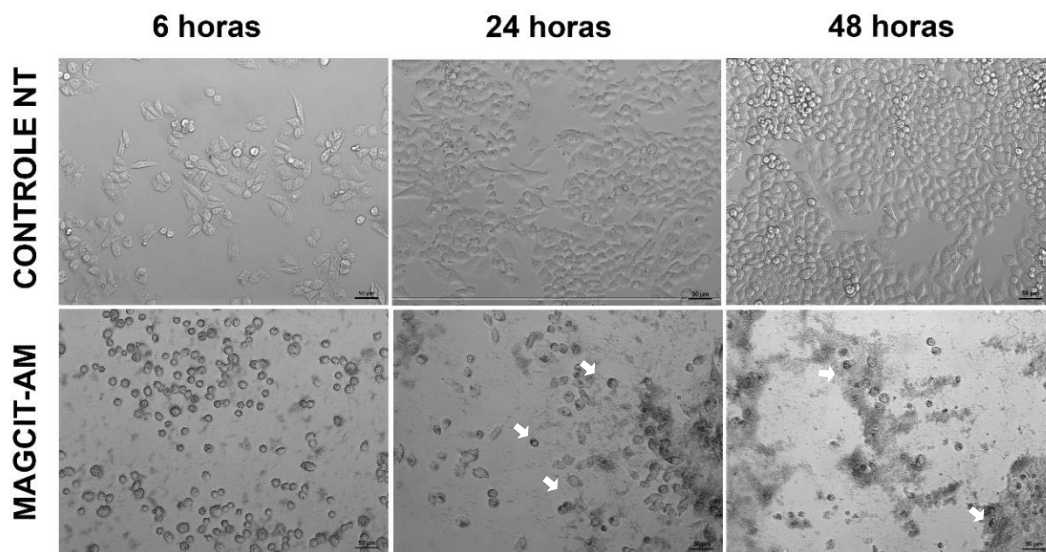
As linhagens não tumorais exibem valores reduzidos de IC<sub>50</sub> para AM livre quando comparados aos valores obtidos com o nanossistema, com exceção da linhagem HUVEC no tempo de 24 horas. Esses resultados indicam a importância da associação do fármaco ao núcleo magnético.

**Tabela 3. Concentração inibitória de 50% de AM livre das linhagens MDA-MB-231, A2780, T-47D, HUVEC e HNTMC nos tempos de 24, 48 e 72 horas.**

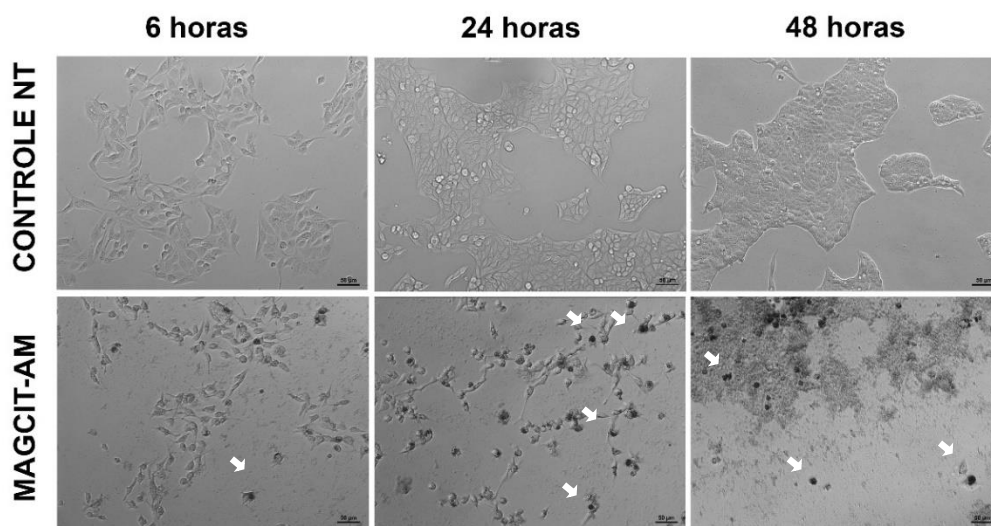
<b>Tempo</b>	<b>24h</b>	<b>48h</b>	<b>72h</b>
<b>MDA-MB-231</b>	0,96 µg/mL	0,58 µg/mL	1,01 µg/mL
<b>A2780</b>	1,11 µg/mL	0,38 µg/mL	0,27 µg/mL
<b>T-47D</b>	3,37 µg/mL	0,81 µg/mL	0,33 µg/mL
<b>HUVEC</b>	2,73 µg/mL	0,17 µg/mL	0,41 µg/mL
<b>HNTMC</b>	0,60 µg/mL	0,44 µg/mL	0,56 µg/mL

### *5.6 Avaliação das alterações morfológicas decorrentes do tratamento com MAGCIT-AM*

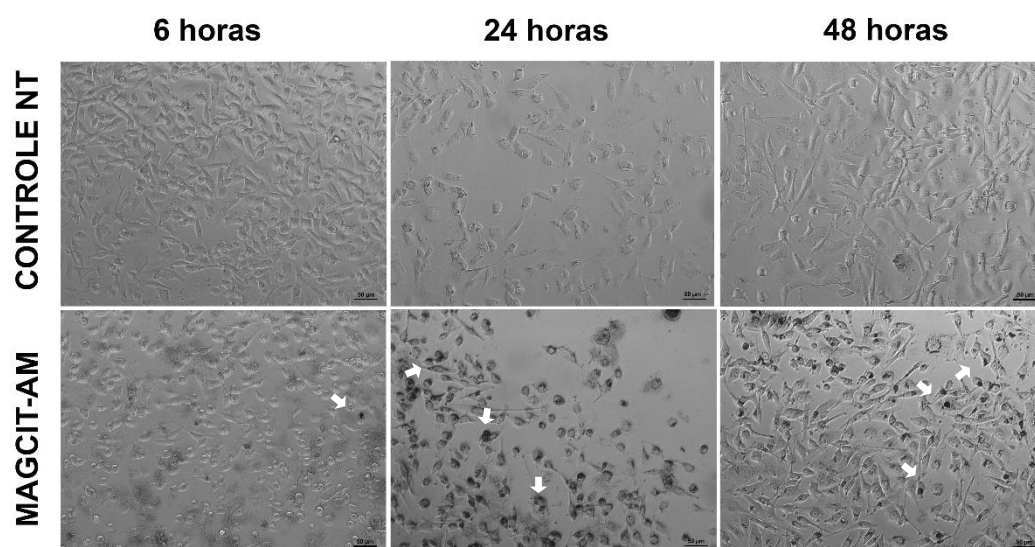
O nanossistema MAGCIT-AM foi capaz de induzir alterações morfológicas nas linhagens tumorais estudadas. É possível observar nas imagens obtidas por microscopia de luz, a internalização das nanopartículas assim como a diminuição do número de células aderidas. As linhagens T-47D (figura 24) e A2780 (figura 25) sofreram alterações mais significativas quando comparadas a MDA-MB-231 (Figura 26), onde verifica-se redução no tamanho das células, perda dos pontos de adesão focal e das projeções citoplasmáticas característicos, principalmente após 72 horas, sugerindo morte e/ou interrupção do ciclo celular decorrente do tratamento.



**Figura 24. Avaliação morfológica da linhagem A2780 após 6, 24 e 48 horas de tratamento com MAGCIT-AM por microscopia de luz.** As células foram tratadas com o nanossistema na concentração de 0,78  $\mu\text{g/mL}$ . As setas indicam a internalização de MAGCIT-AM pelas células tratadas. As colunas representam o tempo de tratamento e as linhas os controles negativos e o MAGCIT-AM. Barra de escala: 50  $\mu\text{m}$

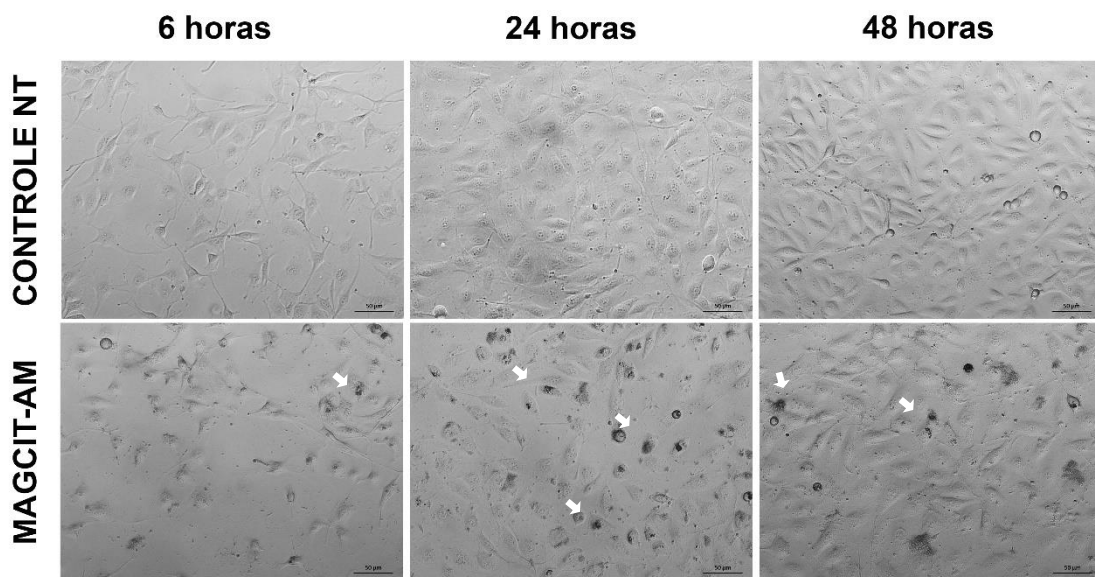


**Figura 25. Avaliação morfológica da linhagem T-47D após 6, 24 e 48 horas de tratamento com MAGCIT-AM por microscopia de luz.** As células foram tratadas com o nanossistema na concentração de 0,78  $\mu\text{g/mL}$ . As setas indicam a internalização de MAGCIT-AM pelas células tratadas. As colunas representam o tempo de tratamento e as linhas os controles negativos e o MAGCIT-AM. Barra de escala: 50  $\mu\text{m}$

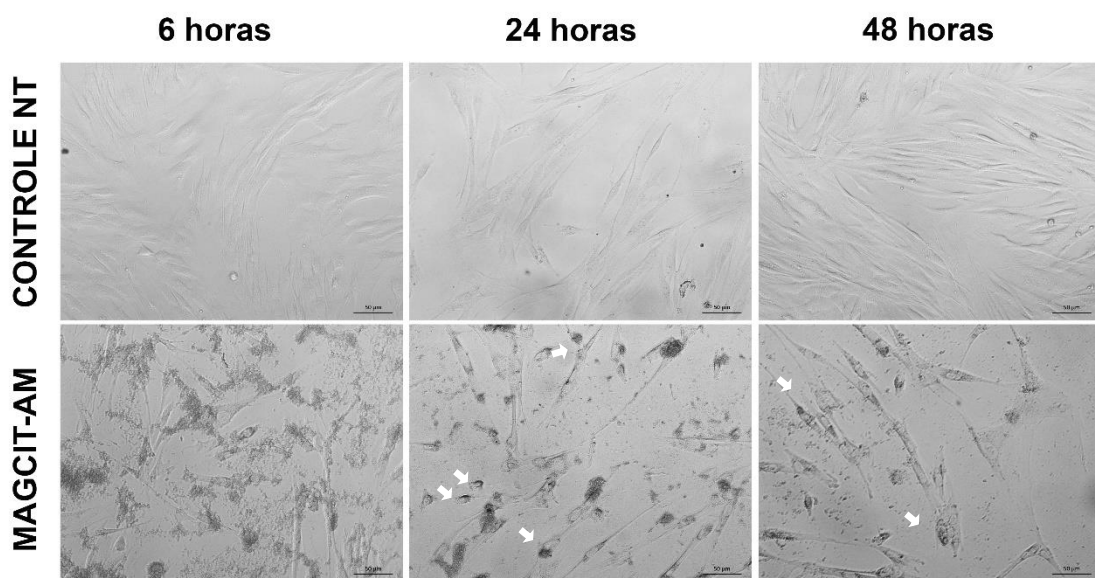


**Figura 26. Avaliação morfológica da linhagem MDA-MB-231 após 6, 24 e 48 horas de tratamento com MAGCIT-AM por microscopia de luz.** As células foram tratadas com o nanossistema na concentração de 0,78  $\mu\text{g/mL}$ . As setas indicam a internalização de MAGCIT-AM pelas células tratadas. As colunas representam o tempo de tratamento e as linhas os controles negativos e o MAGCIT-AM. Barra de escala: 50  $\mu\text{m}$

As alterações morfológicas pós-tratamento também estiveram presentes em células não tumorais (HUVEC e HNTMC), porém ocorreram em menor intensidade, evidenciando uma menor quantidade de células mortas e uma preservação da morfologia característica (Figura 27 e 28).



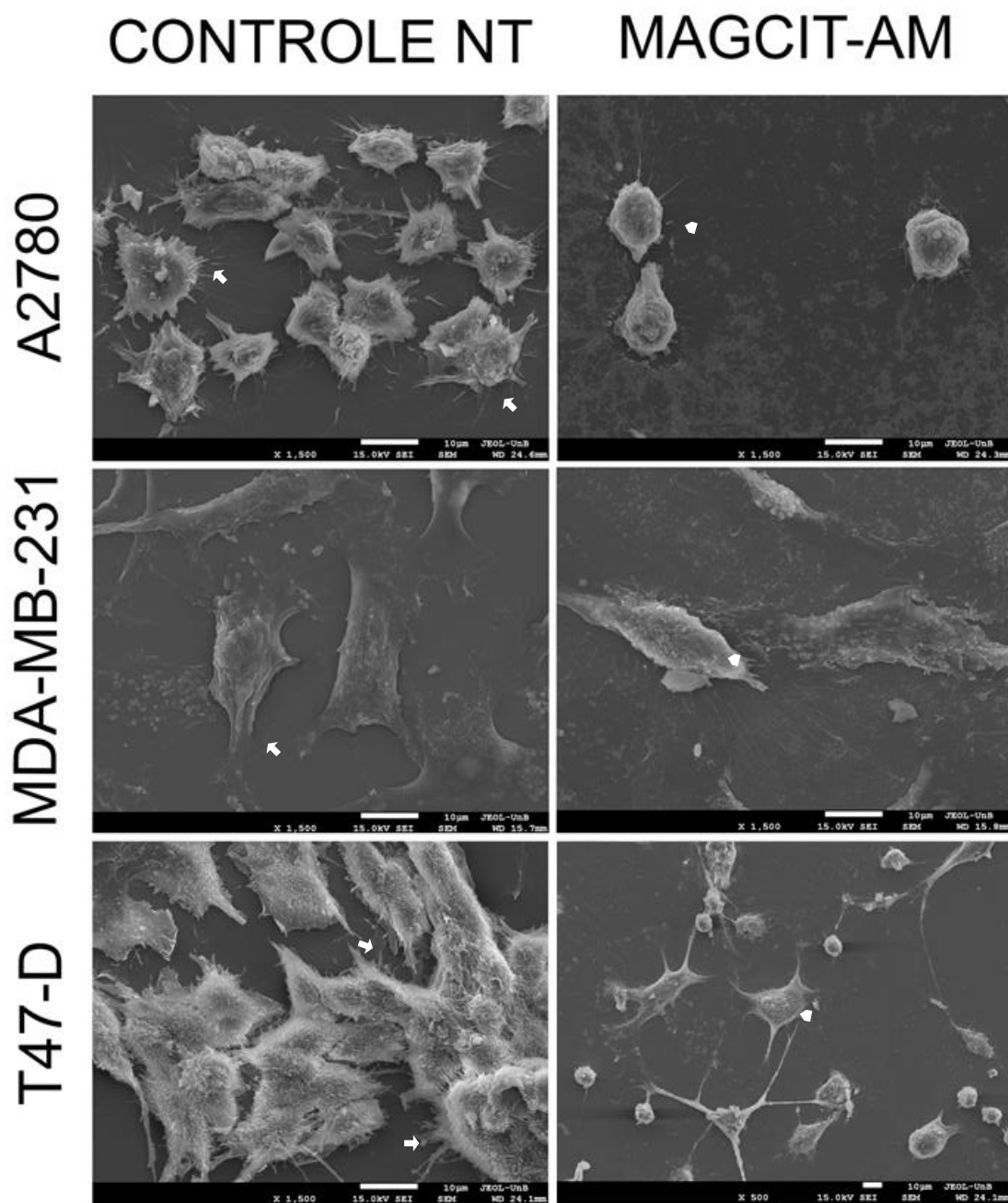
**Figura 27.** Avaliação morfológica da linhagem HUVEC após 6, 24 e 48 horas de tratamento com MAGCIT-AM por microscopia de luz. As células foram tratadas com o nanossistema na concentração de 0,78  $\mu\text{g/mL}$ . As setas indicam a internalização de MAGCIT-AM pelas células tratadas. As colunas representam o tempo de tratamento e as linhas os controles negativos e o MAGCIT-AM. Barra de escala: 50  $\mu\text{m}$



**Figura 28.** Avaliação morfológica da linhagem HNTMC após 6, 24 e 48 horas de tratamento com MAGCIT-AM por microscopia de luz. As células foram tratadas com o nanossistema na concentração de 0,78  $\mu\text{g/mL}$ . As colunas representam o tempo de tratamento e as linhas os controles negativos e o MAGCIT-AM. As setas indicam a internalização de MAGCIT-AM pelas células tratadas. Barra de escala: 50  $\mu\text{m}$

Pela microscopia eletrônica de varredura foi possível evidenciar, no grupo tratado, a perda da quantidade e dos pontos de adesão das células tumorais. As imagens permitem observar alterações morfológicas na superfície celular que, após o tratamento, adquiriu um aspecto mais arredondado e rugoso quando comparado ao controle. Na figura 29 é possível observar que as células de carcinoma de ovário reduzem de tamanho, já a linhagem de adenocarcinoma mamário (T-47D) sofre modificação em sua morfologia celular padrão observada em controles não tratados, sendo possível observar células com tamanhos e superfície alteradas.

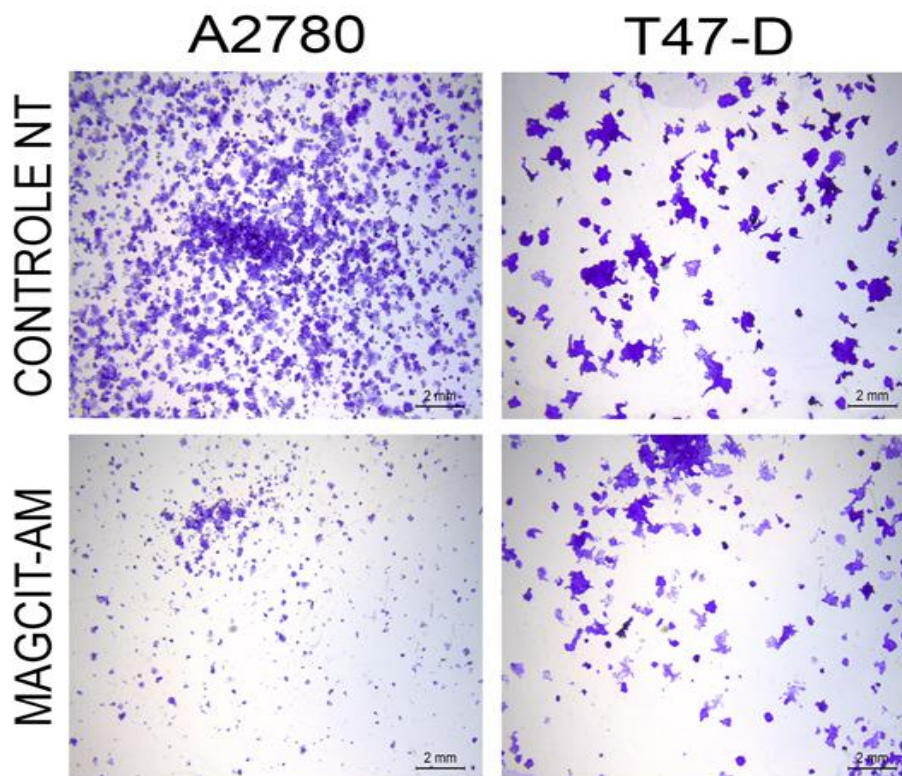




**Figura 29.** Avaliação morfológica por microscopia eletrônica de varredura das linhagens A2780, MDA-MB-231 e T-47D após 48 horas de tratamento com MAGCIT-AM. As células foram tratadas com o nanossistema na concentração de 0,78  $\mu\text{g/mL}$ . As setas indicam os pontos de adesão celular que estão mais evidentes nas células não tratadas. As cabeças de setas indicam as alterações na superfície celular. As colunas representam o tempo de tratamento e as linhas os controles negativos e o MAGCIT-AM. Barra de escala: 10  $\mu\text{m}$

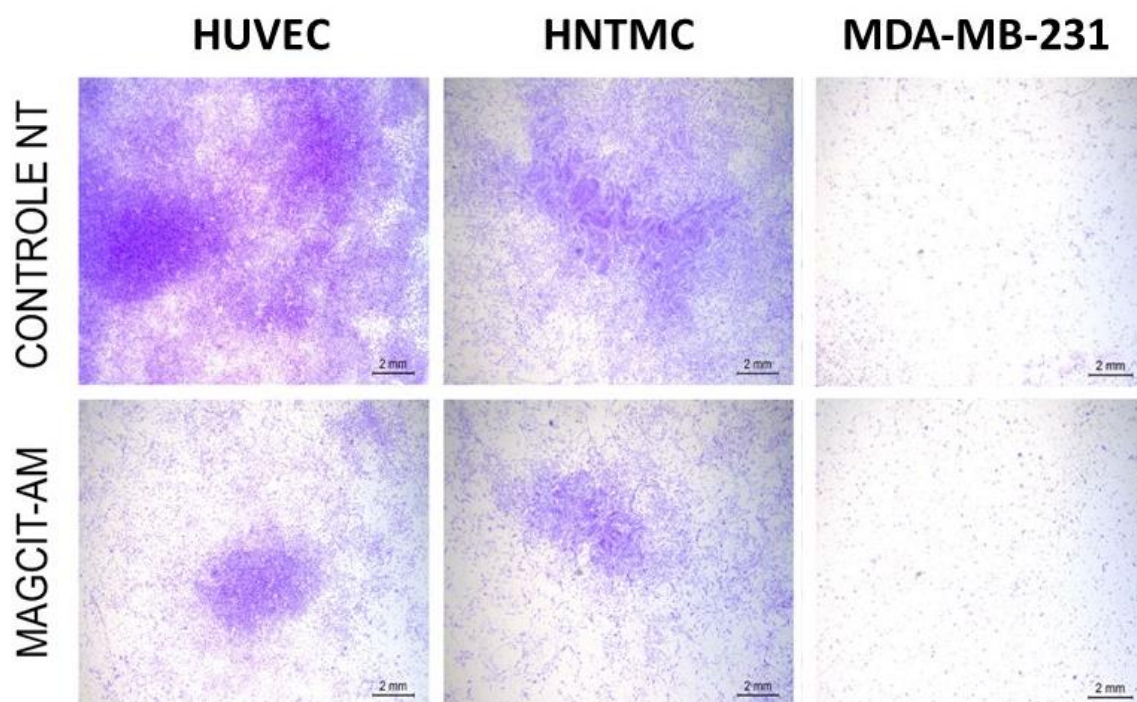
5.7 *Avaliação da capacidade de formação de colônias e recuperação celular das células tratadas MAGCIT-AM*

O ensaio para avaliar a capacidade de formação de colônia posterior ao tratamento com o nanossistema, revelou que MAGCIT-AM interferiu expressivamente na formação de novas colônias das linhagens tumorais A2780 e T-47D (figura 30).



**Figura 30. Efeito do tratamento com MAGCIT-AM na capacidade de formações de colônias das células A2780 e T-47D** As células foram tratadas com o nanossistema a 0,78  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de AM por 48 horas. Após esse tempo,  $10^3$  células que sobreviveram ao tratamento foram replaqueadas em placas de 6 poços. Barra de referência 2 mm.

Nas células MDA-MB-231, HUVEC e HNTMC foram avaliados apenas os parâmetros de recuperação celular, tendo em vista que nenhuma das células estudadas formam colônias em sua forma não tratada. Na figura 31 é possível evidenciar que as células HUVEC sofreram uma maior ação à MAGCIT-AM do que as HNTMC, porém, apesar de estar presente, essa redução da proliferação celular não foi tão expressiva como a que ocorreu nas linhagens tumorais A2780 e T-47D. A linhagem MDA-MB-231 não demonstrou ser sensível ao tratamento sugerido (figura 31).

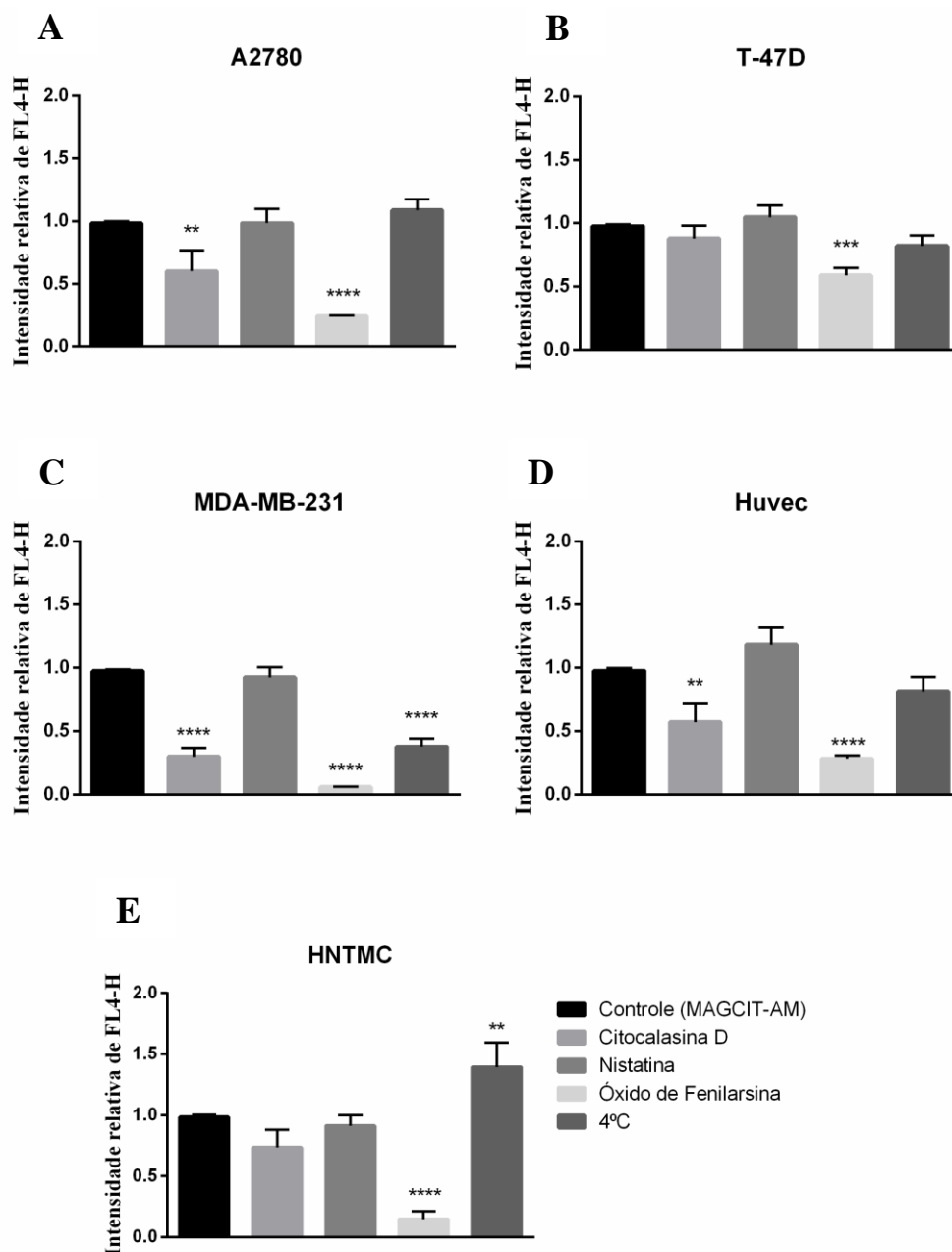


**Figura 31. Efeito do tratamento com MAGCIT-AM na capacidade de recuperação celular de HUVEC, HNTMC e MDA-MB-231.** As células foram tratadas com o nanossistema a 0,78  $\mu\text{g/mL}$  de AM por 48 horas. Após esse tempo,  $10^3$  células que sobreviveram ao tratamento foram replaqueadas em placas de 6 poços. Barra de referência 2 mm.

### 5.8 Internalização de MAGCIT-AM por vias endocíticas

A investigação dos diferentes mecanismos de endocitose envolvidos na internalização de MAGCIT-AM pelas linhagens estudadas foi realizada com o auxílio de inibidores de diferentes vias endocíticas. Observando a figura 32, verifica-se que todas as linhagens exibiram resultados estatisticamente significativos para o inibidor de endocitose mediada por clatrina (Óxido de fenilarsina), evidenciando que esse mecanismo de internalização celular é importante para o tratamento com o nanossistema

As linhagens A2780, T-47D, HUVEC exibiram resultados significativos ao serem pré-tratadas com o inibidor de pinocitose (citocalasina D) assim como a MDA-MB-231 que, além de internalizar MAGCIT-AM pelas vias citadas anteriormente, a via endocítica mediada por ATP também faz parte do processo de endocitose celular nessa linhagem (figura 32C).



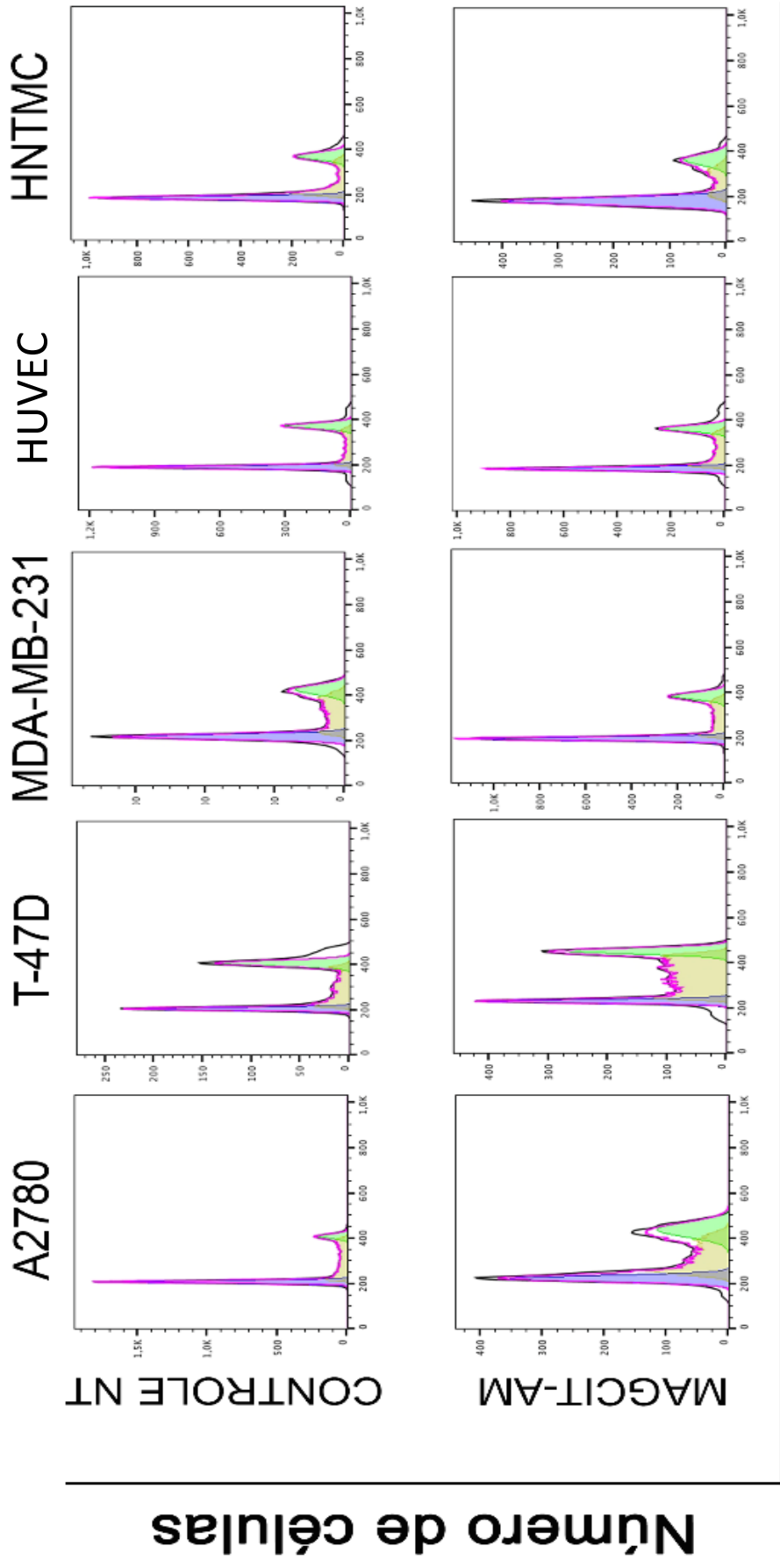
**Figura 32. Efeito da inibição de vias de endocitose sobre a internalização de MAGCIT-AM por 6 horas.** (A) A2780, (B) T-47D, (C) MDA-MB-231, (D) HUVEC e (E) HNTMC As células foram previamente tratadas com os inibidores citocalasina D (pinocitose), nistatina (caveolina), óxido de fenilarsina (clatrina) e 4 °C (vias com a utilização de ATP). As barras representam a intensidade relativa de internalização para cada linhagem após tratamento com MAGCIT-AM na concentração de 0,78 µg/mL de AM por 6 horas. As análises foram realizadas em citômetro de fluxo. Os dados representam a média ± SEM de três experimentos independentes em triplicata. \*\*P<0,01; \*\*\*P<0,001 e \*\*\*\*P<0.0001. Estatística referente ao tratamento comparado ao controle sem inibidor.

### *5.9 Alterações no perfil do ciclo celular de células A2780, T-47D, MDA-MB-231, HUVEC e HNTMC decorrente do tratamento com MAGCIT-AM*

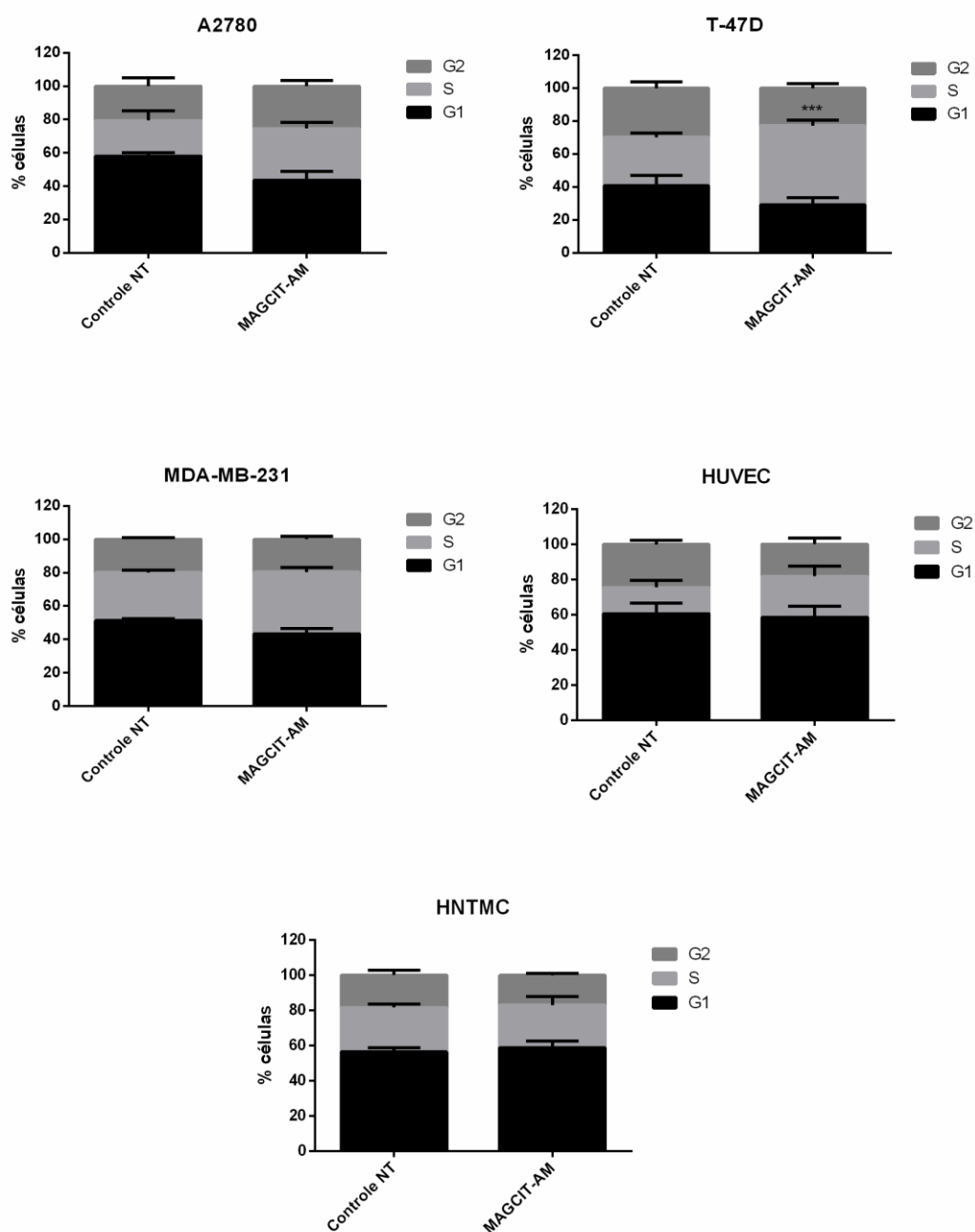
Para avaliar se MAGCIT-AM influencia na progressão do ciclo celular, as células foram tratadas por 24 horas com a dose de IC<sub>50</sub> e, passado esse período receberam a marcação com iodeto de propídio (PI) para análise em citômetro de fluxo. A marcação com PI, um marcador intercalante de DNA fluorescente, é diretamente proporcional à quantidade de DNA intracelular, permitindo a quantificação das populações celulares presentes em G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>, em G<sub>2</sub>/M e aquelas que estão em fase S.

Os resultados obtidos através dessa análise revelam que, para as linhagens tumorais, o tratamento com MAGCIT-AM altera, mas de forma não estatisticamente significativo, a fase G<sub>1</sub> do ciclo, reduzindo a quantidade de células estacionadas nesse período. A linhagem T-47D mostrou resultados significativos para a fase S, que teve sua porcentagem aumentada em relação ao controle não tratado. As linhagens não tumorais não demonstraram resultados significativos na alteração do ciclo celular após o tratamento com MAGCIT-AM, apenas ocorreu uma alteração da fase S nas células HUVEC (figura 33).

A



## Iodeto de Propídio - FL2-A

**B**

**Figura 33. Avaliação do ciclo celular em células A2780, T-47D, MDA-MB-231, HUVEC e HNTMC tratadas com MAGCIT-AM (IC<sub>50</sub>, 24 horas).** (A) Histograma representativo das fases do ciclo celular pré e pós tratamento com o nanossistema (B) Quantificação do percentual de células em cada fase do ciclo celular. Os dados representam três experimentos independentes, n=1, expressos como porcentagem média de células em cada fase do ciclo celular ± SEM. \*\*\* P<0,001.

#### 5.10 Análise do tipo de morte celular causada pelo tratamento com MAGCIT-AM



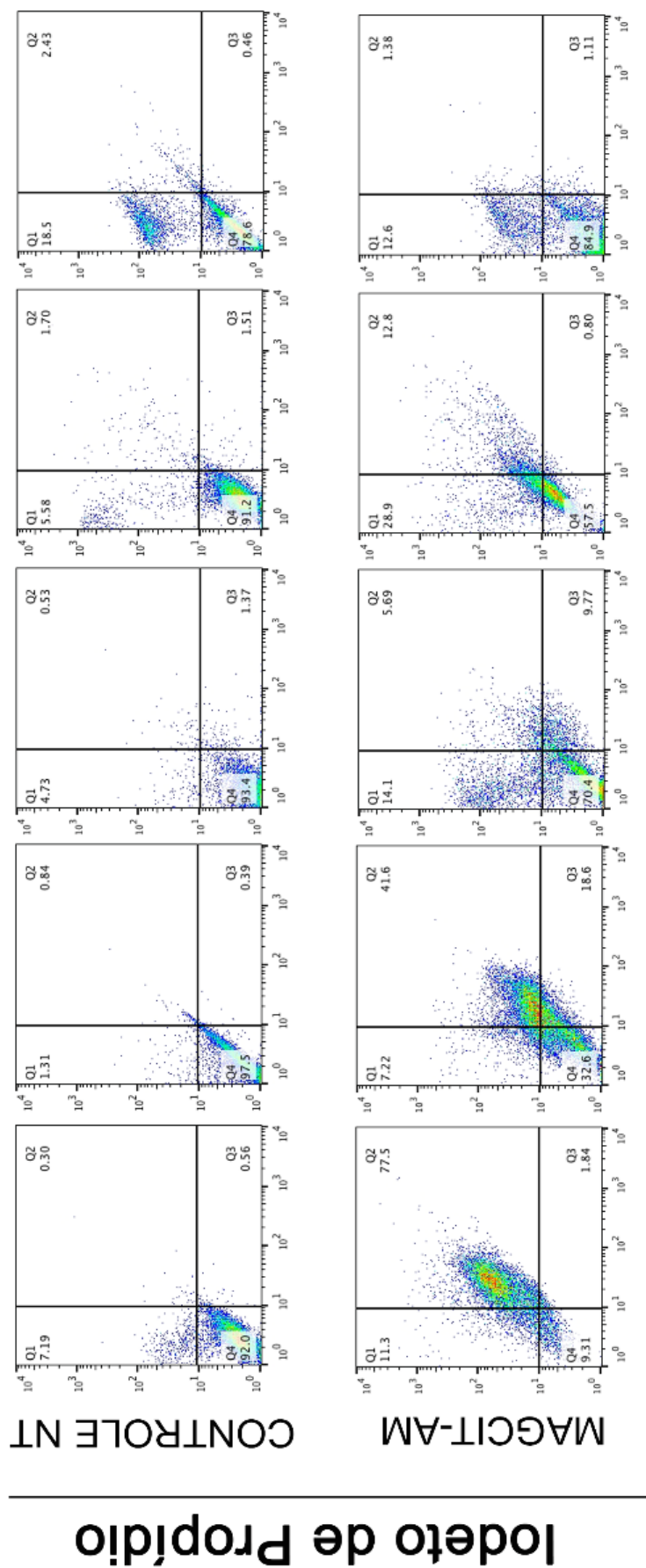
Para o estudo do tipo de morte celular causada por MAGCIT-AM, utilizou-se a concentração de 0,78  $\mu\text{g/mL}$  de AM. Após o tempo de incubação, 48 horas de tratamento, as células foram marcadas com Anexina-V e PI, marcadores que permitem avaliar subpopulações de células viáveis, em apoptose inicial, em necrose e em morte celular lítica.

Os resultados obtidos revelam que o tratamento induz, prioritariamente, a morte celular lítica em uma grande porcentagem de células A2780 e T-47D, que também possui uma pequena porcentagem (aproximadamente 20%) de morte induzida por necrose. A linhagem MDA-MB-231 demonstrou ser resistente ao tratamento exibindo uma pequena porcentagem de células mortas (aproximadamente 29,5% do total) com o perfil de morte por necrose correspondendo a 14% (figura 34).

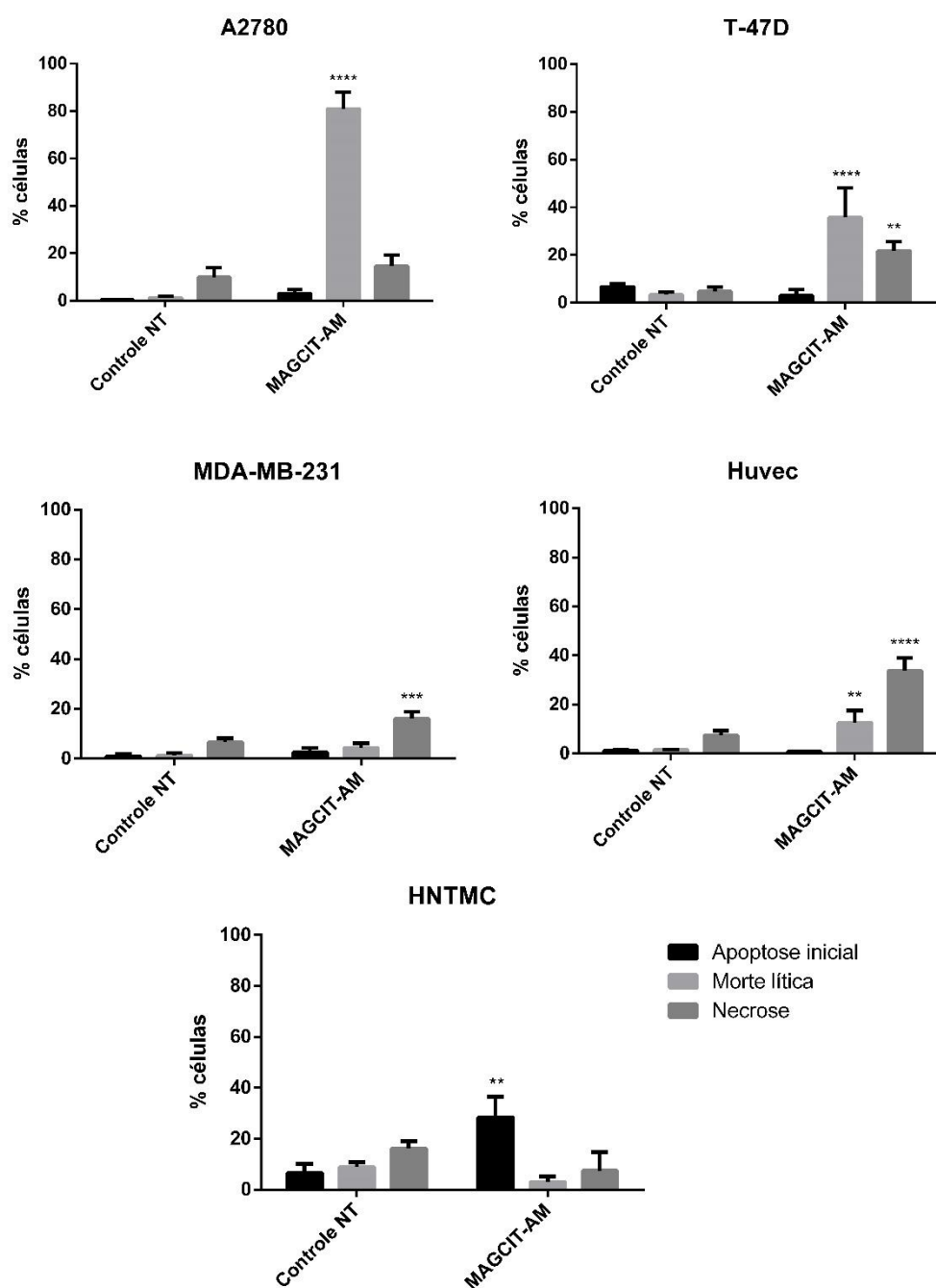
As análises referentes às linhagens não tumorais revelam que MAGCIT-AM induz a morte por necrose, 29%, e por morte celular lítica, 12,8%, em células HUVEC. Já em células HNTMC a maior porcentagem de morte corresponde a apoptose inicial, aproximadamente 28% (figura 34).



A



**Anexina-V**

**B**

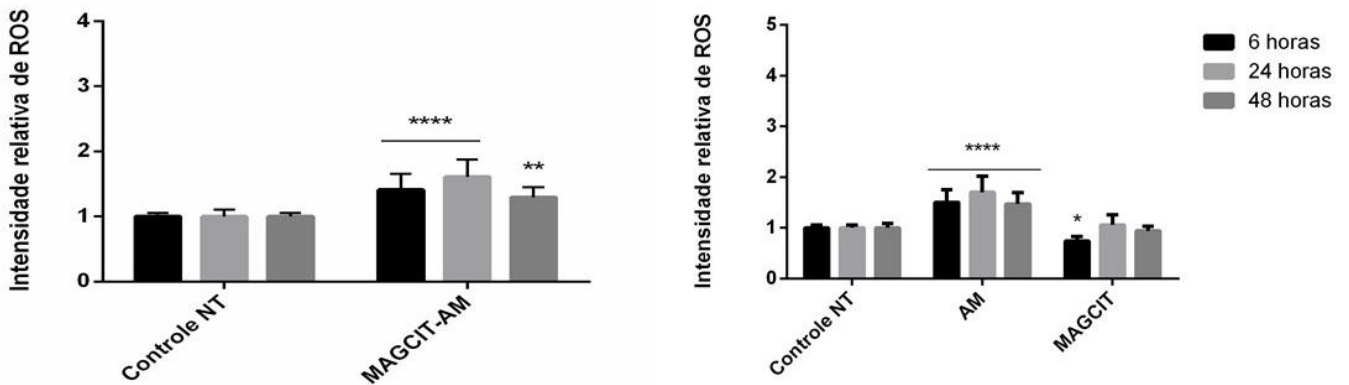
**Figura 34. Avaliação do perfil de morte celular induzido por MAGCIT-AM (0,78 µg/mL, 48 horas) em células A2780, T-47D, MDA-MB-231, HUVEC e HNTMC. (A) Distribuição das populações celulares de acordo com o perfil das marcações. Quadrante inferior esquerdo corresponde às células viáveis, inferior direito às células em apoptose inicial, superior esquerdo às células necróticas e superior direito às mortes celulares líticas. (B) Representação gráfica dos perfis de morte celular com análise estatística. \*\*P<0,01; \*\*\*P<0,001 e \*\*\*\*P<0,0001 comparado ao controle não tratado.**

### *5.11 Produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) pelas linhagens celulares em decorrência do tratamento com MAGCIT-AM*

Tendo em vista que AM possui um potencial terapêutico voltado à produção de EROs (Santos, 2018), a quantificação da produção dessas espécies reativas é de importância para o entendimento do mecanismo de ação do nanossistema desenvolvido. Para esse estudo, as células foram marcadas com DCFDA, um reagente que se torna fluorescente após entrar em contato com EROs. Com um controle não tratado obteve-se os níveis celulares basais de EROs que foram comparados aos valores adquiridos após o tratamento com MAGCIT-AM à concentração de 0,78 µg/mL de AM por 6, 24 e 48 horas. Assim como no estudo de viabilidade celular, foi realizado um ensaio de quantificação da produção de EROs com os compostos em suas formas não associadas, ou seja, AM livre e MAGCIT.

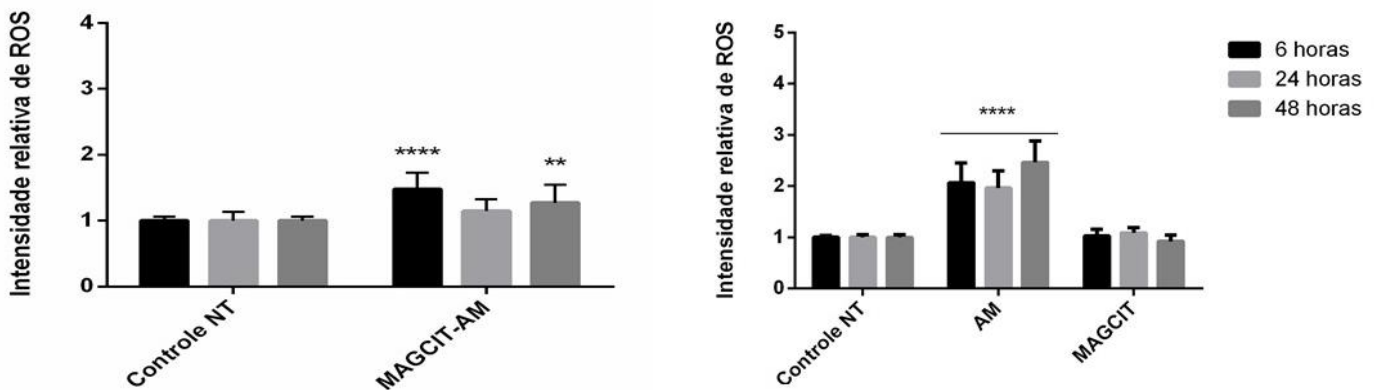
Na figura 35 observa-se que nas células A2780, a produção de EROs apresenta maior pico após 24 horas de tratamento com MAGCIT-AM. Já a comparação dos resultados de AM livre e MAGCIT-AM revela que, para esta linhagem, não ocorre diferença significativa entre os valores obtidos. Diferentemente da linhagem mencionada acima, observa-se que nas células T-47D ocorre um pico de produção de EROs nas primeiras 6 horas decorrente do tratamento com MAGCIT-AM, que decresce ao longo das próximas 24 e 48 horas, para o tratamento com os compostos não associados, AM livre mostrou ser mais eficaz para a produção de espécies reativas (figura 36).

## A2780



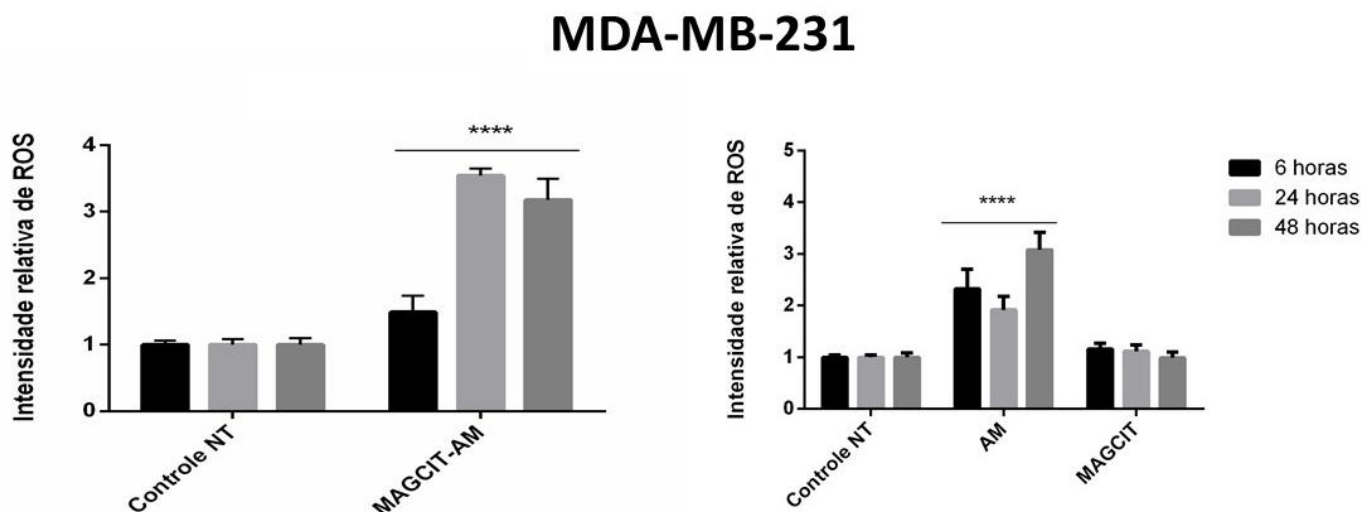
**Figura 35. Produção de EROs pela linhagem A2780 após tratamento com MAGCIT-AM (0,78 µg/mL de AM), AM livre e MAGCIT analisados por espectrofotometria.** Os dados representam medições com a utilização do reagente DCFDA e análise por espectrofotometria. Resultados referentes à três experimentos independentes, n=3, expressos como média da intensidade relativa de EROs celular ± SEM. com análise estatística. \*P<0,05; \*\*P<0,01 e \*\*\*\*P<0,0001 comparado ao controle não tratado.

## T-47D



**Figura 36. Produção de EROs pela linhagem T-47D após tratamento com MAGCIT-AM (0,78 µg/mL de AM), AM livre e MAGCIT analisados por espectrofotometria.** Os dados representam medições com a utilização do reagente DCFDA e análise por espectrofotometria. Resultados referentes à três experimentos independentes, n=3, expressos como média da intensidade relativa de EROs celular ± SEM. com análise estatística. \*\*P<0,01 e \*\*\*\*P<0,0001 comparado ao controle não tratado.

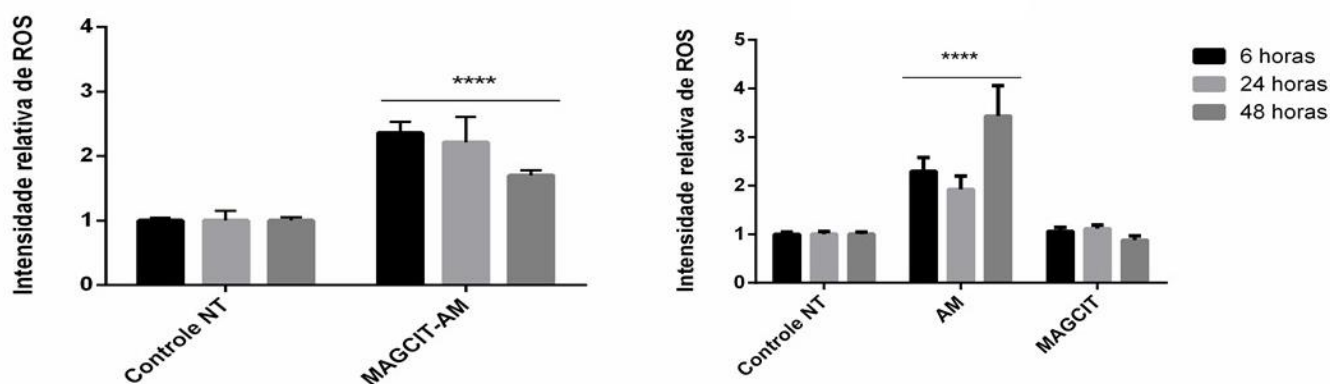
Analisando os resultados obtidos, observa-se que, assim como na linhagem A2780, as células MDA-MB-231, apesar de não reduzir sua viabilidade, possuem um pico de produção de EROs após 24 horas de tratamento e aumentam mais significativamente a produção dessas espécies reativas após o tratamento com MAGCIT-AM do que com o composto AM livre em todos os tempos estudados (figura 37).



**Figura 37. Produção de EROs pela linhagem MDA-MB-231 após tratamento com MAGCIT-AM (0,78 µg/mL de AM), AM livre e MAGCIT analisados por espectrofotometria.** Os dados representam medições com a utilização do reagente DCFDA e análise por espectrofotometria. Resultados referentes à três experimentos independentes, n=3, expressos como média da intensidade relativa de EROs celular ± SEM. com análise estatística. \*\*\*\*P<0,0001 comparado ao controle não tratado.

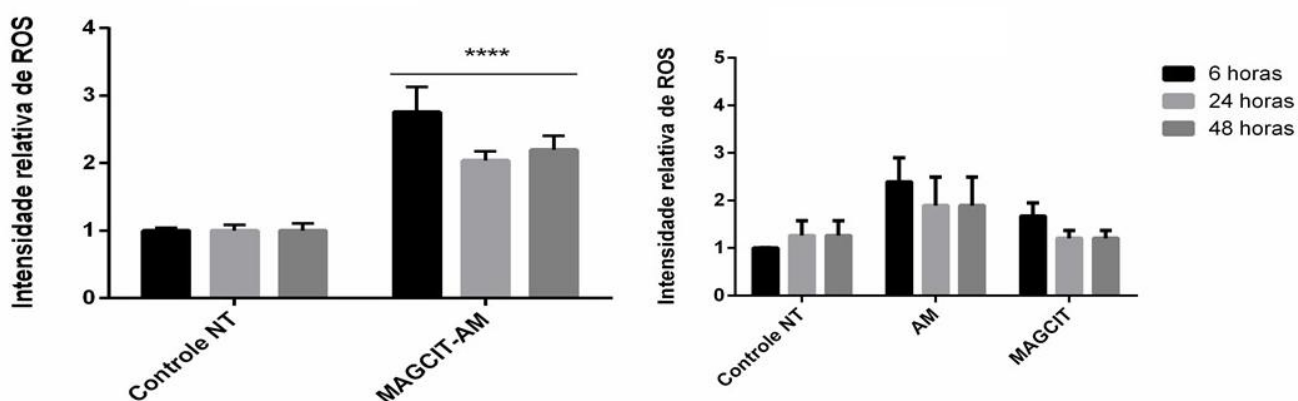
As análises referentes às células não tumorais demonstram que, para HUVEC, o pico de produção de EROs ocorre nas primeiras 6 horas após o tratamento com MAGCIT-AM, fato diferente para as células HNTMC, em que se observa o maior pico no tempo de 24 horas. O composto livre, em comparação com MAGCIT-AM, elevou a quantidade de produção de espécies reativas de oxigênio no tempo de 48 horas para a linhagem HUVEC. Já para as células HNTMC não se observou, para esse tratamento, alteração significativa em nenhum dos tempos estudados (figuras 38 e 39).

## HUVEC



**Figura 38. Produção de EROs pela linhagem HUVEC após tratamento com MAGCIT-AM (0,78  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de AM), AM livre e MAGCIT analisados por espectrofotometria.** Os dados representam medições com a utilização do reagente DCFDA e análise por espectrofotometria. Resultados referentes à três experimentos independentes,  $n=3$ , expressos como média da intensidade relativa de EROs celular  $\pm$  SEM. com análise estatística. \*\*\*\* $P<0,0001$  comparado ao controle não tratado.

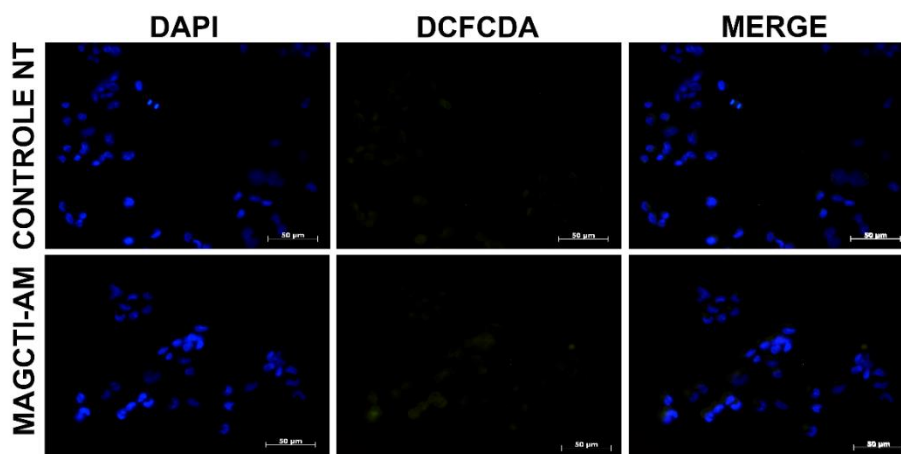
## HNTMC



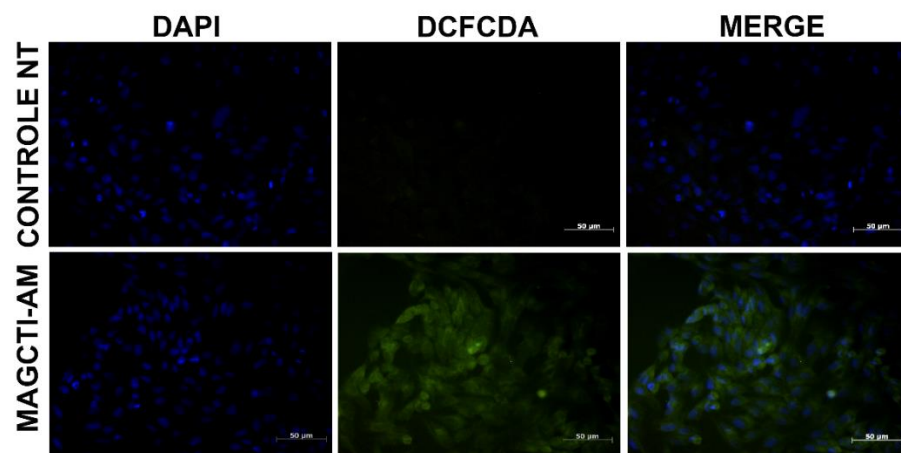
**Figura 39. Produção de EROs pelas células HNTMC após tratamento com MAGCIT-AM (0,78  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de AM), AM livre e MAGCIT analisados por espectrofotometria.** Os dados representam medições com a utilização do reagente DCFDA e análise por espectrofotometria. Resultados referentes à três experimentos independentes,  $n=3$ , expressos como média da intensidade relativa de EROs celular  $\pm$  SEM. com análise estatística. \*\*\*\* $P<0,0001$  comparado ao controle não tratado.

Para a visualização da produção de EROs pelas linhagens tumorais, foi realizada a análise em microscópio de fluorescência após a marcação com DCFDA nas células não tratadas e tratadas com MAGCIT-AM (0,78 µg/mL de AM) por 6 horas (figura 40). Analisando as imagens, observa-se que as células não alteram a morfologia, mesmo aquelas que receberam o tratamento, tendo em vista que o tempo de incubação de 6 horas não é o suficiente para provocar essas mudanças. Em comparação é possível visualizar o aumento expressivo na produção de EROs após esse tempo em todas as linhagens, corroborando com os resultados quantitativos obtidos por espectrofotômetro.

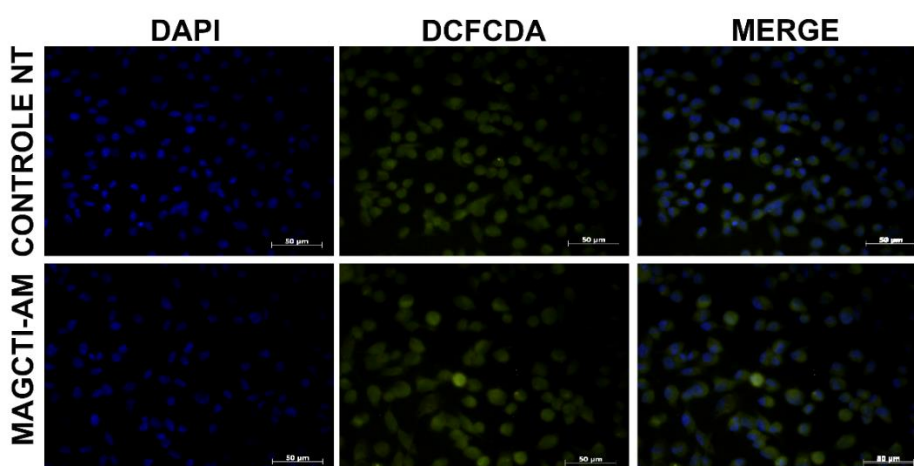
**A**



**B**



**C**



**Figura 40. Produção de EROs nas linhagens tumorais tratadas e não tratadas com MAGCIT-AM. (A) A2780, (B) T-47D e (C) MDA-MB-231. As células foram tratadas com**



MAGCIT-AM a concentração de 0,78  $\mu\text{g/mL}$  de AM por 6 horas ou não receberam o tratamento (controle). A marcação foi realizada com o reagente DCFDA (verde) para EROs e com DAPI (azul) para o DNA. As imagens foram adquiridas em microscópio de fluorescência. Barra de referência 50  $\mu\text{m}$ .

## 6. Discussão

A eliminação de células tumorais sem que ocorra danos às células normais vem sendo o principal desafio no tratamento do câncer (WANG *et al.*, 2014). A distribuição não direcionada e a rápida eliminação dos fármacos pelo organismo leva à administração de elevadas doses terapêuticas para promover um bom prognóstico ao paciente, ocasionando diversos efeitos adversos como, neurotoxicidade, anorexia, fadiga muscular, neutropenia, entre outros (Gilliam & St Clair, 2011; Hashiguchi *et al.*, 2015).

Nesse contexto, métodos de tratamento não invasivos e que apresentem uma maior especificidade para as células neoplásicas, como a nanobiotecnologia, têm sido importantes focos de estudos na comunidade científica. O desenvolvimento de materiais nanoestruturados para o combate ao câncer vêm se destacando por exibir algumas características vantajosas, como o diagnóstico precoce e a entrega direcionada de fármacos (Goldberg, 2019). As nanopartículas magnéticas. (NPMs) possuem um vasto campo de aplicações biomédicas, sendo utilizadas preferencialmente para o tratamento e o diagnóstico do câncer (Lopes, 2012; Rafique *et al.*, 2019). Diante das vantagens encontradas no desenvolvimento de nanossistemas magnéticos, foi escolhido para esse trabalho a síntese de NPMs sendo formada por um núcleo constituído de maghemita e ácido cítrico funcionalizada com um corante histológico, o azul de metileno (AM).

A busca pela produção de nanomateriais para o tratamento direcionado e erradicação de células neoplásicas vem motivando diversos trabalhos em nosso grupo de pesquisa. Dos nanossistemas desenvolvidos anteriormente, diversos deles têm mostrado eficiência na entrega direcionada de drogas, na morte de células tumorais e na ablação de tumores em modelos animais (Carneiro *et al.*, 2011; Chaves *et al.*, 2017; Rocha *et al.*, 2017; Andrade, 2018 Santos *et al.*, 2018). A nanopartícula desenvolvida no presente estudo mostrou-se estável ao longo dos experimentos e qualificada para a realização dos testes celulares, tendo em vista que a ligação eletrostática entre o núcleo magnético e o azul de metileno foi observada pelos resultados de FTIR. Os resultados negativos de potencial zeta favorece a endocitose do nanomaterial por diversas vias, além de manter fisicamente o sistema estável por repulsão eletrostática (Harush *et al.*, 2008; Fröhlich, 2012). Com a análise do efeito fotofísico, foi possível comprovar uma redução na fluorescência do azul de metileno após sua conjugação com o núcleo de maghemita, porém, esse sinal não é completamente suprimido, permitindo ainda que o material seja utilizado em estudos que explorem essa propriedade.

A eficiência do fluido desenvolvido no presente trabalho como um carreador de drogas antitumorais poderia ser aumentada ao se explorar o fato do agente utilizado, azul de metileno, ser fotooxidante, ou seja, possui a capacidade de ser aplicado em terapias fotodinâmicas (Tardivo *et al.*, 2005; Santos *et al.*, 2018). A terapia fotodinâmica surgiu como uma modalidade promissora de terapia contra o câncer envolvendo a combinação de três componentes: fotossensibilizador, luz de comprimento de onda específico e o oxigênio presente nos tecidos e/ou células para a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) (Castano *et al.*, 2006; Santos *et al.*, 2018).

Além de promissor para o tratamento do câncer, o nanossistema desenvolvido também poderia ser utilizado no diagnóstico por imagem. Segundo Johannsen *et al.*, (2007) aproximadamente 90% das nanopartículas injetadas em tecidos são detectadas pela tomografia computadorizada, permitindo uma análise mais precisa. Entretanto a aplicação em detecção por imagem mais estudada para NPMs é a ressonância magnética, tendo em vista que são biocompatíveis e apresentam um maior tempo de circulação do que o agente de contraste comumente utilizado (Kim *et al.*, 2011). Estudos *in vivo*, comprovam a eficiência de NPMs em ressonância magnética tanto após a injeção endovenosa como intraperitoneal (Kou *et al.*, 2008; Cho *et al.*, 2010).

Após a síntese e caracterização da nanopartículas, foi realizada a avaliação da possível citotoxicidade de MAGCIT-AM em células tumorais de mama (MDA-MB-231 e T-47D) e de ovário (A2780) e em células normais (HUVEC e HNTMC) tendo em vista que esse tipo de estudo é um quesito indispensável para o desenvolvimento de novos materiais com aplicações biomédicas (Ankamwar *et al.*, 2010; Sliwka *et al.*, 2016). O teste de viabilidade celular demonstrou que as linhagens tumorais A2780 e T-47D foram mais sensíveis ao tratamento quando comparadas com as linhagens MDA-MB-231, HUVEC e HNTMC, além de elucidar sua toxicidade dose e tempo dependente. As linhagens não tumorais sofreram uma pequena redução em seus parâmetros de viabilidade, porém, esse decréscimo não passou de 60% para a concentração escolhida (0,78 µg/mL de AM), sugerindo uma possível biocompatibilidade e seletividade para as células tumorais. Na literatura científica, tem se observado que nanopartículas magnéticas podem ser consideradas biocompatíveis e não provocarem queda de viabilidade em células cultivadas com uma concentração de ferro de até 10 µg/mL (Ankamwar *et al.*, 2010), fato que corrobora com os resultados encontrados após os testes com MAGCIT realizado no presente trabalho. Além da importância no estudo do núcleo magnético, há diversas evidências que mostram que o azul de metileno possui seletividade tumoral e pode

levar a morte celular pela elevada produção de EROs, que induzem a apoptose e/ou necrose celular decorrente do estresse oxidativo (Tardivo *et al.*, 2005; Santos *et al.*, 2017; Qi *et al.*, 2019).

Foi demonstrado também, que a concentração inibitória de 50% (IC<sub>50</sub>) obtida para MAGCIT-AM em células tumorais, A2780 e T-47D, foram menores que as apresentadas pelo azul de metileno não associado, sugerindo um efeito colaborativo entre o núcleo magnético e o AM para a redução da viabilidade celular, perfil antagonicamente encontrado em células normais (HUVEC e HNTMC). Esse aspecto é considerado favorável tendo em vista que diversos agentes utilizados para o combate ao câncer apresentam alta citotoxicidade para as células normais (Wang *et al.*, 2014).

Por citometria de fluxo foi possível concluir que a morte celular lítica e a necrose são os principais tipos de morte celular causadas pelo nanossistema, fato interessante a ser estudado com o objetivo de ativação do sistema imunológico para o tratamento do câncer. Estudos atuais demonstram a importância da atuação do sistema imune para a terapia do câncer, tendo em vista que o melhor tratamento para essa doença não consiste apenas na erradicação do tumor primário, mas também na ativação do sistema imunológico para reconhecer, rastrear e destruir todas as células tumorais remanescentes que estejam localizadas próximas ao local do tumor primário ou nas micrometástases ao longo do corpo do paciente (Castano *et al.*, 2006; Goldberg, 2019). A destruição de células tumorais por meio da indução de apoptose e necrose é um aspecto importante quando se aborda sobre a utilização das células imunológicas em terapias anti-tumorais, tendo em vista que, no caso da necrose, os constituintes citosólicos que extravasam para o ambiente extracelular através do dano à membrana plasmática provocam um processo inflamatório mais robusto do que na morte celular programada, em que esses produtos são isolados com segurança pela membrana intacta que persistem em células apoptóticas (Castano *et al.*, 2006).

A elevada produção de EROs obtidos nos experimentos realizados ao longo do trabalho, demonstra o grande potencial do nanossistema desenvolvido para o combate ao câncer. Assim como o azul de metileno utilizado na funcionalização do núcleo magnético, MAGCIT, partículas constituídas por maghemita Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> também demonstraram-se como produtoras de EROs, levando ao estresse oxidativo celular. Fato que corrobora com os dados obtidos no trabalho, em que se observa um efeito colaborativo entre MAGCIT e AM na indução da morte de células tumorais (Nel *et al.*, 2009). Diversos autores evidenciam o importante papel das espécies reativas de oxigênio na contribuição direta da morte de células tumorais, no

desligamento da vasculatura tumoral e no combate de micrometástases por meio da indução de vias de transdução de sinais que estão relacionadas com a ativação de células dendríticas (Tacken *et al.*, 2007; Liou & Storz, 2010; Marrache *et al.*, 2013; Qi *et al.*, 2019). O fotossensibilizante utilizado durante o estudo não ocasionou diferença significativa no ciclo celular das células utilizadas, sugerindo que o estresse oxidativo foi a principal causa da morte celular observada ao longo dos experimentos de citotoxicidade das células tumorais, corroborando com os resultados encontrados por Gutter *et al.* (1976) que aborda sobre a migração do AM para o núcleo apenas após a ativação por luz de comprimento de onda específico.

As análises de microscopia de luz e citometria de fluxo permitiram confirmar a internalização de MAGCIT-AM por todas as linhagens estudadas, sendo a clatrina sua principal via de endocitose. Os mecanismos de endocitose envolvidos na internalização celular de nanopartículas ainda estão sendo discutidos na comunidade científica, onde se observam trabalhos controversos acerca da relação entre o tamanho e as vias envolvidas. Alguns estudos sustentam que a internalização de partículas com diâmetros similares aos encontrados em MAGCIT-AM (~50 nm) ocorre pela via da clatrina já, quando esse tamanho se torna superior (~250 nm), a caveolina se torna o caminho predominante para a endocitose, dados que corroboram com o presente trabalho (Nel *et al.*, 2009; Suen & Chau, 2013). Entretanto, esses resultados entram em conflito com outros trabalhos, em que as estimativas de diâmetros entre 50-80 nm e 120 nm correspondem a internalização por caveolina e clatrina, respectivamente (Conner & Schmid, 2003). Além do tamanho, outro fato que corrobora com a via de internalização encontrada é o sítio de localização lisossomal do azul de metileno (Tardivo *et al.*, 2005), reforçando a via da clatrina como a principal via envolvida na endocitose de MAGCIT-AM, tendo em vista que a via da clatrina resulta principalmente no alcance lisossomal e na reciclagem para a superfície celular (Benmerah & Luzamaze, 2007).

Um fato importante a ser considerado no desenvolvimento do trabalho é a falta de atividade de MAGCIT-AM na linhagem MDA-MB-231 que, apesar de ser possível observar a internalização da nanopartícula por meio de microscopia de luz e de citometria, essa linhagem não obteve uma redução expressiva da sua viabilidade celular em nenhum dos tempos e das concentrações estudadas. Com as análises de IC<sub>50</sub>, observa-se que o composto AM não conjugado possui uma maior atividade na citotoxicidade quando comparado ao nanossistema desenvolvido apesar dos perfis de produção de espécies reativas de oxigênio para esses dois tratamentos serem semelhantes. Os resultados obtidos para MDA-MB-231 sugere a necessidade

de um estudo mais aprofundado acerca dos possíveis mecanismos envolvidos em sua resistência por MAGCIT-AM.

Em resumo, os resultados obtidos nesse estudo disponibilizam evidências sobre a utilização de nanopartículas magnéticas acopladas ao azul de metileno para o possível tratamento do câncer de mama e de ovário. O nanossistema desenvolvido (MAGCIT-AM) foi capaz de elevar a produção de espécies reativas de oxigênio ocasionando a morte celular necrótica e apoptótica de duas das três células tumorais estudadas. MAGCIT-AM apresentou uma importante atividade oxidativa contra células T-47D e A2780, com baixa citotoxicidade para as células normais, revelando uma grande vantagem sobre os fármacos atualmente utilizados no combate dessa doença. Desse modo, a composição do nanossistema desenvolvido além de apresentar resultados promissores na citotoxicidade de células tumorais, também pode se tornar um importante agente de diagnóstico precoce e de ativação do sistema imunológico para o reconhecimento e combate de células tumorais localizadas próximas ao tumor primário ou em micrometástases mais distantes.

## 7. Conclusão

Com base nos resultados obtidos neste trabalho é possível concluir que:

- A nanopartícula desenvolvida apresentou diâmetro hidrodinâmico de 60,93 nm e potencial zeta de -20,9, valores que contribuem com sua internalização celular e estabilidade ao longo do tempo observado;
- A eficácia na conjugação do azul de metileno ao núcleo magnético foi observada pela técnica de FTIR, evidenciando uma interação eletrostática;
- A ligação entre o núcleo de MAGCIT e o composto AM ocasiona a troca de carga e a transferência de energia entre os compostos levando a uma diminuição da fluorescência do azul de metileno, porém esse fato não retira por completo o sinal, possibilitando que essa propriedade ainda seja explorada em outros experimentos;
- As linhagens A2780 e T-47D mostraram-se mais sensíveis ao nanossistema, apresentando uma redução expressiva da viabilidade celular (~60%);
- As linhagens não tumorais demonstraram ser mais resistentes ao tratamento MAGCIT-AM em que foi possível observar apenas uma redução máxima de aproximadamente 40% na concentração selecionada (MAGCIT-AM com 0,78 $\mu$ g/mL de AM);
- As análises com os compostos não acoplados (MAGCIT e AM livre) demonstram que, para as linhagens A2780 e T-47D, a nanopartícula se mostra mais eficaz ocasionando uma maior morte celular, fato antagônico para as células normais, em que os compostos livres são mais citotóxicos;
- Por microscopia de luz e de varredura foi possível observar que MAGCIT-AM induz alterações morfológicas nas linhagens tumorais estudadas, como perda dos prolongamentos citoplasmáticos e aumento na rugosidade da superfície celular;
- MAGCIT-AM interfere na recuperação celular após o tratamento, interferindo na posterior formação de colônias pelas células tumorais T-47D e A2780;
- O principal mecanismo envolvido na internalização de MAGCIT-AM é a clatrina em todas as linhagens estudadas observado por citometria de fluxo;
- O nanossistema não foi capaz de alterar significativamente, com exceção da linhagem T-47D, o perfil do ciclo celular nas células estudadas;
- Os dois mecanismos de morte ocasionado MAGCIT-AM são a morte celular lítica e a necrose, contribuindo com posteriores trabalhos voltados para a ativação do sistema imunológico pelo nanossistema;

- A nanopartícula eleva a produção de EROs nas linhagens tumorais estudadas, ocasionando um estresse oxidativo conhecido por ocasionar morte celular;
- A linhagem MDA-MB-231 não foi sensível ao tratamento de MAGCIT-AM mesmo após sua internalização;



## 8. Perspectivas

As perspectivas propostas para a continuidade deste trabalho são:

- Avaliar os mecanismos envolvidos na resistência da célula MDA-MB-231;
- Associação de MAGCIT-AM à terapia fotodinâmica e posterior avaliação da diferença entre o tratamento irradiado e não-irradiado em células tumorais;
- Investigar a atividade de MAGCIT-AM na ativação do sistema imunológico *in vivo*;
- Avaliar *in vivo* os efeitos da terapia mediada por MAGCIT-AM por meio de análises clínicas, bioquímicas, hematológicas assim como a regressão tumoral e sobrevida de camundongos;
- Investigar a relação entre os mecanismos antioxidantes e o tratamento com MAGCIT-AM *in vitro*.

## 9. Referências Bibliográficas

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. *IMUNOLOGIA Celular e Molecular*. 8. Ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2015.

ALMEIDA, J. R. C.; PEDROSA, N. L.; LEITE, J. B.; FLEMING, T. R. P.; CARVALHO, V. H.; CARDOSO, A. A. A. Marcadores Tumorais: Revisão de Literatura. **Revista Brasileira de Cancerologia**, n. 53, v. 3, p. 305-316, 2007.

ALUNE, D.; NAVARRO, R. D. A.; CHAN, D. S.; ABAR, L.; VINGELIENE, S.; VIEIRA, A. R.; GREENWOOD, D. C.; NORAT, T. Anthropometric factors and ovarian cancer risk: a systematic review and nonlinear dose-response meta-analysis of prospective studies. **International Journal of Cancer**, v. 136, p. 1888-1898, 2015.

ANDRADE, B. Y. G. Avaliação da capacidade anti-tumoral de nanopartículas lipídicas sólidas contendo docetaxel em células de carcinoma de ovário sensíveis e resistentes *in vitro*. 2018. 103 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Animal). Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Brasília, 2018.

ANKAMWAR, B.; LAI, T. C.; HUANG, J. H.; LIU, R. S.; HSIAO, M.; CHEN, C. H.; HWU, Y. K. Biocompatibility of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles evaluated by *in vitro* cytotoxicity assays using normal, glia and breast cancer cells. **Nanotechnology**, v. 21, n. 7, p. 75-102, 2010.

BARBOSA, K. B.; COSTA, N. M. B.; ALFENAS, R. C. G.; PAULA, S. O.; MINIM, V. P. R.; BRESSAN, J. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Ver. Nutr.**, v. 23, n. 4, p. 629-643, 2010.

BERAL, V.; PIRIE, K.; REEVES, G. Type and timing of menopausal hormone therapy and breast cancer risk: individual participant meta-analysis of the worldwide epidemiological evidence. **The lancet**, v. 394, p. 1159-1168, 2019.

BENMERAH, A.; LAMAZE, C. Clathrin-Coated Pits: Vive La Différence? **Traffic**, v. 8, n. 8, p. 4367-4373, 2007.

BLACKBURN, N. E.; MC VEIGH, J. G.; MC CAUGHAN, E.; WILSON, I. M. The musculoskeletal consequences of breast reconstruction using the latissimus dorsi muscle for women following mastectomy for breast cancer: A critical review. **European Journal of Cancer Care**, p. 1-10, 2017.

BOERO, I. J.; PARAVATI, A. J.; HOU, J.; GILLESPIE, E. F.; SHOENBUNNER, A.; UNKART, J.; WALLACE, A. M.; EINCK, J. P.; MELL, L. K.; MURPHY, J. D. The Impact of Surgeons on the Likelihood of Mastectomy in Breast Cancer. **Annals of Surgery**, p. 1-8, 2018.

BORUT, P. Strategies for Reducing or Preventing the Generation of Oxidative Stress. **Oxid. Med. Cell Longev**, v. 2011, p. 1-15, 2011.

CARNEIRO, M. L. B.; PEIXOTO, R. C.; JOANITTI, G. A.; OLIVEIRA, R. G.; TELLES, L. A.; MIRANDA-VILELA, A. L.; BOCCA, A. L.; VIANNA, L. M.; SILVA, I. C.; SOUZA, A. R.; LACAVAL, Z. G.; BÁO, S. N. Antitumor effect and toxicity of free rhodium (II) citrate and rhodium (II) citrate-loaded maghemite nanoparticles in mice bearing breast cancer. **Journal Nanobiotechnology**, v. 11, n. 4, p. 1-13, 2013.

CASTANO, A. P.; MROZ, P.; HAMBLIN, M. R. Photodynamic therapy and anti-tumor immunity. **Nature Reviews: Cancer**, v. 6, p. 535-545, 2006.

CHANG, L., WEINER, L. S.; HARTMAN, S. J.; HORVATH, S.; JESTE, D.; MISCHER, P. S.; KADO, D. M. Breast cancer treatment and its effects on aging. **Journal of Geriatric Oncology**, p. 1-10, 2019.

CHAVES, N. L.; ESTRELA-LOPIS, I.; BÖTTNER, J.; GUIDO, B. C.; SOUSA, A. R.; BÁO, S. N. Exploring cellular uptake of iron oxide nanoparticles associated with rhodium citrate in breast cancer cells. **International Journal of Nanomedicine**, v. 12, p. 5511-5523, 2017.

CHEN, Z.; SHI, T.; ZHANG L.; ZHU, P.; DENG, M.; HUANG, C.; HU, T.; JIANG, L.; LI, J. Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family in multidrug resistance: A review of the past decade. **Cancer letters**, v. 1370, n. 1, p. 153-164, 2016.

CHENG, L.; YANG, K.; LI, Y.; ZENG, X.; SHAO, M.; LEE, S. T.; LIU, Z. Multifunctional nanoparticles for upconversion luminescence/MR multimodal imaging and magnetically targeted photothermal therapy. **Biomaterials**, v. 33, p. 2215-2222, 2012.

CHO, Y. S.; YOON, T. J.; JANG, E. S.; HONG, K. S.; LEE, S. Y.; KIM, O. R.; PARK, C.; KIM, Y. J.; YI, G. C.; CHANG, K. Cetuximab-conjugated magneto-fluorescent silica nanoparticles for in vivo colon cancer targeting and imaging. **Cancer Lett.**, v. 299, p. 63-71, 2010.

CONNER, S. D.; SCHMID, S. L. Regulated portals of entry into the cell. **Nature**, v. 422, p. 37-44, 2003.

DECHERNEY, A. H. *et al.* **Current Diagnosis & Treatment Obstetrics & Gynecology**. 11 ed. Nova Iorque: McGraw-Hill, 2016.

DEROSA, M. C.; CRUTCHLEY, R. J. Photosensitized singlet oxygen and its applications. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 233, p. 351-371, 2002.

DUNCAN, R.; GASPAR, R. Nanomedicine (s) under the microscope. **Molecular pharmaceutics**, v. 8, n. 6, p. 2101-2141, 2011.

ELLISON, L. M.; MAN, Y.; STOJADINOVIC, A.; XIN, H.; AVITAL, I. Cytoreductive surgery and hyperthermic intraperitoneal chemotherapy in treatment of gastric cancer with peritoneal carcinomatosis. **Chinese Journal of Cancer Research**, v. 29, n. 1, p. 86, 2017.

ESCOBAR, K. A. Determinação de mutações e polimorfismos nos genes BCRA1 e BCRA2 em pacientes com câncer de mama com indicação para teste genético. 2011. 109 f. Dissertação (Mestrado em Oncologia). Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

FACKENTHAL, J. D.; OLOPADE, O. I. Breast cancer risk associated with BRCA1 and BRCA2 in diverse populations. **Nature Reviews: Cancer**, v. 7, p. 937-948, 2007.

FALCO, M.; MASOJC, B.; ROLLA, M. CZEKALAA, A.; PIETRUSZEWSKA, J.; RUBIK-LESZCZYNSKA, A.; LEWOSKI, M.; LUKOWIAKA, M.; KRAMB, A. Risk factors for seroma evacuation in breast cancer patients treated with intraoperative radiotherapy. **Repeorts of Practical Oncology and Radiotherapy**, v. 21, p. 225-231, 2016.

FILOMENO, C. L. Dispersões de Nanopartículas Magnéticas do tipo Core-Shell  $MFe_2O_4@ \gamma - Fe_2O_3$  em Solventes Polares: Reatividade Eletroquímica e o papel da Interface Óxido/Solução nas propriedades Coloidais. 2015. 146 f. Tese (Doutorado em Química Analítica). Instituto de Química e *Chimie Analytique de Paris Centre*, Universidade de Brasília e Universidade Pierre et Marie Curie, Brasília, Paris, 2015.

FLAVAHAN, W. A.; DRIER, Y.; LIAU, B. B.; GILLESPIE, S. M.; VENTEICHER, A. S.; STEMMER-RACHAMIMOV, A. O.; SUAVÀ, M. L.; BERNSTEIN, B. E. Insulator dysfunction and oncogene activation in IDH mutant gliomas. **Nature**, v. 529, n. 7584, p. 110-114, 2016.

FOUAD, Y. A.; AANEI, C. Reviciting he hallmarks of cancer. **AMJ. Cancer Res.**, v. 5, p. 1016-1036, 2017.

FRANGIONI, J. V. New Technologies for Human Cancer **Imagin. J Clin Oncol.**, v. 26, n. 24, p. 4012-4021, 2008.

FREITAS, B. J. S. A. Possíveis marcadores de estresse oxidativo para câncer de pele não melanoma: efeito da suplementação de vitamina C e E mineral zinco em indivíduos que tiveram câncer de pele não melanoma. 2014. 218 f. Tese (Doutorado em Ciências Médicas). Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, São Paulo. 2014.

FRÖHLICH, E. The role of surface charge in cellular uptake and cytotoxicity of medical nanoparticles. **International Journal of Nanomedicine**, v. 7, p. 5577-5591, 2012.

GALLUZZI, L.; BUQUE, A.; KEPP, O.; ZITVOGEL, L.; KROEMER, G. Immunological Effects of Conventional Chemotherapy and Targeted Anticancer Agents. **Cancer Cell Review**, v. 28, p. 345-356, 2015.

GEYER, F. C.; MARCHIO, C.; REIS-FILHO, J. S. The role of molecular analysis in breast cancer. **Pathology**, v. 41, n. 1, p. 77-88, 2009.

GHARIBVAND, L.; LAWRENCE, B. W.; SHAVLIK, D.; GHAMSARY, M.; SORET, S.; KNUTSEN, S. F. The association between ambient fine particulate matter and incident adenocarcinoma subtype of lung cancer. **Environmental Health**, v. 16, n. 1, p. 1-9, 2017.

GILLIAM, L. A.; ST CLAIR, D. K. Chemotherapy-induced weakness and fatigue in skeletal muscle: the role of oxidative stress. **Antioxid. Redox Signal**, v. 15, n. 9, p. 2543-2563, 2011.

GOLDBERG, M. S. Improving cancer immunotherapy through nanotechnology. **Nature Reviews Cancer**, v. 19, n. 10, p. 587-602, 2019.

GONZALEZ-ÂNGULO, A. M.; MORALES-VASQUEZ, F.; HORTOBAGYI, G. N. Overview of resistance to systemic therapy in patients with breast cancer. **Adv. Exp. Med. Biol.**, v. 608, p. 1-22, 2007.

GORAIN, B.; SHOUDHURY, H.; TEKADE, R. K.; KARAN, S.; JAISANKAR, P.; PAL, T. K. Comparative biodistribution and safety profiling of Olmesartan medozomil oil-in-water oral nanoemulsion. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 82, p. 20-31, 2016.

GUPTA, A. K.; GUPTA, M. Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. **Biomaterials**, v. 26, p. 3995-4021, 2005.

GUTTER, B.; NISHIOKA, Y.; SPECK, W. T.; ROSENKRANZ, H. S.; LUBIT, B.; ERLANGER, B. F. Immunofluorescence for the detection of photochemical lesions in intracellular DNA. **Exptl. Cell. Res.**, v. 102, n. 2, p. 413-416, 1976.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C.; Free radicals in biology and medicine. **Clarendon press Oxford**, 2<sup>a</sup> ed., 1993.

HALLIWELL, B.; CROSS, C. E. Oxygen-derived species: their relation to human disease and environmental stress. **Environ Health Perspect**, v. 102, n. 10, p. 5-12, 1994.

HALLIWELL, B.; WHITEMAN, M.; Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? **Br. J. Pharmacol**, v. 142, n. 2, p. 231-255, 2004.

HALLIWELL, B. Free radicals and oxidants: updating a personal view. **Nutr. Rev.**, v. 70, n. 5, p. 257-265, 2012.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646-674, 2011.

HARUSH, F. O.; ROZENTUR, E.; BENITA, S.; ALTSCHULER, Y. Surface charge of nanoparticles determines their endocytic and transcytotic pathway in polarized MDCK cells. **Biomacromolecules**, v. 9, n. 2, p. 435-443, 2008.

HASHIGUCHI, Y. FUKUDA, T.; ICHIMURA, T.; YASUI, T.; SUMI, T. Chemotherapy-induced neutropenia and febrile neutropenia in patients with gynecologic malignancy. **Anticancer Drugs**, v. 26, n. 10, p. 1054-1060, 2015.

HEITZ, A. E.; BAUMGATNER, R. N.; BAUMGARTNER, K. B.; BOONE, S. D. Healthy lifestyle impact on breast cancer-specific and all-cause mortality. **Breast cancer research and treatment**, v. 167, n. 1, p. 171-181, 2017.

HEJTMANCIK, M. R.; RYAN, M. J.; TOFT, J. D.; PERSING, R. L.; KURTZ, P. J.; CHHABRA, R. S. Hematological effects in f344 rats and b6c3f1 mice during the 13-week gavage toxicity study of methylene blue trihydrate. **Toxicological Sciences**, v. 65, n. 1, p. 126-134, 2002.

HILTON, N.; CLARKE, C. L.; GRAHAM, D. Estrogen and progesterone signalling in the normal breast and its implication for cancer development. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 466, p. 2-14, 2017.

HOWES, B. H. L.; WATSON, D. I.; XU, C.; FOSH, B.; CANEPA, M.; DEAN, N. R. Quality of life following total mastectomy with and without reconstruction versus breast-conserving surgery for breast cancer: A case-controlled cohort study. **Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery**, v. 74, p. 1-8, 2016.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (Brasil). Estimativa/2020. Incidência de Câncer no Brasil, Rio de Janeiro: INCA; 2020. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files//media/document//estimativa-incidencia-de-cancer-no-brasil-2018.pdf>>. Data de acesso: 10 de janeiro de 2018.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. Disponível em: <<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/inca/portal/home>>. Data de acesso: 10 de janeiro de 2018.

JAFFEY, J. A.; HARMON, M. R.; VILLANI, N. A.; CREIGHTON, E. K.; JOHNSON, G. S.; GIGER, U.; DODAM, J. R. Long-term treatment with methylene blue in a dog with hereditary methemoglobinemia caused by cytochrome b5 reductase deficiency. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 31, n. 6, p. 1860-1865, 2017.

JAHANGIRIAN, H.; LEMRASKI, E. G.; WEBSTER, T. J.; RAFIEE-MOGHADDAM, R.; ABDOLLAHI, Y. A review of drug delivery systems based on nanotechnology and green chemistry: green nanomedicine. **International journal of nanomedicine**, v. 12, p. 2957-2978, 2017.

JAYSON, G. C.; HOHN, E. C.; KITCHENER, H. C.; LEDERMANN, J. A. Ovarian cancer. **The Lancet**, v. 384, n. 9961, p. 1376-1388, 2014.

JOHANNSEN, M.; GNEVECKOW, YU.; THIESEN, B.; TAYMOORIAN, K.; CHO, C. G.; WALDÖFNER, N.; SCHOLZ, R.; JORDAN, A.; LOENING, S. A.; WUST, P. Thermotherapy of prostate cancer using magnetic nanoparticles: feasibility imaging, and three-dimensional temperature distribution. **Eur. Urol.**, v. 52, n. 6, p. 1653-1661, 2007.

KIM, B. H.; LEE, N.; KIM, H.; AN, K.; PARK, Y. I.; CHOI, Y.; SHIN, K.; LEE, Y.; KWON, S. G.; NA, H. B.; PARK, J. G.; AHN, T. Y.; KIM, Y. W.; MOON, W. K.; SHOI, S. H.; HYEON, T. Large-scale synthesis of uniform and extremely small-sized iron oxide nanoparticles for high-resolution T1 magnetic resonance imaging contrast agents. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 133, n. 32, p. 12624-12631, 2011.

KOU, G.; WUANG, S.; CHENG, C.; GAO, J.; LI, B.; WANG, H.; QIAN, W.; HOU, S.; ZHANG, D.; DAI, J.; GU, H.; GUO, Y. Development of SM5-1 conjugated ultrasmall superparamagnetic iron oxide nanoparticles for hepatoma detection. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 374, p. 192-197, 2008.

LA VECCHIA, C. Ovarian cancer: epidemiology and risk factors. **European journal of cancer prevention**, v. 26, n. 1, p. 55-62, 2017.

LI, M.; KIM, H. S.; TIAN, L.; YU, M. K.; JON, S.; MOON, W. K. Comparison of Two Ultrasmall Superparamagnetic Iron Oxides on Cytotoxicity and MR Imaging of Tumors, **Theranostics**, v. 2, n. 1, p. 76-85, 2012.

LIM, S. W.; KIM, H. W.; JUN, H. Y.; PARK, S. H.; YOON, K. H.; KIM, H. S.; JON, S.; YU, M. K.; JUHNG, S. K. TCL-SPION-enhanced MRI for the Detection of Lymph Node Metastasis in Murine Experimental Model. **Acad. Radiol.**, v. 18, p. 504-511, 2011.

LIU, G.; STORZ, P. Reactive oxygen species in cancer. **Free Radic. Res.**, v. 44, n. 5, p. 1-31, 2010.

LOBO, R. A. Hormone-replacement therapy: current thinking. **Nature Reviews: Endocrinology**, v. 13, n. 4, p. 1-12, 2016.

LOPES, M. C. P. Conjugação de anticorpo anti-antígeno carcinoembrionário a nanopartículas magnéticas: avaliação do potencial para detecção e tratamento de câncer, 2012. 163 f. Tese (Doutorado em Patologia Molecular). Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília, Brasília, 2012.

LU, A. H.; SALABAS, E. L.; SCHÜTH, F. Magnetic Nanoparticles: Synthesis, Protection, Functionalization, and Application. **Angew. Chem. Int. Ed.**, v. 46, p. 1222-1244, 2007.

MADMOLI, M.; IZADI, M.; MADMOLI, M.; KHODADADI, M.; AHMADI, F. P.; ALIABAD, A. A Systematic Review Study of the Most Important Complications of Chemotherapy in Cancer Patients. **Journal of Biotechnology and Bioengineering**, v. 3, n. 3, p. 2-7, 2019.

MARRACHE, S.; TUNDUP, S.; HAM, D. A.; DHAR, S. Ex Vivo Programming of Dendritic Cell by Mitochondria-Targeted Nanoparticles to Produce Interferon-Gamma for Cancer Immunotherapy. **ASC NANO**, v. 7, n. 8, p. 7392-7402, 2013.

MASSERINI, M. Nanoparticles for Brain Drug Delivery, **ISRN Biochemistry**, p. 1-18, 2013.

MATZ, M.; COLEMAN, M. P.; SANT, M.; CHIRLAQUE, M. D.; VISSER, O.; GORA, M.; ALLEMANI, C. The histology of ovarian cancer: worldwide distribution and implications for international survival comparisons (CONCORD-2). **Gynecologic oncology**, v. 144, n. 2, p. 405-413, 2017.

MISHRA, P. K.; MISHRA, H.; EKIELSKI, A.; TALEGAONKAR, S.; VAIDYA, B. Zinc oxide nanoparticles: a promising nanomaterial for biomedical applications. **Drug discovery today**, v. 22, n. 12, p. 1825-1834, 2017.

MOUBARAK, F.; ATMANI, R.; ELKOUALI, M.; TALBI, M.; GANDAF, Y.; AMARDO, N. Adsorption of methylene blue in solution on activated carbon based of banana peels residue. **International Journal of Scientific & Engineering Research**, v. 9, n. 10, p. 617-622, 2018.

NAROD, S. A.; SALMENA, L. BRCA1 and BRCA2 mutations and breast cancer. **Discovery Medicine**, v. 12, n. 66, p. 445-453, 2011.

NATIONAL CANCER INSTITUTE. Disponível em: <<https://www.cancer.gov/>>. Data de acesso: 10 de janeiro de 2020.



NEL, A. E.; MÄDLER, L.; VELEGOL, D.; XIA, T.; HOEK, E. M. V.; SOMASUNDARAN, P.; KLAESSIG, F.; CASTRANOVA, V.; THOPSON, M. Understanding biophysicochemical interactions at the nano-bio interface. **Nature Materials**, v. 8, p. 543-557, 2009.

NELSON, D. J.; ENGLAND, A.; CHEPTOO, M.; MERCER, C. E. A comparative study of pain experienced during successive mammography examinations in patients with a family history of breast cancer and those who have had breast cancer surgery. **Radiography**, n. 26, v. 1, p. 78-81, 2020.

NG, A.; BARKER, N. Ovary and fimbrial stem cells: biology, niche and cancer origins. **Nature Reviews: Molecular Cell Biology**, v. 16, p. 625-638, 2015.

NOUNOU, M. I.; ELAMRAWY, F.; AHMED, N.; ABDELRAOUF, K.; GODA, S.; SYED-SHA-QHATTAL, H. Breast Cancer: Conventional Diagnosis and Treatment Modalities and Recent Patents and Technologies. **Breast Cancer: Basic and Clinical Research**, v. 9, n. 82, p. 17-34, 2015.

PATCH et al. Whole-genome characterization of chemoresistant ovarian cancer. **Nature**, v. 521, n. 7553, p. 489-494, 2015.

PEDRAZA-ARÉVALO, S.; HORMAECHEA-AGULLA, D.; GÓMEZ-GÓMEZ, E.; REQUENA, M. J.; SELTH, L. A.; GAHETE, M. D.; CASTAÑO, J. P.; LUQUE, R. M. Somatostatin receptor subtype 1 as a potential diagnostic marker and therapeutic target in prostate cancer. **The Prostate**, v. 77, n. 15, p. 1499-1511, 2017.

PORTILHO, F. A., ESTEVANATO, L. L. C.; MIRANDA, V. A. L. *et al.* Investigation of magnetohyperthermia system efficacy. **J. App. Phys**, v. 109, n. 7, p. 307-309, 2010.

QI, T.; CHEN, B.; WANG, Z.; DU, H.; LIU, D.; YIN, Q.; LIU, B.; ZHANG, Q.; WANG, Y. A pH-Activatable nanoparticles for dual-stage precisely mitochondria-targeted photodynamic anticancer therapy. **Biomaterials**, v. 213, p. 1-12, 2019.

RAFIQUE, R.; KAILASA, S. K.; PARK, T. J. Recent advances of upconversion nanoparticles in theranostics and bioimaging applications. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 120, p. 1-70, 2019.

RECZEK, C. R.; CHANDEL, N. S. The Two Faxes of Reactive Oxygen Species in Cancer. **Annu. Rev. Cancer Biol.**, v. 1, p. 79-98, 2017.

ROCHA, M.; ARCANJO, R.; LOPES, C.; CARNEIRO, M.; SOUZA, A.; BÁO, S. N. Modulation of fibronectin and laminin expression by Rhodium (II) citrate-coated maghemite nanoparticles in mice bearing breast tumor. **Scientific Reports**, v. 7, p. 1-11, 2017.

RODRIGUES, M. C. Indução de morte celular imunogênica por terapia fotodinâmica mediada por cloreto de alumínio-ftalocianina incorporado a nanoemulsão em células de câncer de mama murino, 2018. 120 f. Tese (Doutorado em Biologia Animal). Instituto de Biologia, Universidade de Brasília, Brasília, 2018.

ROZENHOLC, A.; SAMOUELIAN, V.; WARKUS, T.; GAUTHIER, P.; PROVENCHER, D.; SAUTHIER, P.; GAUTHIER, F.; DRAKOPOULOS, P.; CORNIER, B. Green versus blue: Randomized controlled trial comparing indocyanine green with methylene blue for sentinel lymph node detection in endometrial cancer. **Gynecologic Oncology**, v. 153, p. 500-504, 2019.

SALZMAN, B. E.; LAMB, K.; Olszewski, R. F.; TULLY, A.; STUDDIFORD, J. Diagnosing Cancer in the Symptomatic Patient. **Primary Care: Clinics in Office Practice**, v. 36, n. 4, p. 651-670, 2009.

SANTOS, A. F.; TERRA, L. F.; WALEMANN, R. A. M.; OLIVEIRA, T. C. GOMES, V. M.; MINEIRO, M. F.; MEOTTI, F. C.; CARDOSO, A. B.; BAPTISTA, M. S.; LABRIOLA, L. Methylene blue photodynamic therapy induces selective and massive cell death in human breast cancer cells. **BMC Cancer**, v. 17, n. 1, p. 1-15, 2017.

SANTOS, M. S. C.; GOUVÊA, A. L.; MOURA, L. D.; PATERNO, L. G.; SOUZA, P. E. N.; BASTOS, A. P.; DAMASCENO, E. A. M.; VEIGA-SOUZA, F. H.; AZEVEDO, R. B.; BÃO, S. N. Nanographene oxide-methylene blue as phototherapies platform for breast tumor ablation and metastasis presentation in syngeneic orthotopic murine model. **Journal of Nanobiotechnology**, 2018.

SEMMLER, L.; RELTER-BRENNAN, C.; KLEIN, A. BRCA1 and Breast Cancer: a Review of the Underlying Mechanisms Resulting in the Tissue-Specific Tumorigenesis in Mutation Carriers. **Journal of Breast Cancer**, v. 22, n. 1, p. 1-14, 2019.

SIEGEL, R. L.; MILLER, K. D.; JEMAL, A. Cancer Statistics, 2018. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 68, n. 1, p. 7-30, 2018.

SILMAN, I.; ROTH, E.; PAZ, A.; TRIQUIGNEAUX, M. M.; EHRENSHAFT, M.; XU, Y.; SHNYROV, V. L.; SUSSMAN, J. L.; DOTERDING, L. J.; ASHANI, Y.; MASON, R. P.; WEINER, L. The specific interaction of the photosensitizer methylene blue with acetylcholinesterase provides a model system for studying the molecular consequences of photodynamic therapy. **Chemico-Biological Interactions**, v. 203, p. 63-66, 2013.

SHAABAN, A. M.; REZVANI, M.; BASKIN, H. J.; MOURAD, A.; FOSTER, B. R.; JARBOE, E. A.; MENIAS, C. O. Ovarian malignant germ cell tumors: cellular classification and clinical and imaging features. **Radiographics**, v. 34, n. 3, p. 777-801, 2014.

SLIWKA, L.; WIKTORSKA, K.; SUCHOCKI, P.; MILCZAREK, M.; MIELCZAREK, S.; LUBELSKA, K.; CIERPIAL, T.; LYZWA, P.; KIELBASINSKI, P.; JAROMIN, A.; FLIS, A.; CHILMONCZYK, Z. The Comparison of MTT and CVS Assays for the Assessment of Anticancer Agent Interactions. **PLoS ONE**, v. 11, n. 5, p. 1-17, 2016.

STEWART, C. J. R.; STEWART, L. M.; HOLMAN C. D. J.; JORDAN, S.; SPILSBURY, K.; THRELFALL, T. Value of Pathology Review in a Population-based Series of Ovarian Tumors. **International Journal of Gynecological Pathology**, v. 36, n. 4, p. 377-385, 2017.

SUEN, W. L. L.; CHAU, Y. Size-dependent internalization of folate-decorated nanoparticles via the pathways of clathrin and caveolae-mediated endocytosis in ARPE-19 cells. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 66, p. 564-573, 2013.

TACKEN, P. J.; JOLANDA, M. V.; TORENSMA, R.; FIGDOR, C. G. Dendritic-cell immunotherapy: from *ex vivo* loading to *in vivo* targeting. **Nature Reviews: Immunology**, v. 7, p.790-802, 2007.

TARDIVO, J. P.; GIGLIO, A. D.; OLIVEIRA, C. S.; GABRIELLI, D. S.; JUNQUEIRA, H. C.; TADA, D. B.; SEVERINO, D.; TURCHIELLO, R. F.; BAPTISTA, M. S. Methylene blue in photodynamic therapy: From basic mechanisms to clinical Applications. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 2, n. 3, p. 175-191, 2005.

TAYLOR, C. W.; KIRBY, A. M. Cardiac Side-effects From Breast Cancer Radiotherapy. **Clinical Oncology**, v. 11, p. 621-629, 2015.

THOMAS, J. A. Estresse oxidativo e defesa contra antioxidantes. In: Shils M. E. *et al.* Tratado de nutrição moderna saúde e na doença. 9ª ed. Versão 1. São Paulo: Manole, 2003.

VALKO, C. J.; RHODES, J.; MONCOL, M.; IZAKOVIC, M.; MAZUR, M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chem. Biol. Interact.**, v. 160, p. 1-40, 2006.

VASCONCELOS, S. M. L.; GOULART, M. O. F.; MOURA, J. B. F.; BENFATO, V. M.; BENFATO, M. S.; KOBOTA, L. T. Espécies Reativas de Oxigênio e Nitrogênio, antioxidantes e marcadores do dano oxidativo no sangue humano: Principais métodos analíticos para sua determinação. **Química Nova**, v. 30, n. 5, p. 1323-1338, 2007.

WANG, J.; WEI, W.; ZHANG, R.; LIU, S.; HUANG, Y. Anti-EGFR antibody conjugated silica nanoparticles as probes for lung cancer detection, **Experimental and Therapeutic Medicine**, v. 14, n. 4, p. 3407-3412, 2017.

WANG, N.; SWITALSKA, M.; WU, M. Y. *et al.* Synthesis and in vitro cytotoxic effect of 6-amino-substituted 11H- and 11Me-indolo[3,2-c]quinolines. **European journal of medicinal chemistry**, v. 78C, p. 314-323, 2014.

WEBB, P. M.; JORDAN, S. J. Epidemiology of epithelial ovarian cancer. **Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynecology**, v. 41, p. 3-14, 2017.

WEINBERG, R. A. **The biology of Cancer**. Second. Garland Science, Taylor & Francis Group, LLC, 2014.

WERNER, M. E.; FOOTE, M. B.; WANG, A. Z. Chemoradiotherapy of Human Tumors: Novel Approaches from Nanomedicine. **Curr. Pharm. Des.**, v. 18, n. 19, p. 2830-2837, 2012.

WIDIANTI, M. O.; YONA, S.; MASFURI, WALUYO, A. Body Image, Social Support, Effects of Chemotherapy, and Sexual Desire in Breast Cancer Patients. **Journal of International Dental and Medial Research**, v. 12, n. 1, p. 323-330, 2018.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Cancer. Disponível em: < [https://www.who.int/health-topics/cancer#tab=tab\\_1](https://www.who.int/health-topics/cancer#tab=tab_1)>. Data de acesso: 10 de janeiro de 2020.

WU, P.; LIN, C.; LIN, C.; CHANG, N.; TSAI, W.; YU, J. Methylene-Blue-Encapsulated Liposomes as Photodynamic Therapy Nano Agents for Breast Cancer Cells. **Nanomaterials**, v. 9, n. 14, p. 1-12, 2018.

YAROSLAVSKY, A. N.; FENG, X.; MUZIKANSKY, A.; HAMBLIN, M. R. Fluorescence Polarization of Methylene Blue as a Quantitative Marker of Breast Cancer at the Cellular Level. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1-10, 2019.

YIGIT, M. V.; MOORE, A.; MEDAROVA, Z. Magnetic Nanoparticles for Cancer Diagnosis and Therapy. **Pharm. Res.**, v. 29, n. 5, p. 1180-1183, 2012.