



Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal

ESTUDO DA INTERAÇÃO ENTRE NANOPARTÍCULAS DE MAGNETITA ASSOCIADAS AO CITRATO DE RÓDIO E CÉLULAS DE CÂNCER DE MAMA

NATALIA LEMOS CHAVES

**Tese de doutorado apresentada ao Programa
de Pós Graduação em Biologia Animal, UnB.
Orientadora: Prof^a. Dra. Sônia Nair Bão.
Brasília, 2017.**

Dedico este trabalho aos meus amados pais.

AGRADECIMENTOS

À minha família: minha mãe, Valdivina, meu pai, Antônio e meu irmão, Neikson por todo amor incondicional, apoio e por sempre me proporcionarem momentos de descontração e relaxamento que contribuíram imensamente para renovar minha energia semanal. Por toda torcida, valores e envolvimento.

Ao meu companheiro, Cláudio pela compreensão, parceria em todos os sentidos, paciência, apoio e suporte sempre. Por estar comigo sempre me encorajando e me impulsionando em direção a minha melhor versão. Agradeço também pelos trabalhos colaborativos nas análises de células migratórias e análises de nanopartículas em imagens obtidas por microscopia eletrônica. Sem você, com certeza não chegaria aonde eu cheguei nem como cheguei.

À Deus que no seu plano divino me proporcionou uma vida repleta de boas oportunidades e de pessoas certas.

À professora Sônia, quem eu muito admiro, pela oportunidade me dada, pela orientação e por todo apoio que possibilitou a execução de mais esse trabalho.

Ao Instituto de Ciências biológicas, ao Laboratório de Microscopia eletrônica e a todo o grupo da microscopia que, sem exceção, são todos muito agradáveis e me proporcionaram momentos realmente especiais e inesquecíveis nessa trajetória. Em especial agradeço a amizade e companhia de Yasmim, Ingrid, Misléia, Karine, Mayara, Weskly, Ana Luíza, Tati, Taíssa, Joseilma, Ana Luíza e Shaiane. Ao meu colega, Danilo, pela amizade e imensa ajuda nos experimentos.

Ao professor José Raimundo pelos auxílios e sugestões; aos seus alunos, especialmente, Bruna, Núbia, Lorena e Dani que igualmente foram excepcionais colegas e parceiros. Em especial, agradeço a Bruna pela amizade, disponibilidade e colaboração nos experimentos de Western Blot de proteínas endocíticas.

À professora Marcella Bretas pelas ótimas parcerias e colaborações a mim confiadas.

À professora Irina Estrela-Lopis por me receber em seu laboratório, pelas ótimas sugestões, por me oferecer seu ponto de vista crítico e me proporcionar o aprendizado de novas técnicas sempre no sentido de me ajudar a melhorar esse trabalho.

À Universidade de Leipzig e o *Institut für Medizinische Physik und Biophysik* na Alemanha e todo seu grupo de trabalho, especialmente, Caro, Julia, Thomas, Tom, Jana e Tobias, que tornaram tão agradável e inesquecível essa experiência. ´

Às agências de fomento, CNPq, FINEP e FAPDF pela viabilização do trabalho e a CAPES pela bolsa de estudo para o doutorado sanduíche que foram essências na consolidação desse trabalho.

A todos que não foram aqui mencionados, mas que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

“Conhece-te a ti mesmo, torna-te consciente de tua ignorância e serás sábio.”
(Sócrates)

RESUMO

Os nano carreadores têm o potencial de melhorar o índice terapêutico dos medicamentos atualmente disponíveis, aumentando a eficácia do fármaco, reduzindo sua toxicidade, e alcançando níveis terapêuticos por um período prolongado. A associação de citrato de ródio II (RC) com nanopartículas (NPs) magnéticas pode aumentar a especificidade da ação citotóxica, uma vez que estes complexos podem ser guiados ou transportados para um alvo através da utilização de um campo magnético externo. No entanto, a interação de nanopartículas de maghemita associada a citrato de ródio (MRC) com células, o mecanismo de captação celular, e a localização subcelular ainda não são compreendidos. Este trabalho avalia o mecanismo de captação de nanopartículas de maghemita associadas a citrato de Ródio (MRC) em linhagens de células de câncer de mama metastático e não metastático comparando-as com um modelo celular não tumoral. É possível supor que a captação de MRC NPs em células de câncer da mama é mais eficaz do que em células não tumorais, tanto na quantidade de material internalizado como na distribuição intracelular mais estratégica. Além disso, este processo ocorre através da via de endocitose dependente de clatrina com diferentes níveis de expressão basal desta proteína nas linhagens celulares testadas. MRC é um nano material promissor que pode fornecer uma rota conveniente para direcionamento de fármacos e tratamento do câncer de mama. Conjuntamente, nossos dados sugerem que as NPs MRC atuam no núcleo, inibindo a síntese de DNA e a proliferação celular e induzindo a morte celular. Os efeitos foram verificados em ambas linhagens tumorais (MCF-7 e MDA-MB-231), mas as células metastáticas de câncer de mama, MDA-MB-231, parecem ser mais responsivas aos efeitos das NPs.

Palavras chaves: Endocitose, nanotecnologia, mecanismo de ação, anti-metastático.

SUMMARY

Nanocarriers have the potential to improve the therapeutic index of currently available drugs by increasing drug efficacy, lowering drug toxicity, and achieving steady state therapeutic levels of drugs over an extended period of time. The association of rhodium (II) citrate (RC) with magnetic nanoparticles (NPs) has the potential to increase specificity of the cytotoxic action, since these complexes can be guided or transported to a target by the use of an external magnetic field. However, these nanoparticles interaction with cells, their uptake mechanism, and subcellular localization are not understood. This work evaluates the uptake mechanism of Maghemite nanoparticles with Rhodium citrated associated (MRC) nanoparticles in a metastatic and non-metastatic breast cancer cell models comparing them to a non-tumor cell line. It is possible to assume that MRC NPs uptake in breast cancer cells is more effective than in normal cells both in amount of internalized material and in the achievement of a more strategic intracellular distribution. Moreover, this process occurs through clathrin-dependent endocytosis pathway with different basal expression levels of this protein in the tested cell lines. Taken together, our data suggest that MRC NPs act in cells nuclei, inhibiting DNA synthesis and cell proliferation inducing cell death. The effects were verified in both tumor cells but the metastatic line, MDA-MB-231, seemed to be more responsive to MRC NPs effects.

Keywords: Endocytosis, nanotechnology, action mechanism, anti-metastatic.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	2
RESUMO.....	5
SUMMARY.....	6
LISTA DE FIGURAS.....	9
LISTA DE TABELAS.....	9
LISTA DE ABREVIATURAS.....	10
1. INTRODUÇÃO.....	13
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	15
2.1 CÂNCER DE MAMA.....	15
ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS.....	15
TRATAMENTO.....	16
ALTERNATIVAS PARA TRATAMENTO DE CÂNCER BASEADAS EM COMPOSTOS METÁLICOS E NANOTECNOLOGIA.....	19
2.2 INTERAÇÃO ENTRE NANOPARTÍCULAS E CÉLULAS.....	24
CAPTAÇÃO CELULAR.....	25
ENDOCITOSE EM NANOESCALA.....	28
2.5 AÇÃO DA NANOPARTÍCULA EM CÉLULAS TUMORAIS.....	32
EFEITO ANTI-MESTÁTICO DE NPS.....	33
USO DE NANOPARTÍCULAS ANTITUMORAIS PARA SUPERAR A RESISTÊNCIA A MÚLTIPLOS FÁRMACOS (MDR).....	34
3. JUSTIFICATIVA.....	36
4. OBJETIVOS.....	37
4.1 OBJETIVO GERAL.....	37
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	37
5. MATERIAIS E MÉTODOS.....	39
5.1 CÉLULAS UTILIZADAS.....	39
5.2 FÁRMACO, REAGENTES E EQUIPAMENTOS.....	39
5.3 CULTURA DE CÉLULA.....	42
5.4 TRATAMENTO DAS CÉLULAS.....	42
5.5 CARACTERIZAÇÃO DOS FLUIDOS MAGNÉTICOS.....	44
5.6 ESTUDO DA INTERNALIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE MRC.....	45
ANÁLISE DA INTERNALIZAÇÃO CELULAR DE MRC POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA.....	45
LOCALIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS INTRACELULAR POR MICROESPECTROSCOPIA DE RAMAN.....	47
ESTUDO DE ENDOCITOSE.....	48

5.7	ANÁLISE DA ATIVIDADE ANTITUMORAL DE NPS MRC.....	49
	AVALIAÇÃO DE CITOTOXICIDADE	49
	EFEITO DE NPS MRC NA SÍNTESE DE DNA E NO CICLO CELULAR	49
	TESTE DE MIGRAÇÃO CELULAR	51
	AVALIAÇÃO DE RESISTÊNCIA CELULAR INDUZIDAS POR MRC	52
	ENSAIO DE MIGRAÇÃO CELULAR	54
5.1	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	55
6.	RESULTADOS E DISCUSSÕES	55
6.1	CARACTERIZAÇÃO DOS FLUÍDOS MAGNÉTICOS	55
6.2	ANÁLISE ULTRAESTRUTURAL DA INTERNALIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE MRC EM CÉLULAS.....	57
6.3	CO-LOCALIZAÇÃO DE NPS POR MICROSCOPIA CONFOCAL DE RAMAN	60
6.4	EFICIÊNCIA DA CAPTAÇÃO CELULAR DE NPS	68
6.5	ESTUDO DE ENDOCITOSE.....	70
6.6	ANÁLISE DE CITOTOXICIDADE	78
6.7	ACUMULO DE MRC E SEU EFEITO NAS CÉLULAS TUMORAIS	81
6.8	AVALIAÇÃO DE EXPRESSÃO DE GLICOPROTEÍNA-P (GPP) EM CÉLULAS TUMORAIS TRATADAS COM MRC.....	84
6.9	EFEITO DAS NANOPARTICULAS DE MRC NA REPLICAÇÃO DE DNA E CICLO CELULAR	87
6.10	ENSAIO DE MIGRAÇÃO CELULAR.....	91
7.	CONCLUSÕES.....	93
8.1	PERSPECTIVAS.....	96
9.1	REFERÊNCIAS	97
10.	ANEXOS	107
10.1	ARTIGO CIENTÍFICOACEITO PARA PUBLICAÇÃO	107
10.2	CAPÍTULO DE LIVRO	121

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. REPRESENTAÇÃO DA ASSOCIAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE MAGHEMITA ASSOCIADAS A CITRATO DE RÓDIO.....	23
FIGURA 2. REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA INTERFACE ENTRE UMA NANOPARTÍCULA E A BICAMADA LIPÍDICA DE UMA MEM-BRANA CELULAR.....	25
FIGURA 3. CINÉTICA DE CAPTAÇÃO DE MRC EM CÉLULAS MCF-7.....	43
FIGURA 4. ORGANOGRAMA DAS ANÁLISES REALIZADAS NO TRABALHO.....	45
FIGURA 5. NANOPARTÍCULAS DE MAGHEMITA ASSOCIADAS AO CITRATO (MC) E ASSOCIADAS AO CITRATO DE RÓDIO (MRC) DILUÍ-DAS EM MEIO DE CULTURA (DMEM) POR 6 HORAS A TEMPERATURA AMBIENTE. ...	57
FIGURA 6. MICROGRAFIAS ELETRÔNICAS DE CÉLULAS EXPOSTAS A MRC POR 6 H.	59
FIGURA 7. ANÁLISE DO DIÂMETRO HIDRODINÂMICO (H.D) EM MEIOS DE CULTURA.	60
FIGURA 8. IDENTIFICAÇÃO DO ESPECTRO DE NANOPARTÍCULAS.	62
FIGURA 9. LOCALIZAÇÃO INTRACELULAR DE NANOPARTÍCULAS MRC POR MICROSCOPIA CONFOCAL DE RAMAN.	64
FIGURA 10. ESPECTROS DAS REGIÕES DE INTERESSE (LIPÍDEOS, NPS, NÚCLEO E CITOPLASMA) DE CÉLULAS MDA-MB-231 E MCF-7 MOSTRANDO A CO-LOCALIZAÇÃO DE MRC COM VESÍCULAS ENDOCÍTICAS.	66
FIGURA 11. EFICIÊNCIA DA CAPTAÇÃO DE MRC.....	70
FIGURA 12. ESTUDO DE ENDOCITOSE.....	75
FIGURA 13. EXPRESSÃO RELATIVA DE CLATRINA.....	76
FIGURA 14. INIBIÇÃO DAS VIAS DE ENDOCITOSE DEPENDENTE DE CLATRINA E CAVEOLINA.	77
FIGURA 15. VIABILIDADE CELULAR APÓS TRATAMENTO COM INIBIDORES DE ENDOCITOSE.....	78
FIGURA 16. VIABILIDADE CELULAR DE LINHAGEM METASTÁTICA DE CÂNCER DE MAMA (MDA-MB-231), LINHAGEM NÃO METASTÁTICA DE CARCINOMA MAMÁRIO (MCF-7) E NÃO TUMORAIS (HNTMC).....	80
FIGURA 17. ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS EM CÉLULAS TUMORAIS INDUZIDAS POR MRC.....	83
FIGURA 18. MICROESPECTROSCOPIA DAS CÉLULAS DE CÂNCER DE MAMA APÓS 48 H DE TRATAMENTO COM MRC.....	84
FIGURA 19. PRODUÇÃO DE GLICOPROTEÍNA-P EM CÉLULAS MCF-7 E MDA-MB-231.....	86
FIGURA 20. EFEITO DE NPS MRC NA SÍNTESE DE DNA DE CÉLULAS MDA-MB-231 E MCF-7.	89
FIGURA 21. ANÁLISE DO CICLO CELULAR..	90
FIGURA 22. ANÁLISE DA CAPACIDADE DE MIGRAÇÃO CELULAR DE MDA-MB-231 APÓS TRATAMENTO COM NPS.	92
FIGURA 23. ESQUEMA DA INTERNALIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS MRC DEPENDENTE DE CLATRINA EM CÉLULAS DE CÂNCER DE MAMA MDA-MB-231 (A) E MCF-7 (B) E CÉLULAS NÃO TUMORAIS HNTMC (C).	95

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS.....	56
TABELA 2. RESUMO DOS PICOS EM DESTAQUE NO ESPECTRO.....	67

LISTA DE ABREVIATURAS

4T1: Linhagem de câncer de mama murina

A549: Células do epitélio basal de adenocarcinoma alveolar

APs: Proteínas adaptativas

ATCC: *American Type Culture Collection*

ATP: Adenosina trifosfato

BrdU: Bromodesoxiuridina

CLASPs: Proteínas de triagem associadas a clatrina

cm: Centímetros

CME: Endocitose mediada por clatrina

CRM: *Confocal Raman microscopy*

CTRL: Controle

DLS: *Dynamic light scattering*

DMEM: *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

DMSO: Dimetilsulfóxido

DNA: Ácido desoxirribonucleico

EPR: Enhanced Permeability and Retention

ER: Receptor de estrógeno

EDS: *Energy Dispersive X-ray Spectroscopy*

EDTA: Ácido etilenodiamino

EUA: Estados Unidos da América

FAC: Fluorouracil, doxorrubicina, ciclofosfamida

FEC: Fluorouracil, epirrubicina e ciclofosfamida

FSC: *Forward Scatter*

GSK3 β : Glicogênio sintase quinase-3 β

GLs: Gotículas lipídicas

GPP: Glicoproteína P

h.d.: Diâmetro hidrodinâmico

HeLa: Linhagem de células extraídas de câncer cervical

HRP: *Horseradish peroxidase*

HepG2: Células de câncer hepático humano

HNTMC: *human non-tumor mesenchymal cells*

IC50: Meia concentração inibitória máxima

kDa: Kilodalton

kV: kilovolts

L15: Meio de cultura Leibovitz

LacCer: Lactosil-ceramida

M: Molar

µl: Microlitro

µm: Micrometro

mM: Milimolar

mm: Milímetro

µM: Micromolar

MβCD: Metil-beta ciclodextrina

MDR: Resistência a multifármacos

MDA-MB-231: Linhagem celular de adenocarcinoma mamário humano metastático

MC: Maghemita associada ao citrato

MCF-7: Linhagem de células de adenocarcinoma mamário humano não metastático

MET: Microscópio Eletrônico de Transmissão

MEV: Microscópio Eletrônico de Varredura

MRC: Maghemita associada ao Citrato de Ródio

MRP: Proteína Associada com Resistência a Multidroga

MTT: Brometo de 3(4,5dimetiltiazol-2il)-2,5-difenil-tetrazólio

mV: Milivolts

mW: Megawatt

nm: Nanômetros

NPs: Nanopartículas

PAGE: *PolyAcrylamide Gel Electrophoresis*

PBS: Solução tamponada de fosfato

PDI: Índice de Polidispersão

PEO-PCL: Nanopartículas poliméricas epsilon-caprolactona

pH: Potencial hidrogeniônico

RC: Citrato de ródio

Rh: Ródio

RNase: Ribonuclease

r.p.m: Rotações por minuto

RPMI: Meio de cultura *Roswell Park Memorial Institute*

SDS: *Sodium Dodecyl Sulfate*

SFB: Soro Fetal Bovino

SSC: *Side Scater*

T: Temperatura

THP1: Linhagem de células monocítica humana

Tris:Trisaminometano

V: volts

VRC: Vesículas revestidas com clatrina

WB: Wester blot

1. INTRODUÇÃO

Ao longo dos últimos anos, o campo da nanotecnologia surgiu como uma abordagem moderna com o potencial de desenvolver novas aplicações diagnósticas e terapêuticas (Azzawi et al. 2016). A escala de tamanho dos nanomateriais permite um melhor acesso aos constituintes biológicos. Entre outras aplicações, o direcionamento para células cancerígenas permite a entrega de fármacos altamente específica e localizada (Banks 2016). Neste contexto, as nanopartículas de óxido de ferro são uma grande promessa como agentes diagnósticos e terapêuticos em oncologia. Suas propriedades físicas intrínsecas são particularmente interessantes para administração simultânea de fármacos, imageamento e aplicações como hipertermia localizada (Lv et al. 2015; Quinto et al. 2015). Essas características únicas fornecem boas perspectivas especialmente para o tratamento e diagnóstico do câncer de mama devido à alta incidência, resistência a drogas e risco de recorrência relacionado a esta doença (Harmon et al. 2015; Kossatz et al. 2015; Karakatsanis et al. 2016).

As características estruturais únicas de muitos tumores sólidos, incluindo hipervascularização, arquitetura vascular defeituosa e drenagem linfática prejudicada, que favorece o bem-caracterizado efeito de aumento de permeabilidade e retenção (EPR) que resulta no maior acúmulo de partículas nos tumores, são fatores-chave no avanço desta plataforma tecnológica (Maeda et al. 2013). No entanto, o efeito EPR e, em geral, a exposição tumoral a um nanofármaco, depende de muitos outros fatores além da permeabilidade local do endotélio dos vasos sanguíneos tumorais e da circulação prolongada,

como o grau de hipóxia, heterogeneidade do tumor e de seu estroma (Wicki et al. 2015). Trabalhos recentes sugerem que os esforços devem ser direcionados para a compreensão das correlações entre a biologia das células tumorais e os comportamentos das nanopartículas. Uma vez que o câncer é uma doença heterogênea, desenvolver nanomateriais para superar um desafio bem definido em um tipo particular de célula tumoral tem maior chance de sucesso (Cook et al. 2014; Wicki et al. 2015; Hare et al. 2017).

Muitos estudos têm relacionado os diferentes tamanhos, composição e carga das nanopartículas com seu processo de internalização e localização nas células (Verma & Stellacci, 2010; Albanese et al. 2012). No entanto, apesar de alguns trabalhos mencionarem o tipo celular como um fator importante para avaliar esse processo (Nel et al. 2009; Chou et al. 2011), poucos experimentos comparam a absorção de uma mesma nanopartícula em diferentes linhagens celulares.

Estudos atuais com nanopartículas de maghemite, um composto de óxido de ferro, demonstraram ação citotóxica específica *in vitro* e *in vivo* para células alvo e esses resultados indicaram esta nanopartícula como uma opção promissora para a entrega de drogas (Estelrich et al. 2015; Kossatz et al. 2015). Nosso grupo tem investigado a atividade antitumoral do citrato de rádio associado com nanopartículas de maghemita (MRC) em células de câncer de mama (Carneiro et al. 2011; Chaves et al. 2015). Apesar das boas perspectivas do citrato de rádio como agente antitumoral (Zyngier et al. 1989), existem poucos trabalhos abordando esse composto, principalmente em relação ao seu mecanismo de ação. Nesse contexto, a proposta desse

trabalho é avaliar as interações entre nanopartículas de maghemita associada ao citrato de ródio (MRC) em diferentes linhagens tumorais de câncer de mama, a avaliar o comportamento das nanopartículas em tempo prolongado de exposição e comparar sua eficácia em células diferentes para eleger o modelo mais responsivo, associando-o ao mecanismo de ação.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 CÂNCER DE MAMA

ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS

O câncer de mama é o carcinoma mais frequente em mulheres e a segunda causa mais comum de mortalidade relacionada ao câncer entre elas em todo o mundo. Estimava-se, aproximadamente 61.000 e 246.000 novos casos de carcinoma de mama *in situ* e invasivo, respectivamente, a serem diagnosticados em 2016 nos EUA. Dentro desse mesmo período, o câncer de mama seria responsável por cerca de 40.500 mortes entre as mulheres neste país (Siegel et al. 2016). Houve um declínio nas taxas de mortalidade por câncer nas últimas duas décadas, impulsionado pela diminuição contínua das taxas de mortalidade por câncer de mama feminino, que redu-

ziram 36%, provavelmente como resultado de melhorias na detecção precoce e no tratamento (Berry et al. 2005; Howlader et al. 2013). Em contraste, as taxas de incidência de câncer de mama aumentaram nos homens. Algumas correlações sugestivas sobre o aumento da taxa de câncer envolvem mudanças nos fatores de risco ambientais e a obesidade (Schmid et al. 2015; Siegel et al. 2016).

Relativamente raro antes dos 35 anos, acima desta faixa etária sua incidência cresce rápida e progressivamente. Estatísticas indicam aumento de sua incidência tanto nos países desenvolvidos quanto nos em desenvolvimento. Segundo a Organização Mundial da Saúde, nas décadas de 60 e 70 registrou-se um aumento de 10 vezes nas taxas de incidência ajustadas por idade nos Registros de Câncer de Base Populacional de diversos continentes (WHO, 2007).

TRATAMENTO

Um importante parâmetro utilizado para escolha do melhor tipo de tratamento é o nível de estadiamento do câncer de mama. O estadiamento clínico do câncer de mama envolve o cálculo aproximado do tamanho do tumor e a estimativa do envolvimento dos linfonodos axilares pelo exame físico e a mamografia. Os tumores podem ser classificados em: Estágio I (tumores < 2 cm e confinados à mama), Estágio II (tumores < 5 cm com envolvimento ou

não dos linfonodos axilares móveis), Estágio IIIa (tumores > 5 cm, acompanhados ou não por comprometimento de linfonodos axilares), Estágio IIIb (lesões mais avançadas) e Estágio IV (todos os tumores com metástase (Smeltzer et al. 2002).

As modalidades terapêuticas mais comumente utilizadas para o câncer de mama são a cirurgia e a radioterapia para o tratamento loco-regional e quimioterapia e hormonioterapia para tratamento sistêmico (Goldhirsch et al. 2011). No câncer de mama inicial com o tumor detectado somente na mama ou no caso de mulheres com nódulo-positivo, o nódulo ou mama pode ser removido cirurgicamente. No entanto, resíduos não detectados de tecido tumoral podem permanecer e se não tratados podem se desenvolver (CTSU, 2005).

Mesmo os mais antigos agentes profiláticos, usados tais como seis meses de FAC (fluorouracil, doxorubicina, ciclofosfamida) ou FEC (fluorouracil, epirrubicina e ciclofosfamida), ou cinco anos de tamoxifeno como recomendado pelo instituto de Saúde dos EUA publicado em uma conferência em 2000 (Pane 2001), serem capazes de reduzir, aproximadamente, pela metade a taxa de mortalidade por câncer-ER positivo, riscos significativos de recorrência e de morte permanecem, principalmente se forem considerados tanto a primeira como a segunda década da doença (CTSU, 2005).

Além disso, muitos fármacos utilizados atualmente para o tratamento de câncer de mama, não se acumulam seletivamente no tecido tumoral. Assim como a maioria dos agentes farmacêuticos administrados pela via intravenosa, que são uniformemente distribuídos para todos os órgãos e tecidos do corpo. Devida a alta pressão intersticial no ambiente tumoral, o acúmulo

de agentes citotóxicos nas lesões neoplásicas é especialmente baixo (Boslet et al. 1998; Allen & Cullis 2004; Trédan et al. 2007).

Os tumores geralmente consistem em populações mistas de células malignas, algumas das quais são sensíveis aos fármacos, enquanto outras são resistentes. A quimioterapia atua em células sensíveis à droga, mas não atinge uma grande proporção de células resistentes. À medida que o tumor começa a crescer novamente, a quimioterapia pode falhar porque as células tumorais remanescentes se tornaram resistentes. Resistência à terapia tem sido correlacionada com a presença de pelo menos duas "Bombas" moleculares que ativamente expulsam as drogas quimioterápicas das células do tumor. As bombas comumente encontradas para conferir quimiorresistência em câncer são a glicoproteína-P (GPP) e a chamada proteína associada com a resistência a multidrogas (MRP). Assim, esta ação impede os efeitos da droga nas células tumorais, que atuaria no interior da célula, no núcleo ou no citoplasma. (Persidis, 1999).

Obstáculos adicionais associados à quimioterapia convencional com apenas uma droga incluem a acessibilidade limitada do fármaco ao tecido tumoral, induzindo a elevação da dose, levando a citotoxicidade intolerável e não específica (Das et al. 2009).

Considerando tais fatores limitantes para o tratamento do câncer de mama, são necessárias novas abordagens terapêuticas que sejam mais específicas para células tumorais e possam eliminar ou reduzir as chances de reincidência da doença.

ALTERNATIVAS PARA TRATAMENTO DE CÂNCER BASEADAS EM COMPOSTOS METÁLICOS E NANOTECNOLOGIA

COMPOSTOS METÁLICOS

A cisplatina foi um dos primeiros complexos metálicos a ser avaliado em relação à atividade antitumoral (Rosenberg & Vancamp 1969). Baseando-se nas boas perspectivas obtidas com os resultados dos testes com a cisplatina, estudos posteriores com compostos metálicos análogos (Boven et al. 1985) ou de outros compostos metálicos (Keppler, 1993), foram avaliados em relação a propriedades antitumorais. Estudos conseguintes visavam identificar o mecanismo de ação para aprimorar as características farmacológicas desses complexos, incluindo a redução da toxicidade (Ries & Klastersky 1986). Os metais pesados foram cogitados como candidatos a novos complexos metálicos antitumorais. Porém eles são geralmente tóxicos devido às possíveis ligações de enxofre e nitrogênio em sítios de proteínas e por isso podem interferir em reações metabólicas (Clarke & Stubbs 1996).

Com as limitações apresentadas pela cisplatina (toxicidade e resistência ao fármaco), outros metais de transição se tornaram uma alternativa para serem usados na terapia contra o câncer (Rafique et al. 2010).

COMPLEXOS DE RÓDIO (II)

Baseados nos resultados que mostravam o aumento da sobrevivência de camundongos portadores de ascite de Ehrlich e leucemia P388 após o tratamento com o acetato de ródio (Hughes et al. 1972), os carboxilatos de ródio tornaram-se mais uma alternativa dentro de sua classe de metais com atividade antitumoral. No entanto, eram necessários estudos para melhor compreensão de sua atividade antitumoral. Algumas das conclusões obtidas em ensaios com tal finalidade relataram que a maioria desses compostos apresentavam alta toxicidade e baixa solubilidade. Uma das exceções foi o citrato de ródio (Bear et al. 1986). Estudos atribuíram o mecanismo dos carboxilatos de ródio (II) pela inibição da síntese de DNA por meio da atuação em enzimas essenciais tal como DNA polimerase I (Erck et al. 1974). No entanto, devido à elevada solubilidade em água do citrato de ródio (II), elevadas doses sistêmicas do fármaco seriam necessárias para alcançar as concentrações eficazes em locais do tumor. Uma solução para efetivar o uso desse composto, é o desenvolvimento de sistemas de liberação controlada, em que o Rh (II) esteja protegido do meio extracelular para minimizar locais de toxicidade e prolongar sua ação (Sinisterra et al. 1999).

NANOTECNOLOGIA

Um dos principais objetivos da nanotecnologia é o desenvolvimento de formas de diagnóstico e de terapia ainda mais seguros e eficazes para o câncer. Fármacos carregados por nanopartículas são uma promissora classe

terapêutica com o potencial de melhorar a eficácia e a segurança dos fármacos usados atualmente. Há também a oportunidade de criar compostos terapêuticos novos, usando a nanotecnologia. Cada vez mais arsenais de plataformas nanotecnológicas estão sob avaliação incluindo nanopartículas poliméricas, lipossomos, nanocápsulas, dendrímeros, nanopartículas de polinucleotídeos, metálicas entre outras (Alexis et al. 2008).

NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS

Nanopartículas magnéticas oferecem algumas possibilidades atraentes na biomedicina. Em primeiro lugar, elas têm tamanhos controláveis que vão desde alguns nanômetros até dezenas de nanômetros, o que as coloca em dimensões que são menores ou comparável às de uma célula, um vírus, uma proteína ou um gene. Isto significa que elas podem interagir com um alvo biológico de interesse (Ducan & Gaspar 2011). Elas podem ser revestidas com moléculas biológicas para melhor interagir ou ligar-se ao seu alvo e assim proporcionar meios controláveis de “marcação” ou localização (Chou et al. 2010). Em segundo lugar, as nanopartículas obedecem à lei de Coulomb, podendo ser manipuladas por um campo magnético externo. Esta “ação à distância”, combinada com a penetrabilidade intrínseca de campos magnéticos em tecido humano, possibilitam muitas aplicações que envolvem transporte e/ou imobilização de nanopartículas magnéticas e marcação magnética de componentes biológicos. Dessa forma, elas podem ser sintetizadas para entregas, tal como um fármaco anticancerígeno, ou um grupo de átomos de radionuclídeos a uma região alvo do corpo, como por exemplo, um

tumor (Xu et al. 2006). As nanopartículas magnéticas podem ainda ser utilizadas para responderem ressonantemente a uma variação de campo, com a transferência de energia do campo excitante para a nanopartícula. Assim, as partículas podem ser aquecidas por meio dessa variação de campo magnético, o que leva à sua utilização como agentes de hipertermia, proporcionando quantidades tóxicas de energia térmica em tecidos alvos, tais como tumores, ou como quimioterapia e agentes de melhoramento de radioterapia, em que a moderados graus de aquecimento do tecido resulta em destruição das células malignas mais eficazmente (Dürr et al. 2013). Estas e muitas outras aplicações potenciais para a biomedicina são possíveis devido as propriedades físicas especiais das nanopartículas magnéticas (Pankhurst et al. 2003). Nosso grupo tem realizado estudos para testar os efeitos do citrato de rádio (II) carregado por nanopartículas magnéticas de maghemita (**Figura 1**) comparando-os com o citrato de rádio (II) livre em células de câncer de mama (4T1 e MCF-7). Os resultados apresentaram uma ação mais específica em células tumorais do fármaco associado a nanopartícula (Carneiro et al. 2011; Chaves et al. 2015). Apesar disso, o mecanismo de ação do composto ainda continua desconhecido.

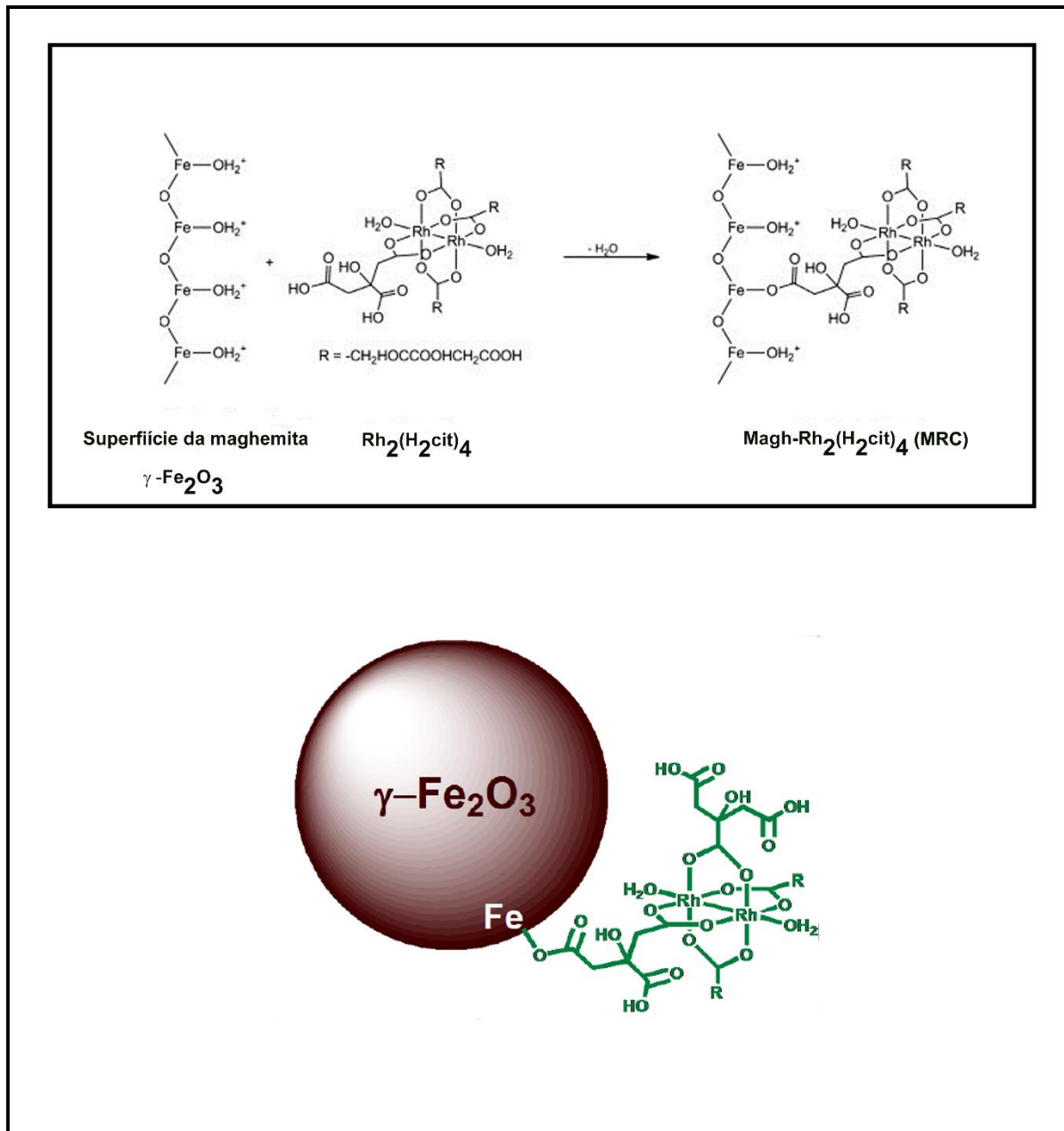


Figura 1. Representação da associação de nanopartículas de maghemita associadas a citrato de ródio. Adaptado de da Silva Nunes et al. 2013.

2.2 INTERAÇÃO ENTRE NANOPARTÍCULAS E CÉLULAS

O rápido crescimento da nanotecnologia proporciona o aumento no número de estudos de nanomateriais artificiais para aplicações biomédicas. As nanopartículas interagem com proteínas, membranas, células, organelas, DNA e estabelecem uma série de interfaces biológicas (**Figura 2**) que dependem de forças coloidais, bem como interações fisicoquímicas. Estas interações conduzem à formação de coroa proteica envolvendo as partículas, absorção intracelular e processos biocatalíticos que podem ter resultados biocompatíveis ou bioadversos (Nel, et al. 2009).

Quando as nanopartículas estão em um fluido biológico (sangue, plasma ou fluido intersticial), elas são revestidas por proteínas e moléculas que podem causar alterações conformacionais, que conduzem à exposição de novos epítomos, alteração de mecanismo e/ou efeitos (Cedervall et al. 2007).

Apesar dos notáveis avanços em nanociência, relativamente pouco se sabe sobre o destino intracelular e mecanismos de ação das nanopartículas. Esta área de trabalho é particularmente importante para o desenvolvimento eficaz e sistemas de distribuição de nanocompostos mais seguros. Nanopartículas induzem a uma grande variedade de respostas intracelulares dependendo das suas propriedades físico-químicas, das concentrações intracelulares, duração do contato, distribuições subcelulares e interações com moléculas biológicas (Zhang et al. 2015). O processo de entrada para o meio

intracelular de nanopartículas envolve vias endocíticas como pinocitose, utilização de clatrina e caveolina, ou internalização independente de clatrina/caveolina, sendo que cada um dos quais requerem diferentes mecanismos e moléculas. Embora as propriedades físico-químicas de superfície e reatividades de nanopartículas sejam essenciais para determinação da via, os tipos de células e os seus estados de diferenciação, podem também ser determinantes. Tamanho e forma das partículas são parâmetros importantes do ponto de vista do espaço disponível nestes compartimentos endocíticos (Nel, et al. 2009; Saie et al. 2015; Zhang et al. 2015).

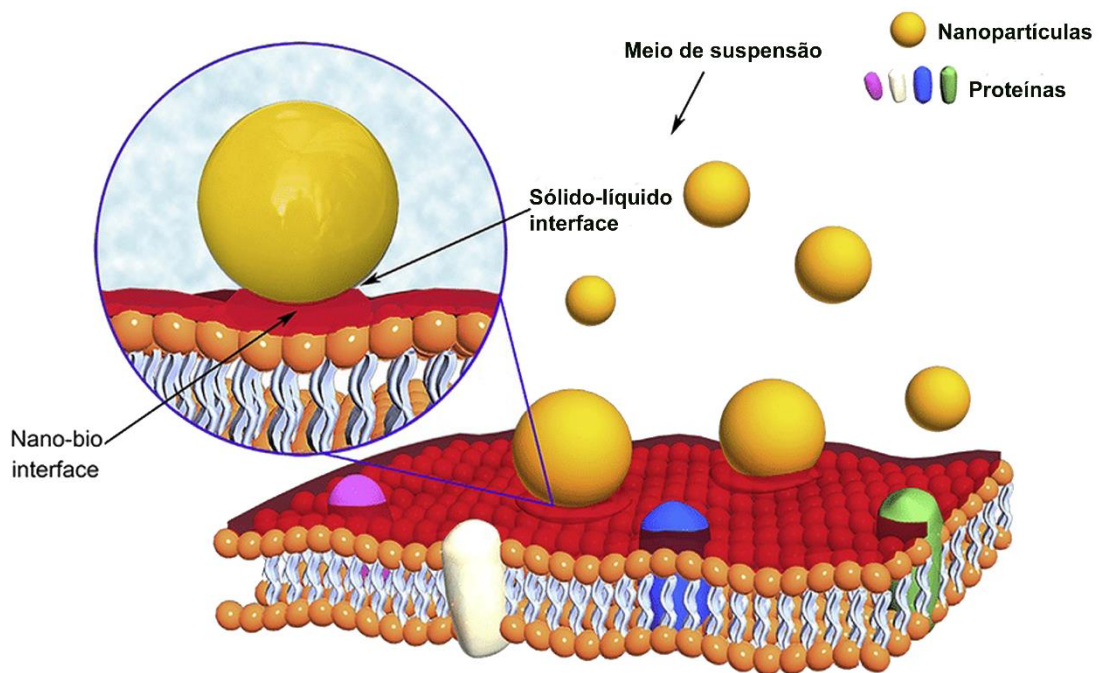


Figura 2. Representação esquemática da interface entre uma nanopartícula e a bicamada lipídica de uma membrana celular. A interface nano-bio compreende a superfície da nanopartícula; a interface sólido-líquido e os efeitos do meio circundante; e a zona de contato da interface com substratos biológicos. Adaptado de Jiao et al. 2017.

CAPTAÇÃO CELULAR

Semelhante à citotoxicidade, a captação celular é influenciada pelo tamanho, forma, composição, carga superficial e hidrofobicidade superficial. As células não-fagocíticas absorvem mais NPs esféricas entre 20 e 50 nm. Os enterócitos são uma exceção a esta regra, porque preferencialmente captam partículas na faixa entre 100 e 200 nm. Células fagocíticas internalizam preferencialmente partículas entre 2 e 3 μm (Fröhlich, 2012). Estudos demonstraram que partículas de prata de 20-200 nm são menos absorvidas por células fagocíticas (THP-1) do que células não fagocíticas (A549 e HepG2). Os agregados de NPs de prata, no entanto, são fagocitados em maior extensão. Para as partículas de óxido de ferro, o tamanho parece ser mais determinante na absorção do que a carga superficial (Win & Feng 2005; Calero et al. 2015).

Alta eficiência de captação é um parâmetro desejável para uma maior acumulação de fármacos associado a uma liberação lenta e duradora em células de câncer. Estas são características de tratamentos antitumorais mais efetivos e específicos (Zhang et al. 2008; Cai et al. 2015). As NPs também apresentam propriedades únicas que permitem o direcionamento ativo para tumores *in vivo*. Por causa da regulação pró angiogênica, a maioria dos tumores sólidos são hipervascularizados e os vasos têm uma arquitetura altamente permeável. (Danhier et al. 2010). Além disso, a massa tumoral também apresenta drenagem, permitindo o acúmulo de macromoléculas de até, aproximadamente 40 kDa, dentro do seu microambiente. Esse recurso, chamado de aumento da permeabilidade e retenção (efeito EPR), é explorado para direcionamento de nanopartículas em tumores sólidos. A gama de tamanhos de diâmetro ideal para se beneficiar do EPR é entre 10 a 200 nm.

Partículas que são muito pequenas podem ser metabolizadas pelos rins, impedindo o acúmulo no local do tumor, e partículas que são muito grandes não penetrarão adequadamente na rede vascular e espaço intersticial do tumor (Fang, et al. 2004). Estudo mais recente *in vivo* mostrou que nanopartículas magnéticas de óxido de ferro (associadas a carboxila) menores (10 nm) apresentaram maior absorção pelo fígado, enquanto as maiores (40 nm) apresentaram maior absorção pelo baço. Além disso, as NPs com menor tamanho (10 nm) foram removidas mais rapidamente do fígado e rins, mas entraram mais facilmente no cérebro e no útero. As NPs de óxido de ferro maiores (40 nm) se acumularam mais facilmente, mas foram facilmente eliminadas no baço. O nível de ferro no coração diminuiu em todos tratamentos dessas NPs (10, 20, 30, 40 nm), no entanto, as partículas menores foram mais eficientes na atuação em expressão de genes relacionados a estresse oxidante, transporte de ferro, processo metabólico e apoptose (Yang et al. 2015). Estudos mostraram que a eficiência da absorção de NPs por células vivas é afetada por suas propriedades tais como tamanho e composição superficial (Rejman et al. 2004; Chithrani et al. 2006). Além disso, foi sugerido que a presença de uma coroa biomolecular provenientes de fluídos biológicos pode conferir interações específicas entre o complexo nanopartícula-coroa proteica e a superfície celular, com o desencadeamento de captação celular regulado. A coroa pode, no entanto, reduzir as interações puramente inespecíficas entre o nanomaterial puro e a membrana celular, o que, por si só, desconsiderando interações específicas, provoca uma diminuição da absorção (Lesniak et al. 2013).

ENDOCITOSE EM NANOESCALA

A endocitose é um processo fundamental no qual células eucarióticas internalizam moléculas via deformação da membrana e geração de transportadores ligados à membrana. Os aspectos funcionais não se limitam apenas à absorção de nutrientes, mas também desempenham processos evolutivos conservados tais como a regulação da atividade das proteínas da membrana plasmática (isto é, receptores de transdução de sinal, transportadores de moléculas pequenas e canais iônicos), motilidade celular e mitose. A natureza macromolecular do material transportado por endocitose torna esta rota um dos alvos mais importantes para a nanomedicina (Canton & Battaglia 2012).

ENDOCITOSE MEDIADA POR CLATRINA

Endocitose mediada por Clatrina (CME) é o mais estudado de todos os mecanismos de endocitose. CME foi observada como uma das mais importantes vias de internalização nas células eucarióticas responsáveis pela absorção de nutrientes, sinalização de receptores, bem como o seu papel fundamental na reciclagem de vesículas sinápticas em neurônios. Além disso, a CME é a via de internalização comumente explorada por vírus (Roth & Porter 1964; Cavalli et al. 2001; Marsh & Helenius 2006).

O primeiro estágio da CME envolve a triagem por receptores transmembrânicos que, após a associação aos seus ligantes, ocorre a formação

de "vesículas revestidas" no lado citosólico da membrana plasmática. Estas vesículas são formadas por várias proteínas citosólicas, com a clatrina como unidade principal. Clatrina tem uma estrutura de três cadeias, conhecida como triqueto, resultante da montagem das três cadeias pesadas de clatrina, cada uma associada a uma cadeia leve. Os triquetos de clatrina espontaneamente se organizam em "gaiolas" poligonais fechadas *in vitro*. No entanto, sob condições fisiológicas, a gaiola de clatrina requer outras proteínas conhecidas como proteínas adaptativas (APs). As APs coordenam a nucleação da clatrina nos locais de internalização na membrana. Isso desencadeia a montagem de triquetos de clatrina em uma cadeia poligonal curvada que em último estágio, impulsiona a deformação da membrana ancorada (Smith et al. 1998).

A invaginação da membrana durante a formação de vesícula revestida com clatrina (VRC) é iniciada pela interação de proteínas de modelação da membrana com a membrana plasmática em si. Estas proteínas funcionam como um gabarito de deformação da membrana que recruta o adaptador AP-2. Durante os estágios iniciais do CME, AP-2 juntamente com outros adaptadores (conhecidos como CLASPs, proteínas de triagem associadas a clatrina) tornam-se os locais de reconhecimento para as diversas cargas e classificações de sinais, enquanto as gaiolas de clatrininas estabilizam os pontos de deformação na membrana (Stimpson, et al. 2009). Esta montagem altamente coordenada termina com a formação de VRC. A montagem da clatrina também é responsável pela formação do "pescoço" vesicular que, com a intervenção de outras proteínas específicas, é cortado levando ao desprendi-

mento do VRC a partir da membrana celular. Uma vez que o VRC é destacado, a vesícula de clatrina perde o revestimento por receptores até alcançar seu destino intracelular (Traub, 2009).

A internalização via CME varia entre 1-5% por minuto e o tempo de vida de uma VRC é entre 20 s e 2 min (Bretscher, 1984). Estudos recentes com células vivas demonstraram que para a endocitose ser eficaz, a montagem de clatrina, o desenvolvimento de CCP e formação de VRC devem ser altamente sincronizados com a polimerização de actina. No entanto, como as proteínas modulam a curvatura da membrana ainda precisa ser elucidado. Outras questões importantes ainda não respondidas são como CCPs evoluem em vesículas (VRC) e mais importante, como seu tamanho é regulado. Por exemplo, durante as sinapses químicas, os maiores CCPs tem tamanhos semelhantes aos VRCs (50 nm de diâmetro). Em outros tipos de células, tais como fibroblastos, CCPs de tamanho comparável aos VRCs (150 nm de diâmetro), bem como maiores (4.300 nm de diâmetro) têm sido observados, com múltiplos domínios de curvatura ou regiões relativamente planas ligadas a secções invaginadas, implicando que esse VRC pode se formar tanto a partir de uma única secção menor bem como a partir de um grande retículo (Merrifield et al. 2005).

A CME pode influenciar no destino ou degradação lisossômica de nanomateriais. Esse fator é relevante quando se utiliza partículas como carreadores de fármacos ou genes. No uso de NPs para carreamento de fármacos (*drug delivery*), a forma pela qual a partícula é endocitada pode fazer com que ela seja degradada pelas enzimas lisossomais e não alcance o alvo destinado. Estabelecer estratégias para promover o escape dos endossomos e

evitar a degradação lisossomal é vital para o sucesso da terapia. Por esse motivo, essa via de internalização deve ser evitada quando o alvo do tratamento não são os lisossomos, ou quando o escape dos endossomos não requerer a acidificação endossomal (Paulo et al. 2011).

ENDOCITOSE MEDIADA POR CAVEOLINA

Endocitose mediada por caveolina é o mecanismo endocítico independente de clatrina mais estudado e é agora reconhecido ser responsável por muitas funções biológicas incluindo a sinalização celular, regulação lipídica e transporte. Além disso, foi sugerido que pode desempenhar um papel em várias patologias, incluindo câncer, diabetes e infecção viral. Caveolae (do latim: pequenas cavernas) são invaginações da membrana em forma de frasco de 50-80 nm de vários tipos de células eucarióticas. Elas foram observadas pela primeira vez nos anos 50 por microscopia eletrônica em células endoteliais (Palade, 1953). Caveolae tem um revestimento estriado na superfície da membrana composta principalmente de caveolina-1 (ou caveolina-3 em células musculares) e caveolina-2. Geralmente, as caveolinas são proteínas de membrana de 21 kDa ancoradas à membrana celular por uma sequência hidrofóbica a partir do citosol.

A Caveolina-1 (juntamente com caveolina-3) é responsável pela formação estrutural das caveolae. Entretanto, a função exata da caveolina-2 ainda precisa ser elucidada. Embora as suas características estruturais sejam amplamente conservadas, há relatos recentes demonstrando diferenças

sobre o papel funcional das caveolinas individuais. O mecanismo de endocitose mediada por caveolina ainda é objeto de estudo (Pelkmans & Zerial 2005).

Há relatos na literatura de diversos nanomateriais internalizados pela via da caveolina. Essa via tem atraído grande atenção na nanomedicina por ter sido sugerida como via de escape à degradação lisossomal. Além disso, a endocitose mediada por caveolina é a via fisiológica para transcitose. Dessa forma, ela pode ser empregada para entrega trans-vascular de nanomateriais, e também para a entrega de ativos no sistema nervoso central, onde há a necessidade de atravessar barreira hematoencefálica (Hillaireau & Couvreur 2009; de Jesus et al. 2014)

2.5 AÇÃO DE NANOPARTÍCULAS EM CÉLULAS TUMORAIS

A partir do local onde a nanopartícula se acumula dentro da célula, ela pode atuar de várias maneiras. A citotoxicidade tumoral e efeito anti-metastático podem se dar por mecanismos como ações pró-apoptóticas, anti-angiogênicas, anti-inflamatórias, imunomodulatórias, anti-mitogênica, entre outros (Sledge & Miller 2003). Estudos recentes no nosso grupo, demonstraram que as MRC induzem apoptose em células de câncer de mama MCF-7 (Chaves, et al. 2015). No entanto, o efeito dessas NPs e investigações sobre seus mecanismos anti-metastático ainda não foram realizados

EFEITO ANTI-MESTÁTICO DE NPS

Efeitos anti-metastáticos de NPs são outras propriedades desejáveis que podem ser obtidas de forma direta ou indireta pelas NPs. De fato, NPs podem afetar o tumor não apenas na fase de desenvolvimento, mas também em fases tardias quando o tumor se torna invasivo.

A metástase, a propagação de células tumorais secundárias a partir de um tumor primário em locais distantes, é um dos maiores desafios no tratamento de câncer atual (Schroeder et al. 2012) e é a característica fundamental do tumor em crescimento, que resulta da sua invasividade aos tecidos próximos e, posteriormente, para os outros órgãos do corpo através do sistema circulatório.

No momento do diagnóstico, quase 50% dos tumores já se espalharam. Nesta situação, apenas os cuidados paliativos podem ser oferecidos à maioria destes pacientes. A terapia do foco primário também resulta em alguns efeitos terapêuticos sobre as metástases, porém, estratégias terapêuticas e de diagnóstico para combater as metástases e aumentar taxa de sobrevivência precisam ser desenvolvidas (Dürr et al. 2013).

Nem todos os tumores satélites podem ser eliminados pela nanoterapia, mas pode-se focar em metástases que limitam a qualidade de vida ou ameaçam a vida. Já existem abordagens para tratar o câncer com metástase focadas nesta perspectiva. Yang et al. (2011) introduziu um novo sistema de

entrega de fármacos guiados magneticamente para vasos linfáticos, baseado em nanotubos de carbono funcionalizados com ácido poli-acrílico. Eles conseguiram a inibição bem-sucedida da metástase dos nódulos linfáticos pela administração subcutânea de nanotubos de carbono magnéticos carregados com gemcitabina, bem como com partículas magnéticas de carvão ativado sob um campo magnético.

Nanomateriais representam ferramentas com muitas possibilidades de aplicações que só agora estão sendo realizadas na clínica. Atualmente, a maioria das nanotecnologias voltadas para o tratamento do câncer concentraram-se no tratamento de tumores, mas é importante aproveitar o potencial da nanotecnologia para combater a propagação do câncer em cada fase do processo metastático.

USO DE NANOPARTÍCULAS ANTITUMORAIS PARA SUPERAR A RESISTÊNCIA A MÚLTIPLOS FÁRMACOS (MDR)

A resistência a múltiplos fármacos (MDR) se desenvolve por meio de uma variedade de mecanismos moleculares dentro da célula tumoral e muitos desses mecanismos tendem a convergir para a alteração da sinalização de apoptose (Jain, 2008). A glicoproteína-P (GPP) tem uma função chave no fenótipo resistente a múltiplos medicamentos em câncer. A proteína confere resistência ao mediar o efluxo dependente de ATP de uma surpreendente variedade de drogas anticancerígenas. Sua ampla especificidade tem sido

objeto de inúmeras tentativas de inibi-la e restaurar a eficácia de drogas anticancerígenas. A estratégia geral tem sido desenvolver compostos que competem com drogas anticancerígenas para o transporte ou atuem como inibidores diretos de GPP. Apesar do considerável sucesso *in vitro*, não existem compostos atualmente disponíveis para "bloquear" a resistência mediada por GPP na clínica. A falha pode ser atribuída a toxicidade, interação adversa de drogas e numerosas questões farmacocinéticas (Callaghan et al. 2014). Outra abordagem promissora é utilização de nanocompostos para atuar nessa estratégia

Um estudo avaliou a restauração da sinalização apoptótica e recuperação da sensibilidade numa linhagem de células de câncer de ovário humano, utilizando nanopartículas poliméricas (epsilon-caprolactona) modificada (PEO-PCL) para encapsular e entregar os agentes terapêuticos. Os resultados mostraram que, de fato, a população de células de câncer resistentes pode ter sido completamente erradicada por esta abordagem. Além disso, com a administração de fármaco em nanopartículas, as células resistentes podem ser atingidas por dose de fármaco perto do IC50 de células não MDR (sensíveis ao fármaco), indicando um aumento de 100 vezes na quimiossensibilização por meio desta terapia. A análise molecular da atividade confirmou a hipótese de que a eficácia desta terapêutica é devido a uma restauração na sinalização apoptótica (van Vlerken et al. 2006).

As propriedades benéficas de NPs podem melhorar ainda mais o sucesso terapêutico dos fármacos, mostrando o potencial promissor para o uso clínico desta estratégia baseada em nanomateriais para superar a MDR.

3. JUSTIFICATIVA

Apesar da redução de sua letalidade nos últimos anos principalmente em países desenvolvidos, o câncer de mama ainda é a principal causa de morte entre os cânceres em países subdesenvolvidos (Torre et al. 2015). Além disso, esse tipo de câncer é bastante heterogêneo e pode depender de hormônios para se desenvolver. São vários os fatores de risco gerais relacionados ao câncer de mama nas mulheres como infertilidade, idade da primeira gravidez, idade da menopausa, mutação hereditária no gene do câncer de mama BRCA1 / BRCA2 e uso de hormônios (estrogênio e progesterona) na pós-menopausa (Donepudi et al. 2014). As características e os dados epidemiológicos relacionados ao câncer de mama, refletem a necessidade de novas abordagens terapêuticas para tratar esse grave problema de saúde pública e reduzir as chances de recidivas.

Nesta perspectiva, as NPs MRC possuem características promissoras para um tratamento mais específicos oferecendo a oportunidade de transpor várias limitações dos tratamentos convencionais. Para que isso aconteça é fundamental a compreensão da interação que ocorre entre o nanomaterial e as células para estabelecer o mecanismo de ação e determinar o melhor alvo para o tratamento. Tendo em vista a oportunidade de superar as dificuldades no tratamento atual do câncer de mama este trabalho justifica-se também pela não compreensão, até o momento, do mecanismo de ação de MRC e poucos trabalhos levarem em consideração a grande heterogeneidade entre os diversos tipos de células de câncer de mama.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

- Estudar o processo de internalização de MRC (nanopartículas de maghemita associada ao citrato de ródio) em diferentes linhagens tumorais de câncer de mama

- Estudar os efeitos anti-tumorais e anti-metastáticos de MRC

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar as nanopartículas por avaliação de seus diâmetros hidrodinâmicos, potencial zeta e índice de polidispersão.

- Quantificar as nanopartículas internalizadas por MET (Microscópio Eletrônico de Transmissão) e MEV (Microscópio Eletrônico de Varredura) em: MCF-7 (células de câncer de mama responsivas a estrógeno); MDA-MB-231 (células de adenocarcinoma mamário invasivas não responsivas a estrógeno) e HNTMC (*human non tumor mesenchymal cells*).

- Localizar a distribuição das nanopartículas em regiões das células tumorais e identificar moléculas que se associam a MRC por análise em CRM (*Confocal Raman Microscopy*) e MET.

- Estudar as vias endocíticas envolvidas na internalização de nanopartículas nas células por quantificação de proteínas (western blot) e inibição das vias endocíticas principais.

- Comparar o efeito citotóxico das nanopartículas associada ao citrato de ródio e o citrato de ródio livre em células de carcinoma mamário e células normais.

- Comparar por CRM as possíveis alterações morfológicas e na composição nuclear em células tumorais (MCF-7 e MDA-MB-231) após 24 e 48 horas de exposição a MRC

- Avaliar por CRM o acúmulo de MRC em 24 e 48 horas de exposição

- Estudar o efeito de MRC na síntese de DNA e ciclo celular em MDA-MB-231 e MCF-7.

- Estudar o efeito anti-metastático de MRC em células MDA-MB-231 por ensaio de migração celular.

- Avaliar a expressão de proteínas (glicoproteína-P) relacionadas ao efluxo de drogas em células tumorais de câncer de mama tratadas com MRC.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 CÉLULAS UTILIZADAS

As linhagens de células tumorais mamárias MCF-7 e MDA-MB-231 foram adquiridas da *American Type Culture Collection* (ATCC® HTB-22™ e ATCC® HTB-26™).

As células epiteliais não tumorais e não tumorigênicas de polpa dentária humana (HNTMC) foram estabelecidas e cedidas pelo Laboratório de Morfologia e Morfogênese do Departamento de Genética e Morfologia da Universidade de Brasília (Prof. Dr. Ricardo Bentes). As culturas primárias de células mesenquimais não tumorais humanas de polpa dentária (HNTMC) foram obtidas de voluntários saudáveis sob aprovação do Comitê de Ética Humana da Universidade de Brasília (UnBDOC 104934/2008).

5.2 FÁRMACO, REAGENTES E EQUIPAMENTOS

Foram utilizadas as soluções de citrato de ródio (RC) e citrato de ródio associado a nanopartículas de maghemita (MRC) nas concentrações de 50 µM, 100 µM e 200 µM. Também foram utilizadas NPs de maghemita funcionalizadas apenas com citrato (MC) em concentrações normalizadas de ferro correspondente a MRC 50, 100 e 200 µM. Os fluidos magnéticos utilizados

foram sintetizados pelo método de co-precipitação de íons Fe^{2+} e Fe^{3+} em meio alcalino e subsequentemente oxidados por borbulhas de oxigênio. Os fluidos funcionalizados de MRC e MC foram obtidos por experiências de adsorção. MRC com 59,6 μM de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ e 2,85 μM de RC, MC com 64,7 μM de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ e 2,55 μM de RC e 2,513 mM de $\text{Rh}_2(\text{H}_2\text{Cit})_4$. Os fármacos foram sintetizados pelo grupo do Professor Dr. Aparecido Ribeiro no Instituto de Química da Universidade Federal de Goiás (UFG).

Para manutenção das culturas de células foram utilizados DMEM, RPMI, L15, SFB, Tripsina 0,25% em EDTA, todos obtidos da empresa GIBCO – Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA e Leibovitz – L15 da Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA.

Os anticorpos utilizados neste trabalho foram: anticorpos monoclonais anti- β -actina e anti-clatrina (*heavy chain*) produzidos em camundongos, policlonal anti-caveolina 1 produzido em coelhos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA), anti-glicoproteína-P (monoclonal) produzido em camundongos da Abcam - Cambridge, MA; anti-BrdU conjugado com Alexa Fluor 488 da Invitrogen – Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA; IgG de coelho anti-camundongo conjugado com HRP da Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA.

Os reagentes utilizados ao longo do trabalho foram: MTT (brometo de 3-[4,5dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio), BODIPY® FL C-Lactosilceramida (N- (4,4-Difluoro-5,7-dimetil-4- Bora-3a, 4a-Diaza-s-Indaceno-3-pentanoílo), Sphingosil 1- β -D-Lactoside e Transferrina de Soro Humano conjugada com Fluoresceína - Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA, DMSO, Ferrozine, BrdU, NaOH, HCL, KM_2NO_4 , DNase metil beta ciclodextrina ($\text{m}\beta\text{cd}$) - Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA, Pit stop 2 - Abcam (Cambridge, MA),

Bicinchoninic Acid Assay (BCA, Thermo Scientific, Rockford, IL); ATP da Invitrogen, San Diego, CA, EUA. Insetos para ensaio de invasão e a matriz de membrana basal (Matrigel™) foram adquiridos da BD Biosciences, San Jose, CA, EUA.

Na análise por Western Blot, utilizou-se inibidor de protease da Boston Bioproducts e géis de SDS pré-prontos Amersham ECL Gel 4%-12%, 15 wells – GE Healthcare Life Sciences, Buckinghamshire, Inglaterra. A revelação foi realizada com solução SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Scientific - Thermo Fisher Scientific, Inc) e a aquisição de imagens foi por meio do equipamento Image Quant LAS 4000 (GE Healthcare Life Sciences, Buckinghamshire, Inglaterra) e a análise realizada no programa ImageJ (NIH, EUA)

Para análise da migração celular foi utilizado um Microscópio de luz Axiovert (aumento de 5 x) e as imagens foram capturadas com o auxílio do software AxioVision 100 – ambos da Zeiss, Alemanha e para análises ultra-estruturais e quantificação de NPs intracelular foram utilizados o microscópio eletrônico de transmissão, Jeol® 1011 – Tokyo, Japão, operando em 80 kV e microscópio eletrônico de varredura (Jeol, JSM-7000F, Tóquio, Japão). Para leitura de absorbâncias foi utilizado o equipamento Spectramax M5 e os dados analisados pelo programa SoftMax Pro 5.2, ambos da Molecular Devices, LLC, EUA. O citômetro de fluxo utilizado foi FACS Calibur, BD Biosciences, Inc., San Jose, CA e a análise dos dados foi realizada no programa Flow Jo v.5.2.7, Tree Star, Inc. As análises Raman foram realizadas com microscópio confocal de Raman WITEC alpha300R + (WITEC, Ulm, Alemanha).

Todos os experimentos foram repetidos pelo menos três vezes e as análises estatísticas e gráficos foram feitos no programa GraphPad Prism 5.

5.3 CULTURA DE CÉLULA

As células MCF-7, HNTMC e MDA-MB-231 foram mantidas em cultura em meio RPMI, DMEM e L15. Os meios foram acrescidos de 10% de soro fetal bovino e 1% de antibiótico e as células foram mantidas em estufa umidificada contendo 5% de CO₂ a 37°C, com exceção de células MDA-MB-231 que foram mantidas em frascos fechados para evitar a entrada de CO₂.

5.4 TRATAMENTO DAS CÉLULAS

Uma quantidade inicial de células foi semeada em placas de poliestireno de 6, 24 ou 96 poços (TPP, USA) e mantida sob condições de cultura celular. Após a adesão, as células foram tratadas com citrato de Ródio livre (RC) e citrato de Ródio associado a nanopartículas de maghemita (MRC) 0,153 mol/L de ferro (2×10^{16} partículas de ferro/mL), nas concentrações de 50, 100 e 200 µM. As concentrações utilizadas nos experimentos de captação de nanopartículas foram baseadas em um teste de viabilidade inicial e o tempo de exposição das células às nanopartículas nos resultados de avaliação de cinética por quantificação de Ferro (Fe²⁺ e Fe³⁺) associado às células MCF-7, utilizando o método ferrozina (**Figura 3, 4**). Para avaliar a análise, 5×10^4 células foram

plaqueadas em placas de 6 poços. Diluições conhecidas de MRC foram utilizadas para o cálculo final de Ferro. Após o tratamento com 200 μM de NPs, as amostras foram lavadas 5 vezes com PBS e armazenadas a -20°C . As células foram lisadas pela adição de 500 μL de NaOH 0,2 N 10 min e 100 μL do lisado foram transferidos para tubos tipo eppendorfs. Foram adicionados aos tubos, 100 μL de HCl (10 mM) e 100 μL de uma solução (1:1) contendo HCl (1,4M) e KM_2NO_4 (4,5% em H_2O) e incubados por 2h a 60°C . Posteriormente, 50 μL de solução ferrozina (10 M de acetato de amônio, pH 9,5 e 300 μL de 10 mM de ferrozina foi adicionada a cada amostra (30 min) e 280 μL do conteúdo de cada microtubo foi passado para placas de 24 poços (em duplicata). A absorbância foi medida a 560 nm utilizando um leitor de placas (Spectramax M5). O grupo controle de células sem tratamento foi normalizado como 0 h (Figura 3).

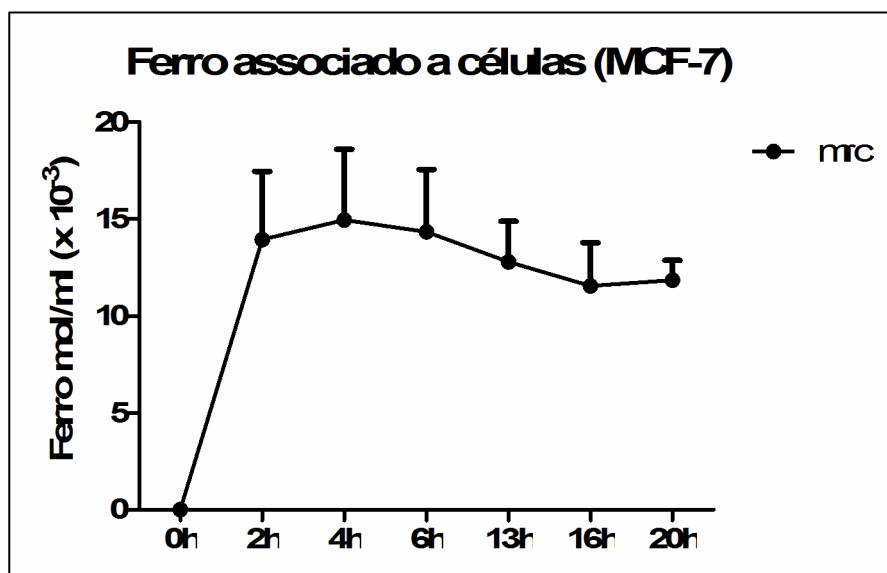


Figura 3. Cinética de captação de MRC em células MCF-7.

5.5 CARACTERIZAÇÃO DOS FLUIDOS MAGNÉTICOS

Para a caracterização quanto à distribuição de tamanho e de carga superficial da partícula, utilizou-se o equipamento Zetasizer Nano ZS no ângulo de 90° (Malvern).

Este aparelho utiliza uma tecnologia denominada Dynamic light scattering (DLS), que permite estimar o tamanho médio das partículas e a sua distribuição de tamanhos. Estas partículas suspensas no líquido estão em movimento browniano constante, como resultado dos impactos das moléculas do fluido. O movimento de partículas em concentrações muito baixas depende da viscosidade do líquido, da temperatura e do tamanho das partículas. E por meio da mobilidade eletroforética, é possível calcular a medida da magnitude da repulsão ou da atração eletrostática ou das cargas entre partículas (Lucas, Soares et al. 2001). O ensaio foi realizado a temperatura de 25°C. Os fluidos magnéticos foram caracterizados quanto ao potencial zeta e diâmetro hidrodinâmico (sob ângulo de 90°) diluídos em água e meio de cultura. As leituras dos parâmetros foram realizadas imediatamente após as diluições (0h) e após 12 horas de incubação (12h).

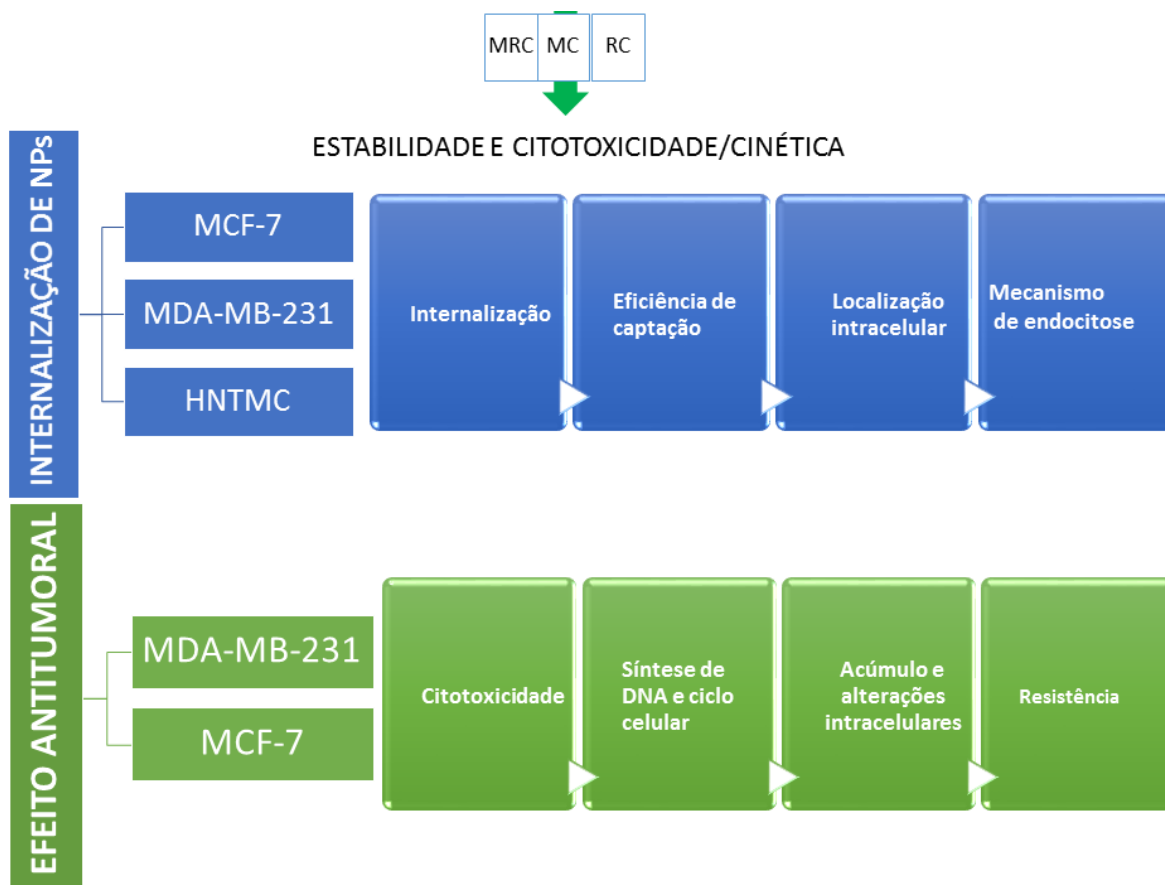


Figura 4. Organograma das análises realizadas no trabalho. A partir de um teste inicial de estabilidade, de resposta citotóxica e cinética de captação celular de suspensões de NPs, o trabalho foi dividido em duas partes: Avaliação de internalização de NPs, utilizando as células MCF-7, MDA-MB-231, e HNTMC para comparar a internalização, a eficiência de captação celular, a localização intracelular e o mecanismo de endocitose das NPs MRC. Na segunda parte (avaliação do efeito antitumoral de NPs MRC), o foco foram as células tumorais MDA-MB-231 e MCF-7 para comparar o efeito citotóxico, avaliar alterações de síntese de DNA, ciclo celular o acúmulo e alterações intracelulares e resistência de células tratadas.

5.6 ESTUDO DA INTERNALIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE MRC

ANÁLISE DA INTERNALIZAÇÃO CELULAR DE MRC POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA

Para a análise da captação de NPs MRC, 8×10^5 células MCF-7 e MDA-MB-231 foram plaqueadas em 6 poços e, após a adesão, as células foram expostas a NPs (200 μ M) durante seis horas. As células desaderidas em microtubos foram então lavadas com PBS e fixadas com Karnovsky (2% de glutaraldeído, 2% de paraformaldeído, 3% de sacarose, 0,005 M de cloreto de cálcio em tampão de cacodilato de sódio 0,1 M) durante a noite a 4°C. Subsequentemente, as células foram lavadas com tampão cacodilato de sódio 0,1 M (pH 7,2) e pós-fixado durante 30 minutos com 1% de tetróxido de ósmio e 0,8% de ferricianeto de potássio em tampão cacodilato de sódio e 5 mM de CaCl_2 . As células foram lavadas duas vezes com água e depois contrastadas com 0,5% de acetato de uranila a 4°C. As amostras foram desidratadas em gradiente crescente de acetona (30% a 100%) durante 10 min cada e incluídas em resina Spurr. As seções ultrafinas foram obtidas com um ultra micrótomo (Leica, UCT, AG, Viena, Áustria) e analisadas em microscópio eletrônico de transmissão (MET).

Já os cortes semi finos de 0,3 a 0,6 μ m de espessura sobre suportes metálicos *stubs* foram analisados quanto a constituição elementar por EDS utilizando microscópio eletrônico de varredura (MEV) operando a 15 kV. As seções foram fotografadas analisadas para a composição elementar da presença do elemento ferro, realizando uma aquisição Point & Shoot (NSS Spectral Imaging) utilizando estritamente as mesmas condições de aquisição para todas as amostras. Além disso, as imagens adquiridas por microscopia eletrônica de transmissão foram utilizadas para quantificar NPs intracelulares. A análise da imagem de micrografia foi realizada pelo software Image-Pro Plus (Media Cybernetics, Silver Spring, EUA).

LOCALIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS INTRACELULARES POR MICROESPECTROSCOPIA DE RAMAN

A distribuição de nanopartículas em células MDA-MB-231 e MCF-7 foi analisada utilizando microscópio confocal de Raman (CRM). A espectroscopia Raman é uma técnica fotônica de alta resolução que pode proporcionar, em poucos segundos, informação química e estrutural de quase qualquer material, composto orgânico ou inorgânico permitindo assim sua identificação. É uma técnica que usa uma fonte de laser, que ao atingir um objeto, é espalhada por ele, gerando luz de mesma energia ou de energia diferente da incidente. No segundo caso, o espalhamento é chamado de efeito inelástico também conhecido como efeito Raman, que possibilita obter muitas informações importantes sobre a composição química do objeto em análise a partir dessa diferença de energia. Isto gera uma assinatura da composição química de cada material irradiada, também conhecido como impressão digital (Ledinský et al. 2015). Para análises de CRM, um feixe de laser contínuo foi focado em um ponto de 300 nm em uma única célula através de um microscópio confocal de Raman (WITec alpha 300R+, WITec, Ulm, Germany), equipado com um scanner piezo (P-500, Physik Instrumente, Karlsruhe, Alemanha). A excitação a laser de 532 nm foi utilizada em combinação com uma objetiva de imersão em água (63x / NA1,0, Zeiss, Alemanha). Os espectros foram adquiridos usando um dispositivo de carga acoplada (CCD) resfriado até -61°C (PI-MAX, Princeton Instruments Inc., Trenton, NJ) atrás de um espectrógrafo de rede

(600 g mm⁻¹) (Acton, Princeton Instruments Inc., Trenton, NJ) com uma resolução espectral de 4 cm⁻¹. A superfície celular foi digitalizada com passos de 0,2 µm e integrada durante um período de aproximadamente 0,1 a 0,3 s a 36 mW de potência do laser para produzir mapeamentos celulares de alta qualidade. As células foram plaqueadas em placas para análise Raman (Willco Wells, Amsterdã, Holanda) e incubadas com as nanopartículas MRC (100 µM) por 24 e 48h. Posteriormente, as células foram lavadas com PBS várias vezes, fixadas com 3,7% de formaldeído em PBS durante 30 min e lavadas novamente. Os espectros de células (pelo menos 7 células por amostra) foram obtidos e analisados.

ESTUDO DE ENDOCITOSE

Os inibidores de caveolina e clatrina - metil beta ciclodextrina (MβCD - 20 µM) e Pit Stop 2 (20 µM), respectivamente -, foram administrados em culturas de células MDA - MB - 231 durante 30 min. Como controle positivo para endocitose utilizou-se ferritina associada a ALEXA-488 (endocitose dependente de clatrina) e lactosilceramida conjugada com BODIPY (via endocítica dependente de caveolina). A quantificação de células contendo nanopartículas ou tratadas com inibidores de vias endocíticas foi realizada por citometria de fluxo. Para Western Blot, as células MDA-MB-231, MCF-7 e HNTMC (1 × 10⁶) foram cultivadas em frascos de culturas. Foi adicionado meio fresco com 100 µM de MRC aos frascos que foram incubados durante 6 horas a 37°C. As

células foram lavadas três vezes em PBS gelado e a extração de proteína foi realizada com tampão de lise (Tris 50 mM pH 7,4, NaCl 150 mM, EDTA 5 mM e Triton X100 a 1% e cocktail de inibidor de protease). Os lisados foram centrifugados (10 min, 4°C). As concentrações de proteínas foram determinadas pelo ensaio *Bicinchoninic Acid Protein Assay*. Foi aplicado 20 µg de lisados de proteína total em gel de poliacrilamida e dodecil sulfato de sódio a 4% -12% (SDS-PAGE) para eletroforese. Posteriormente as bandas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose. As membranas foram bloqueadas com 5% de leite em pó desnatado em solução salina tamponada com Tris entre 0,1%, seguida por incubação com os anticorpos primários (anti-caveolina-1 1:1000 e anti-clatrina 1:500 - actina) e secundários (anti-mouse, anti-cabra e anti-coelho associados a HRP - 1: 5000). A revelação foi realizada por kit de quimioluminescência ECL.

5.7 ANÁLISE DA ATIVIDADE ANTITUMORAL DE NPS MRC

EFEITO DE NPS MRC NA SÍNTESE DE DNA E NO CICLO CELULAR

Para análise da síntese de DNA e do ciclo as células MDA-MB-231 e MCF-7 (5×10^5) foram plaqueadas em placas de 6 poços (10 cm^2) em meio apropriado. Após a aderência, para a análise da incorporação de BrdU, o meio foi trocado por outro contendo 10 µM de Bromodesoxiuridina (BrdU) e incu-

bado durante 2 h a 37°C para incorporação de BrdU no DNA. Como um controle negativo, um grupo não recebeu o BrdU. Posteriormente, as células receberam novo meio, e nos grupos experimentais foi adicionado o tratamento de nanopartículas contendo 100 µM MRC, por 24h. O grupo que não recebeu o tratamento foi considerado o “ponto zero” e foi coletado imediatamente após a incorporação de BrdU e processado até o passo de fixação overnight a 4°C. Após a fixação (15 min a temperatura ambiente ou *overnight* a 4°C), as células foram lavadas com PBS e permeabilizadas com Triton X-100 (0,1%) por 20 minutos. A solução de permeabilização foi removida e foi adicionado 1 mL de HCl (1N) por 10 minutos no gelo e posteriormente trocado por 10 mL HCl (2N) por 10 minutos à temperatura ambiente. Foi adicionado 1 mL de uma solução de fosfato e ácido cítrico (182 mL de 0,2 M de Na₂HPO₄ + 18 mL de 0,1 M de ácido cítrico, pH: 7,4) por 10 minutos à temperatura ambiente. O conteúdo foi removido, as células foram lavadas três vezes com triton X-100 (0,1%) e foram incubadas com 1 mL da solução contendo anticorpo (PBS/ 0,1% de Triton x-100, 5% de SFB e 1:100 de anti-BrdU conjugado a Alexa Fluor) por 4 horas (no escuro, à temperatura ambiente). Foi feita análise de incorporação de BrdU no citômetro de fluxo (FL1). Para a análise do ciclo celular, o conteúdo de DNA das células foi marcado com Iodeto de propídio (5 µg/mL) em uma solução contendo 5 µL de RNase (10 mg/ml) por 10 minutos. As células (10.000 de cada grupo em triplicata) foram analisadas em citômetro de fluxo (FL2).

AVALIAÇÃO DE CITOTOXICIDADE

O método utilizado para avaliar a viabilidade celular foi o método colorimétrico do MTT, baseado na análise da redução do reagente MTT em formazan, pela ação de desidrogenases mitocondriais. A presença destas enzimas ativas é um indicativo de viabilidade celular. Os cristais roxos de formazan, formados pela redução do MTT, são quantificados por técnicas de espectrofotometria. Após os períodos de tratamento (24, 48 e 72 horas) das células, nas concentrações de 50, 100 e 200 μM , o conteúdo dos poços contendo RC e MRC em meio de cultura foi substituído por uma solução de meio contendo 0,5 mg/mL de MTT (5 mg/mL em 0,15 M de PBS (tampão de fosfato de sódio: NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na_2HPO_4 10 mM; KH_2PO_4 2 mM; pH 7,4). Foram realizados tratamentos com os fármacos em poços vazios (sem células) seguindo das demais etapas do protocolo para posterior uso como os “brancos” correspondente a cada tratamento e concentração. Posteriormente, as células foram incubadas por 2,5 horas em estufa umidificada contendo 5% de CO_2 à 37°C. Em seguida, o meio de cultura com MTT foi removido e, logo, adicionados 200 μL de DMSO (Sigma) para solubilizar os cristais de formazan formados. Estes cristais foram quantificados em espectrofotômetro utilizando comprimento de onda de 595 nm.

TESTE DE MIGRAÇÃO CELULAR

Para avaliar a capacidade de migração/invasão de MDA-MB-231, as células (1×10^6) foram plaqueadas e tratadas com MRC NPs em frascos de 25

cm² durante 24 horas. O tratamento com 200 µM de nanopartículas foi feito nos frascos de cultura durante 24 horas. As células viáveis foram tripsinizadas, ressuspensas (2×10^4) em meio L15 sem soro fetal bovino (SFB) e adicionadas ao topo das inserções (Transwell para placas de 24 poças BD Biosciences) com poros de 8 µm revestidos com uma camada fina (30 µL) de Matrigel™ (BD Biosciences) diluído 5x em meio de L15 livre de soro fetal bovino congelado. A placa foi incubada durante 1 h a 37°C para uma solidificação da camada de Matrigel. Nos poços da placa, abaixo das inserções, foi adicionado meio L15 suplementado com 10% do SFB para atrair a migração das células através dos poros. Após 48h, os insertos foram removidos da placa e as células aderidas à parte superior do Transwell (que não migraram) foram removidas com um cotonete. As células restantes na parte inferior do inserto foram fixadas (paraformaldeído 3,7%, 15 minutos) e coradas com violeta de cristal (0,1%) durante 5 minutos. Todas as células coradas foram fotografadas (ampliação 5x) e a taxa de migração foi dada por contagem automatizada de células processadas com o software ImageJ.

AVALIAÇÃO DE RESISTÊNCIA CELULAR INDUZIDAS POR MRC

A produção das glicoproteína-P no lisado proteico das linhagens MDA-MB-231, MCF-7 e células HNTMC foram avaliadas por Western Blot. A proteína β-actina foi utilizada como controle interno. As células foram adicionadas a placas de 6 poços em quantidades de 5×10^5 células por poço. Após tratamento, (100 µM MRC, por 24 e 48 h) as células foram lisadas com 60 µL de Tampão Triton *Lysis Buffer* (Tris-HCl 50 mM Ph 7,4; NaCl 150 mM; EDTA 5 mM e Triton X 100 1%) com inibidor de protease, diretamente no poço, com o

auxílio de um rodo (*cell scraper*). As amostras foram coletadas em tubos tipo eppendorf e incubadas no gelo por 30 minutos. A cada 5 minutos as amostras foram vortexadas. Em seguida, os tubos foram centrifugados por 5 minutos, a 3000 r.p.m e os sobrenadantes foram transferidos para outros tubos. As amostras de proteínas totais foram armazenadas a -20°C e quantificadas utilizando-se o kit *Bicinchoninic Acid Protein Assay* de acordo com as recomendações do fabricante.

No gel de acrilamida de gradiente entre 4%-12%, foram aplicados 20 µg de proteínas totais de cada amostra. Antes de serem aplicadas, as proteínas foram fervidas por 5 minutos. A corrida do gel foi realizada a 160 V por 1 hora, utilizando-se o tampão Tris-Glicina (25 mM Tris; 250 mM Glicina; 1% SDS – pH 8,2).

Para o Western Blot, o gel foi transferido para a membrana de nitrocelulose, com tampão de transferência (24 mM Tris, 193 mM Glicina, 20% Metanol) pelo sistema *semi-dry* por 45 minutos, a 15V. A membrana foi bloqueada com tampão de bloqueio (5% leite desnatado Molico e 0,05% Tween-20 em PBS) por 1 hora em agitação, a temperatura ambiente. Em seguida, os anticorpos primários foram diluídos em tampão de bloqueio nas seguintes diluições: 1:1.000 anti-glicoproteína-P; 1:20.000 anti-β-actina e incubados com a membrana overnight, a -4°C. Em seguida, as membranas foram lavadas três vezes por 5 minutos em 0,05% Tween-20 em PBS e incubadas com os anticorpos secundários conjugados à HRP diluídos 1:5.000 em solução de bloqueio por 1 hora sob agitação, a temperatura ambiente. Após a incubação com anticorpo secundário as membranas foram lavadas três vezes por 5 minutos em 0,05%

Tween-20 em PBS e reveladas utilizando 1ml de cada solução do kit Amershan ECL™ Prime Western Blotting Detection Reagent, por 5 minutos.

ENSAIO DE MIGRAÇÃO CELULAR

Para avaliar a capacidade migratória/invasividade de células MDA-MB-231 após tratamento com NPs de MRC, as células foram plaqueadas (1×10^6) em garrafa de 25 cm² por 24 h. O tratamento com 200 µM de nanopartículas foi feito na garrafa de cultura por 24 h. As células passaram por tripsinização, foram contadas e avaliadas quanto a viabilidade (azul de trypan) ressuspensas (2×10^4) em meio L15 sem SFB e adicionadas a parte superior dos insertos (Transwell para placas de 24 poços - BD Biosciences), com poros de 8 µm, revestidos com uma fina camada (30 µL) de Matrigel™ (BD Biosciences) diluído 5x em meio L15 gelado livre de SFB. A placa foi incubada por 1h a 37°C para a solidificação da camada de Matrigel. Nos poços da placa abaixo dos insertos, foi adicionado meio L15 suplementado com 10% de SFB para atrair a migração das células através dos poros. Após 48 h, os insertos foram retirados da placa e as células aderidas na parte superior do Transwell (que não migraram) foram retiradas com um cotonete. As células remanescentes na parte inferior do inserto foram fixadas (paraformaldeído 3,7%, 15 minutos) e coradas com cristal de violeta (0,1%) por 5 minutos. Todas as células coradas foram fotografadas (magnificação de 5 x) e a taxa de migração se deu por contagem automática das células processada com o software Image J.

5.1 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados das análises quantitativas foram submetidos ao teste t Student para amostras não pareadas (entre dois grupos) ou à análise de variância simples (ANOVA) (entre três ou mais grupos). As análises estatísticas foram conduzidas utilizando o Software GraphPad Prism e os resultados foram expressos como Média \pm SEM ou desvio padrão (utilizados nas análises de caracterização das NPs). Valores de $P < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

6. RESULTADOS E DISCUSSÕES

6.1 CARACTERIZAÇÃO DOS FLUÍDOS MAGNÉTICOS

A suspensão de NPs MRC diluída em H₂O apresenta diâmetro hidrodinâmico médio de 119,5 nm com índice de polidispersividade (p.d.i) de 0,17, potencial zeta de -35 mV e manteve valores semelhantes após medições posteriores em diferentes intervalos de tempo. Este nanocomposto diluído em meio de cultura DMEM apresentou valores médio de diâmetro hidrodinâmico igual a 161 nm (p.d.i = 0,17) e 165 nm (p.d.i = 0,17) e potencial zeta de -12,9 mV e -10,6 mV em 0h e 12h, respectivamente. As NPs de MC em água mantiveram o diâmetro hidrodinâmico médio de 97 nm (p.d.i = 0,2) e potencial zeta médio de -44,7 mV. Em meio de cultura DMEM, o diâmetro hidrodinâmico médio dessas NPs foi de 411 nm com carga de superfície média = -12 mV e p.d.i

= 0,37 (0h) e 309 nm, - 12 mV e p.d.i de 0,28 em 12h (**Tabela 1**). Em meio de cultura, as duas nanopartículas sofreram alterações de diâmetro hidrodinâmico e de carga superficial. Aumento no diâmetro hidrodinâmico sugere a formação de coroa proteica na superfície da nanopartícula. (Moore, 2015). Nanopartículas estáveis podem se tornar instáveis devido às ligações com moléculas e proteínas, alterando suas características funcionais e favorecendo a formação de agregados (Allen, 1969; Zha, 2002). Esses processos podem influenciar o comportamento de partículas *in vivo*, assim como alterar significativamente o seu direcionamento (Moore, 2015). Além disso, alterações no pH e no estado de aglomeração, podem afetar a carga de nanopartículas (Berg et al. 2009). Nanopartículas MRC apresentaram estabilidade em água e meio de cultivo. No entanto, MC não se mostraram estáveis em meio fisiológico tal como meio de cultura (**Figura 5**), inviabilizando o uso dessas nanopartícula como controle nos demais testes.

Tabela 1. Caracterização das nanopartículas

SAMPLE	T (°C)	h.d. (nm)	P.D.I	Potencial zeta (Mv)
MRC H₂O	25	120 ± 1	0,17 ± 0,01	-35 ± 6
MRC DMEM – 0 h	25	161 ± 2	0,17 ± 0,01	-13 ± 2
MRC DMEM – 12 h	25	166 ± 3	0,17 ± 0,01	-11 ± 1
MC H₂O	25	97± 1	0,20 ± 0,02	-45 ± 6
MC DMEM – 0 h	25	411 ± 15	0,37 ± 0,05	-12 ± 1
MC DMEM – 12 h	25	310± 7	0,280 ± 0,003	-12 ± 1

Nanopartículas de maghemita associadas a citrato de Ródio (MRC). Nanopartículas de maghemita associadas a citrato (MC). Temperatura (T), diâmetro hidrodinâmico (h.d), Índice de poli diversidade (P.D.I), potencial zeta/millivolts (mV).

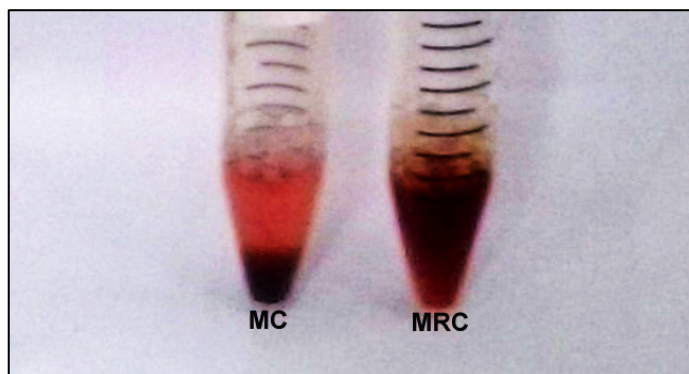


Figura 5. Nanopartículas de maghemita associadas ao citrato (MC) e associadas ao citrato de ródio (MRC) diluídas em meio de cultura (DMEM) por 6 horas a temperatura ambiente. MC (à esquerda) formou duas fases enquanto MRC (à direita) mante-se uniformemente diluídas em meio de cultura (DMEM) por 6 horas a temperatura ambiente. MC (à esquerda) formou duas fases enquanto MRC (à direita) mante-se uniformemente diluída.

6.2 ANÁLISE ULTRAESTRUTURAL DA INTERNALIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE MRC EM CÉLULAS

Após seis horas de exposição, as imagens de HNTMC mostraram algumas nanopartículas de MRC dentro do citoplasma (**Figura 6A, D**) e uma quantidade substancial de NPs envolvendo a superfície da membrana celular (**Figura 6D**). As imagens das células MCF-7 e MDAMB-231 revelaram nanopartículas frequentemente presentes no citoplasma (**Figura 6B, C**). É possível identificar as vesículas contendo nanopartículas desde a membrana celular até regiões próximas ao núcleo, especialmente em células MCF-7 (**Figura 6B, E**). Em células MDA-MB-231, as MRC NPs estão em alta concentração formando grandes grupamentos de nanopartículas (**Figura 6C, F**). Foi possível a visualização das nanopartículas dentro dos núcleos nas células MCF-7 (**Figura 6H**) e MDA-MB-231 (**Figura 6I**). No entanto, não foi identificada a presença de MRC em núcleos das células HNTMC (**Figura 6G**). Sinais de citoto-

xicidade foram observadas em células MCF-7 e MDA-MB-231 tais como cariorrexis (**Figura 6H, I**) e vacúolos (**Figura 6H, cabeça de seta**). Não é surpreendente que as três linhagens celulares comparadas tenham taxas de absorção de NPs distintas, uma vez que é bem conhecido que as taxas de endocitose são específicas ao tipo de célula (Cartiera et al. 2009). Estudos anteriores demonstraram a internalização de nanopartículas magnéticas com tamanhos semelhantes a MRC em MDA-MB-231, MCF-7 (Zhang et al. 2008; Cai et al 2015) e células semelhantes à HNTMC (Auffan et al. 2006).

Sabe-se que a formação de diferentes tamanhos de aglomerados entre linhagens celulares pode ocorrer durante a diluição do NPs em meio de cultura, uma vez que os componentes e o pH dos meios podem alterar o comportamento coloidal e a estabilidade, favorecendo a formação de agregação de nanopartículas (Moore et al. 2015). Considerando que cada um dos três tipos de células utilizadas nesse estudo requer um meio de cultura específico, este fator de interferência foi avaliado. As nanopartículas de MRC foram analisadas quanto às alterações dos diâmetros hidrodinâmicos após incubação com os três diferentes meios de cultura (L15, RPMI e DMEM) nas mesmas condições de tratamento com MRC nas células (37°C, 6h). Os resultados excluíram a influência do tipo de meio de cultura sobre a formação de agregados maiores e diferentes padrões de captação observados nos três tipos de células estudadas (**Figura 7**).

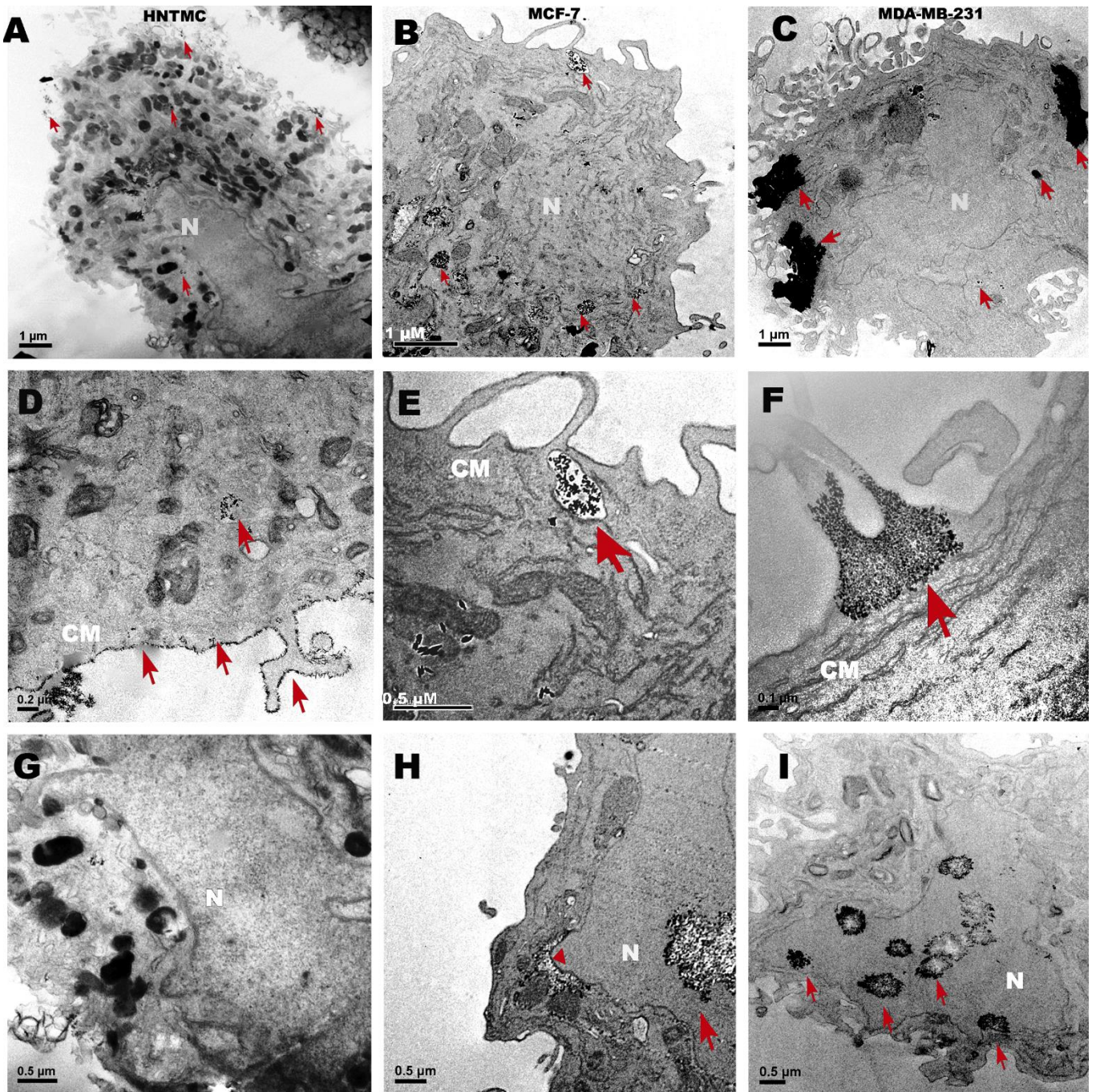


Figura 6. Micrografias eletrônicas de células expostas a MRC por 6 h. As imagens de células HNTMC mostraram algumas nanopartículas de MRC (indicadas por setas vermelhas) dentro do citoplasma (primeira coluna) e uma quantidade substancial de NPs que circundam a superfície da membrana celular (D). As imagens das células MCF-7 (segunda coluna) e MDA-MB-231 (terceira coluna) revelaram nanopartículas MRC frequentemente presentes no citoplasma. O agrupamento maior de nanopartículas MRC é encontrado em células MDA-MB-231 (C). As NPs MRC atingiram o núcleo (N) em células MCF-7 e MDA-MB-231 (H, I), enquanto núcleos livres de MRC foram observados em células HNTMC (G). A ponta de seta vermelha mostra vacúolos perinucleares em células MCF-7 (H). A cariorrexis é evidenciada no núcleo de MCF-7 e MDA-MB-231 (H, I).

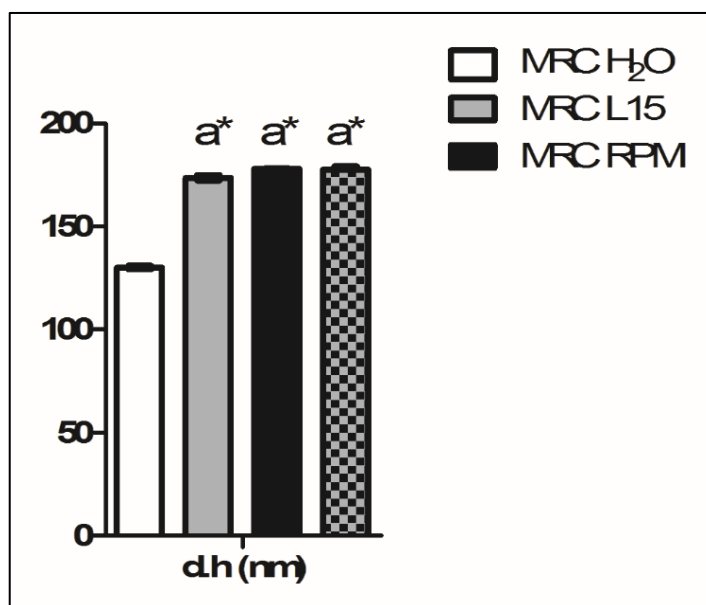


Figura 7. Análise do diâmetro hidrodinâmico (h.d) em meios de cultura. O gráfico mostra maiores valores de h.d de MRC diluídas em meios de cultura comparados as diluídas em água (a*). Não há diferença entre os diâmetros hidrodinâmico de NPs diluídas em meios L15, RPMI e DMEM.

6.3 CO-LOCALIZAÇÃO DE NPS POR MICROSCOPIA CONFOCAL DE RAMAN

O espectro Raman de suspensão aquosa de NPs MRC seca sobre placa de quartzo exibe picos, que são característicos das estruturas cristalinas de maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) e hematita ($\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$) (**Figura 8, à esquerda**). A presença de duas fases cristalinas pode ser explicada pelo efeito térmico induzido por laser que leva à transição de fase γ para a fase α (Chamritski et al. 2005).

Os dois picos principais em 210 e 280 cm^{-1} foram utilizados para a identificação das NPs em ambiente biológico (**Figura 8, à esquerda**).

As moléculas presentes nas células: proteínas, lipídios e ácidos nucleicos têm bandas de Raman distintas com picos na gama espectral de 600-3000 cm^{-1} . Essas regiões foram identificadas dentro da célula a partir dos espectros, com atribuição de cores distintas para cada uma delas (citoplasma, núcleos, lipídeos e NPs) (**Figura 8 à direita; Figura 9**).

A região nuclear de células foi identificada por picos de Raman a 788, 1097 e 1340 cm^{-1} . O pico a 788 cm^{-1} é atribuído ao modo de estiramento O-P-O da estrutura do DNA (Movasaghi et al. 2007). O pico no espectro do núcleo a 1097 cm^{-1} é atribuído ao modo de alongamento de PO_2 do DNA (Wyroba et al. 2015) e 1340 cm^{-1} corresponde à guanina e adenina (Notingher et al. 2004). A região de alta frequência acima de 2000 cm^{-1} contém principalmente informações sobre os modos de estiramento C-H dos grupos metileno e metila. Em particular, essa região revela a presença e a proporção de grupos CH_3 e CH_2 , que são importantes para identificar regiões ricas em proteínas, e lipídeos e proteínas. As bandas de estiramento simétrico de CH_2 (2850 cm^{-1}) são muito mais intensas em lipídios do que no citoplasma devido a uma menor densidade de grupos CH_2 em proteínas em comparação com lipídeos. Nas gotículas lipídicas (GLs), esse modo de alongamento é muito intenso. As bandas específicas de adenina e guanina do núcleo, a amida I das proteínas e os alongamentos de CH_2 , os modos CO e C = C das GLs podem ser facilmente observados e servem como ferramenta para a discriminação da composição química das células (Chamritski et al. 2005; Notingher et al. 2003; 2004).

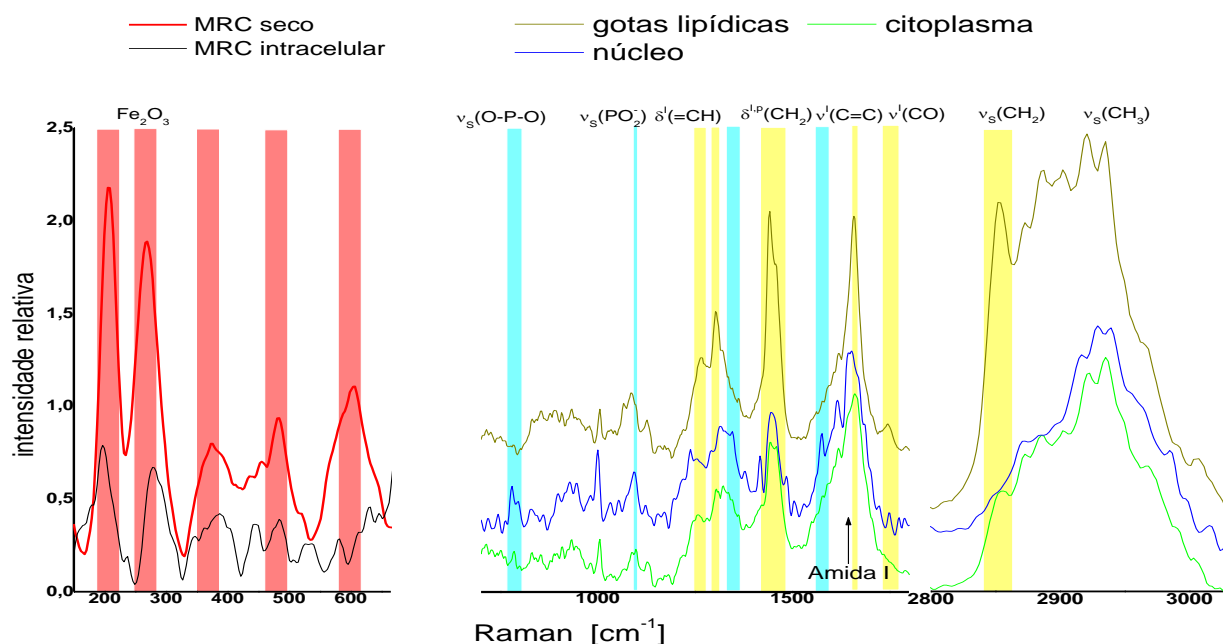


Figura 8. Identificação do espectro de nanopartículas. Os espectros vermelhos e pretos correspondem a NPs diluídas em água secas sobre um substrato de quartzo e dentro das células MDA-MB-231, respectivamente.

A **Figura 9** mostra as imagens de Raman das células MCF-7 e MDA-MB-231 geradas a partir dos códigos espectrais moleculares de diferentes componentes celulares e nanopartículas. As NPs estão co-localizadas com o citoplasma, região perinuclear e com regiões nucleares após 24 h de exposição em células MCF-7 e MDA-MB-231, em concordância com os dados de MET. Os espectros foram gerados calculando a média de todos os espectros na região de interesse e, em seguida, separados utilizando o "algoritmo DEMIX". A análise de agrupamento (*cluster*) também foi utilizada para os espectros básicos.

As NPs foram inteiramente internalizadas em ambas as linhagens celulares com localização citoplasmática e região perinuclear após 24h. No entanto, houve um padrão de translocação de NPs diferente nas células MCF-7 e MDA-MB231. As NPs MRC foram encontradas em grandes aglomerados intracelulares em MDA-MB-231 (**Figura 9**). Esta observação está de acordo

com os dados de MET. Nas células MCF-7, as NPs foram distribuídas em toda a célula, mas na maioria os agregados variaram de 0,5 a 1 μm na região perinuclear (**Figura 9, acima**). Já em MDA-MB-231 os aglomerados alcançaram mais 2 μm (**Figura 9, abaixo**). As NPs MRC também foram encontradas parcialmente localizadas com GLs em ambas as células.

A presença de nanopartículas MRC no núcleo também foi evidenciada pela análise de micro espectroscopia confocal de Raman corroborando as análises por MET. Estudo recente demonstrou que a localização celular de fármacos pode determinar o seu mecanismo de ação anticancerígeno. Neste contexto, a translocação do composto para o núcleo da célula pode induzir o bloqueio do ciclo celular na fase S por meio do desencadeamento da resposta ao dano do DNA mediada por p53, alcançando uma eficácia anticancerígena mais elevada do que outras formulações localizadas no citoplasma (Che et al. 2015).

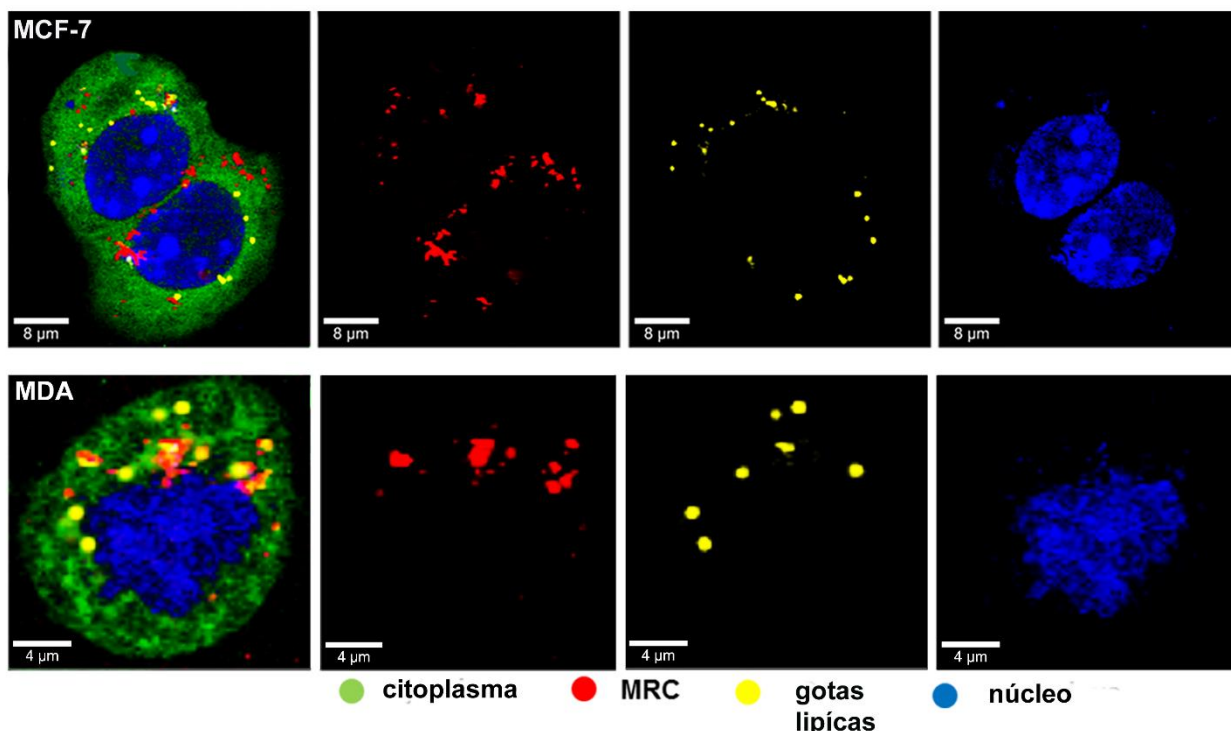


Figura 9. Localização intracelular de nanopartículas MRC por Microscopia Confocal de Raman. Imagens de diferentes componentes celulares de MCF-7 (linha acima) e MDA-MB-231 (linha abaixo) expostos a MRC por 24 horas. As imagens codificadas por cores à esquerda representam a sobreposição de citoplasma (verde), NPs MRC (vermelho), gotas lipídicas (amarelo) e núcleo (azul).

Algumas características observadas nos espectros de MRC intracelular são típicas de estruturas vesiculares como endossomos e lisossomos (**Figura 10**). A frequência do modo de respiração do anel aromático da fenilalanina em torno de 1000 cm^{-1} pode ser atribuída aos endossomos (Xie et al. 2005). As bandas entre $1275\text{ a }1300\text{ cm}^{-1}$ são atribuídas ao estiramento e os modos de flexão da estrutura de CH_2 do imidazol. Da mesma forma, $=\text{C-H}$ no modo flexão e respiração do anel encontrados na frequência em torno de $1285\text{ - }1300\text{ cm}^{-1}$ é atribuído a imidazol nos endossomos e tende a sofrer alteração para $1275\text{-}1285\text{ cm}^{-1}$ em lisossomos (Stewart & Fredericks 1999; Mesu et al. 2005). Um pico forte a $1349\text{ - }1357\text{ cm}^{-1}$ nos endossomos corresponde ao alongamento do anel $=\text{N-C}$ e $\text{C}=\text{N}$ em imidazol. Este pico sobrepõe-se com o modo de ondulação em CH_2 encontrado a 1325 cm^{-1} nos endossomos e é deslocado até 1370 cm^{-1} em lisossomos possivelmente devido ao pH mais

baixo. Além disso, N-H no modo flexão junto com o estiramento da estrutura de C=N nos anéis de imidazol possui frequência em torno de 1472-1482 cm^{-1} em endossomos (Huefner et al. 2005). Os principais picos observados nos espectros das nanopartículas dentro das células estão resumidos na **Tabela 2** com suas respectivas interpretações.

Conjuntamente esses dados sugerem que as nanopartículas MRC são incluídas em vesículas em ambas as células. Este resultado foi esclarecedor, principalmente para a captação em células MDA-MB-231 nas quais não foi possível visualizar estruturas de vesículas em torno dos aglomerados de nanopartículas nas imagens adquiridas por MET.

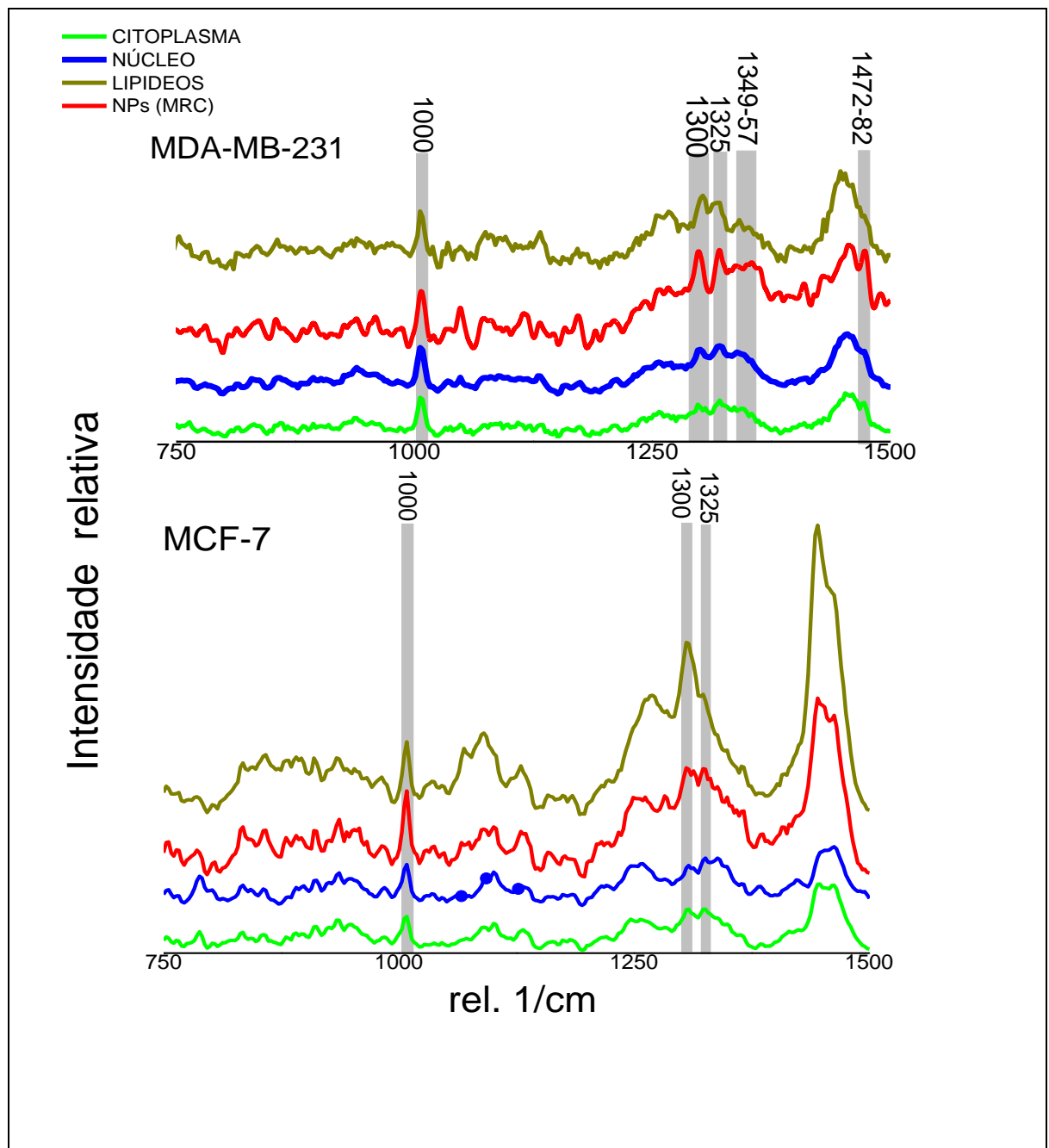


Figura 10. Espectros das regiões de interesse (lipídeos, NPs, núcleo e citoplasma) de células MDA-MB-231 e MCF-7 mostrando a co-localização de MRC com vesículas endocíticas. A figura mostra a região do espectro entre 750 e 1500 cm^{-1} .

Tabela 2. Resumo dos picos em destaque no espectro

PICOS (cm ⁻¹)		INTERPRETAÇÃO	
MDA-MB-231	MCF-7		
1349 - 1357	1349 - 1357	= N-C e C = N em imidazol (alongamento do anel)	Estruturas vesiculares
1275-1300	1275-1300	CH ₂ do Imidazol (flexão)	
650/670	650/670	Tirosina / Guanina	Elementos nucleares
788	788	Modo de estiramento O-P-O da estrutura do DNA	

6.4 EFICIÊNCIA DA CAPTAÇÃO CELULAR DE NPS

Para avaliar a captação de nanopartículas de MRC por MDA-MB-231, MCF7 e HNTMC, as regiões de células foram selecionadas a partir das imagens adquiridas por MEV. A seleção das células foi definida pela intensidade luminosa (**Figura 11A, B**). A presença do elemento ósmio no espectro foi utilizada como um padrão interno para definir as regiões celulares, uma vez que os diferentes componentes celulares contêm moléculas de metal pesado (usualmente ósmio) usadas durante a preparação das amostras para MET. Esse agente contrastante está presente principalmente em lipídios, como na região de membranas. Apesar de ser um ótimo controle das regiões celulares, interfere e sobrepõe significativamente nos espectros do EDS (Wyroba et al. 2015)

O nível de Fe subcelular quantificado em MDA-MB-231 foi maior do que nas outras duas células. HNTMC tinha a menor quantidade intracelular deste elemento (**Figura 11C**). Proporção semelhante da distribuição de concentração de nanopartículas MRC ($\text{NPs}/\mu\text{m}^2$) entre os três tipos celulares foi revelada por análises de imagens adquiridas por MET (**Figura 11D**). Estes resultados reforçam os diferentes padrões de captação de NPs em células de câncer da mama não metastático (MCF-7), câncer de mama metastático (MDA-MB-231) e células mesenquimais não tumorais (HNTMC) já observadas em micrografias de MET. A avaliação *in vitro* utilizando células semelhantes à HNTMC revelou uma menor internalização de NPs de maghemitas em comparação com células tumorais (HeLa), corroborando os nossos resultados (Auffan et al. 2006). Ambos os métodos foram particularmente contributivos

para este trabalho por alcançar concentrações de NPs dentro das células (devido à secção) e por excluir variáveis indesejáveis tais como variações de tamanho de células e nanopartículas associadas a superfície das células. Além disso, as técnicas aplicadas são livres de marcação. Técnicas de dosimetria livre de marcação e de imagens são vantajosas pois permitem o estudo direto de nanomateriais autênticos. Metodologias que empregam o laser confocal e a citometria de fluxo utilizadas usualmente para a localização e quantificação de nanopartículas requerem marcação fluorescente e moléculas de fluoróforos que podem alterar significativamente as propriedades superficiais dos nanomateriais e, assim, mascarar sua captação e distribuição celular (Collins et al, 2016). A diferença na eficiência da absorção de partículas pode ser explicada por variações na composição da membrana celular e na atividade metabólica das células testadas (Brunner et al. 2006; Kettler et al. 2014). As células MDA-MB-231 e MCF-7 têm uma captação de aproximadamente 3 e 2 vezes (respectivamente) mais elevadas do que as células HNMTC (células não tumorais). A alta atividade metabólica das células tumorais pode levar à superexpressão dos receptores de superfície, o que pode contribuir para o aumento da captação de NPs (Kholer et al. 2005).

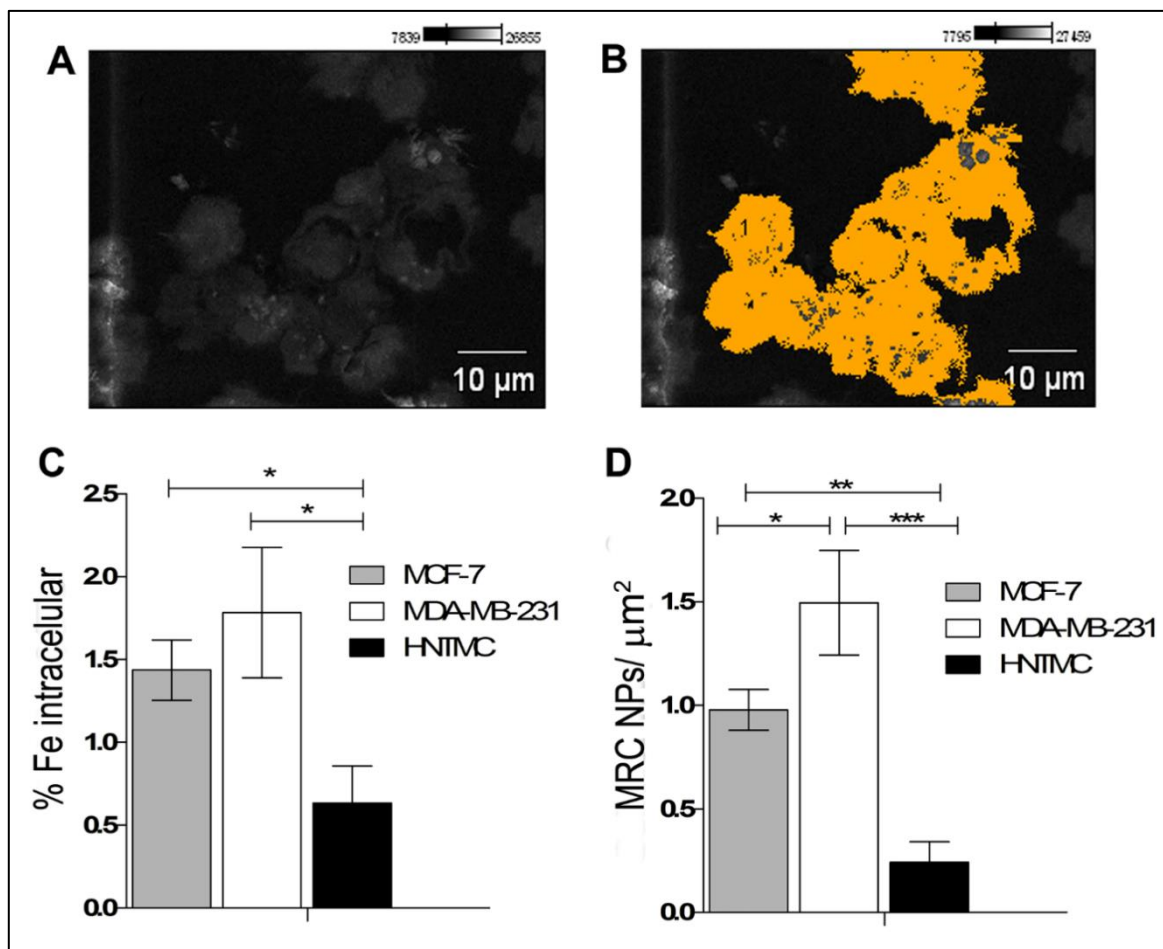


Figura 11. Eficiência da captação de MRC. (A) Células em seções de resina visualizadas por Microscópio Eletrônico de Varredura. (B) A região do conteúdo de células selecionada por intensidade de luz para realizar a análise de EDS. (C) Percentagem de ferro em células analisadas por EDS. (D) Quantidade de MRC em μm^2 em células MDA-MB-231, MCF-7 e HNTMC analisadas em micrografias de MET. * $P < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

6.5 ESTUDO DE ENDOCITOSE

A fim de elucidar a via de endocitose envolvida na captação de NPs de MRC, foi realizado um teste de Western blot para avaliar os níveis de expressão de clatrina e caveolina, proteínas que caracterizam duas rotas importantes de endocitose, tanto em células tumorais como normais, controles ou tratadas com NPs. É possível notar que as células tumorais, MCF-7 e MDA-MB-231,

apresentaram níveis basais muito mais elevados de expressão de clatrina do que as células HNTMC (**Figura 12A e Figura 13**). O tratamento com NPs levou a um aumento na expressão de clatrina em todas as linhagens celulares, mas de forma mais pronunciada nas células HNTMC e MCF-7 (**Figura 12A**). No que diz respeito à expressão da caveolina, não foram observadas diferenças entre o controle e as células tratadas em todas as três linhagens celulares, e como esperado, as células epiteliais MCF-7 apresentaram níveis muito mais baixos de caveolina. Esses resultados sugerem que a endocitose de MRC é provavelmente dependente de clatrina devido à sua ocorrência ubíqua em células eucarióticas e, como as células HNTMC expressam níveis basais mais baixos desta proteína, isso pode explicar a melhor seletividade das NPs para as células tumorais em comparação com células normais neste trabalho. Para testar esta hipótese, as vias endocíticas dependentes de clatrina e caveolina foram inibidas individualmente com doses não citotóxicas (**Figura 14 e 15**) de Pit Stop 2 e metil beta ciclodextrina (M β CD), respectivamente, em células MDA-MB-231. Esta análise foi conduzida com avaliação por citômetro de fluxo dos parâmetros *Forward Scatter* (FSC) e *Side Scatter* (SSC) (**Figura 12B**). As intensidades de FSC e SSC são proporcionais ao tamanho da célula e à densidade intracelular, respectivamente, permitindo a distinção de células que possuem NPs internalizadas (**Figura 12A**). A transferrina marcada com Alexa-488 e a lactosilceramida BODIPY-LacCer foram utilizadas como controle positivo para endocitose dependente de clatrina e caveolina, respectivamente. A internalização da transferrina marcada com Alexa-488 foi inibida em 40% com o tratamento com Pit Stop 2 e a absorção de lactosilceramida também foi significativamente reduzida na presença de M β CD (**Figura 14**), confirmando a

inibição efetiva dessas vias endocíticas. A incubação de células MDA-MB-231 tratadas com MRC e previamente, com Pit Stop 2 resultou em aproximadamente 30% de inibição da absorção de nanopartículas. No entanto, a absorção celular de MRC não foi reduzida quando a via dependente de caveolina foi inibida. Juntos, esses dados corroboram os resultados anteriores do WB, indicando que a internalização dessas NPs parece ocorrer de maneira dependente de clatrina. A via da caveolina parece não participar da captação de nanopartículas MRC nessas linhagens celulares (**Figura 12C**).

Partículas e fármacos endocitados pela via da clatrina tem como destino a degradação lisossomal ou a reciclagem para a superfície celular. Portanto essa via tende a ser evitada na formulação de nanoestruturas que não possuem os lisossomos como alvo (Benmerah & Lamaze 2007). No entanto, sabe-se que a carga superficial tem um papel fundamental no escape lisossomal mediante a um efeito conhecido como “efeito de esponja de próton” que postula que o aumento de íons dentro dos endossomos causa osmólise e consequente liberação de sua carga no citosol. Esse efeito é alcançado por partículas catiônicas que são capazes de absorverem prótons dentro dos compartimentos endossômicos (Canton & Battaglia 2012). Apesar de MRC diluída em água apresentar carga superficial negativa, elas tendem a perder íons em meio biológico (**Tabela 1**). Deve-se considerar que no meio extra e intracelular as NPs interagem com diversas proteínas e moléculas, algumas das quais são capazes de adsorverem a suas superfícies e alterarem algumas de suas características como carga superficial (Nel et al. 2009). Além disso, variação da localização intracelular de NPs com e sem coroa proteína proveniente do SFB já foi relatada (Lesniak et al. 2012). A coroa proteica das MRC pode torna-las

catiônicas no seu percurso até os endossomos de onde as NPs são liberadas e alcançam o núcleo celular onde, provavelmente, está centrada sua ação antitumoral.

É possível conectar o maior agrupamento de nanopartículas, encontradas principalmente em MDA-MB-231 (**Figura 6C**) com o seu mecanismo de endocitose de MRC dependente de clatrina, uma vez que o tamanho das partículas pode influenciar a via de endocitose (Chithran et al. 2006). No entanto, os dados que suportam esta relação e mecanismo é limitado e controverso, especialmente com modelos de células tumorais (Nel et al. 2009). Os dados encontrados nesse trabalho estão de acordo com estudos que mostraram que a captação de partículas ou aglomerados com um diâmetro de 500 nm é mediada por clatrina (Zhang et al. 2010, Blechinger et al. 2013). Alguns trabalhos sustentam que a internalização de partículas com diâmetros inferiores a 200 nm envolve vesículas revestidas com clatrina enquanto partículas maiores são absorvidas por mediação de caveolina (Rejman et al. 2004; Suen et al. 2014). Estes dados conflitam, no entanto, com as estimativas de diâmetros de 50-80 nm e 120 nm para vesículas de caveolina e revestidas com clatrina, respectivamente. Com base nessa estimativa, presume-se que as dimensões das vesículas de revestimento provavelmente limitam o tamanho das partículas que serão internalizadas (Patel et al. 2007; Gratton et al. 2008; Ketler et al. 2014).

O processo de endocitose pode potencialmente controlar muitas atividades relacionadas com a proliferação e migração de células cancerígenas. Estes processos requerem a modulação dinâmica de proteínas de superfície celular por endocitose. Dada esta conexão funcional, tem sido sugerido que a

endocitose é desregulada no câncer resultando em células com diferentes fenótipos (Elkin et al. 2015). Os presentes resultados demonstraram alto nível basal de expressão de clatrina em células tumorais. Esta relação funcional pode revelar um importante marcador de fenótipo tumoral. No entanto, mais estudos são necessários para explorar diretamente o papel e a regulação de clatrina em células de câncer de mama.

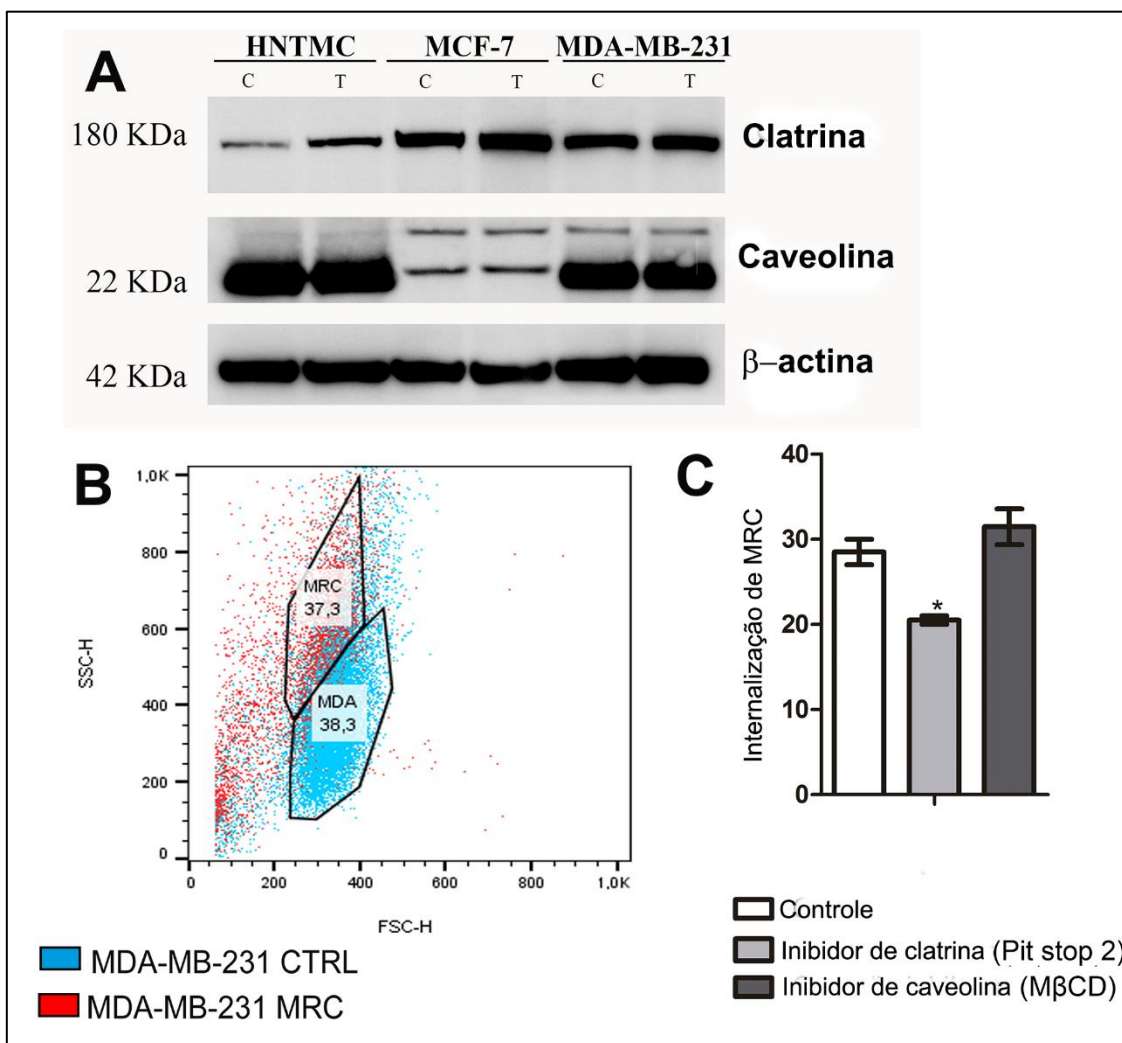


Figura 12. Estudo de endocitose. (A) Western blot mostrando expressão de clatrina e caveolina em MDA-MB-231, MCF-7 e HNTMC. As amostras foram normalizadas para igualar a proteína total. (B) Análise de dispersão de luz por citometria de fluxo mostrando células MDA-MB-231 com nanopartículas de MRC (vermelho) e sem nanopartículas de MRC (azul). (C) A captação de MRC por MDA-MB-231 foi quantificada após inibição de clatrina (pit stop 2) e caveolina (metil beta ciclodextrina). * $P < 0,05$.

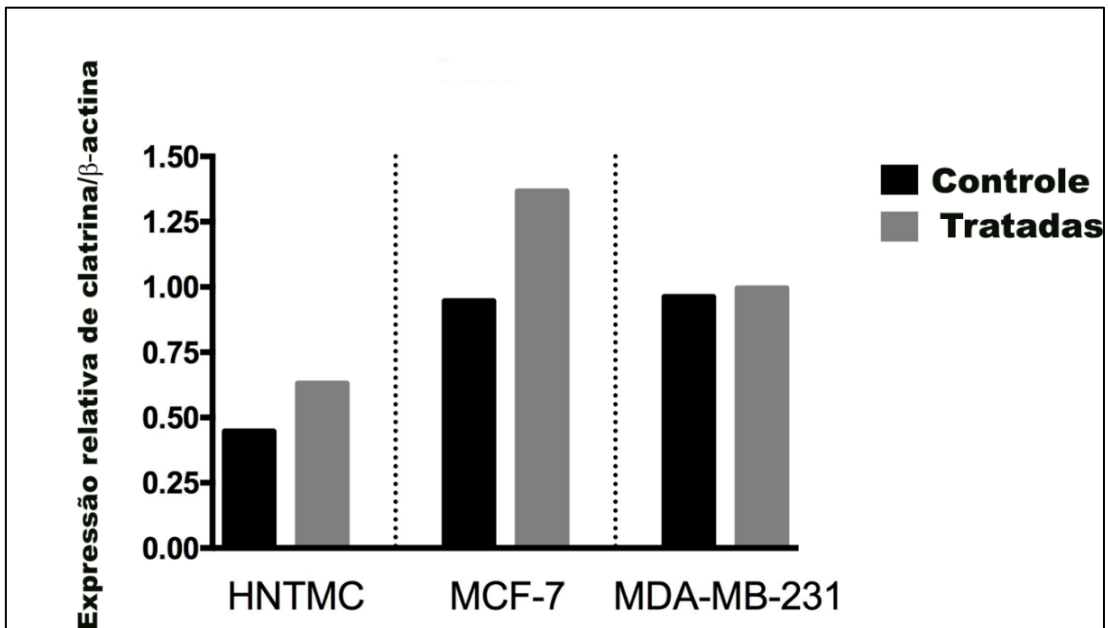


Figura 13. Expressão relativa de clatrina. Os dados para o gráfico foram normalizados com base na expressão de beta-actina e representa a expressão basal (controle) e pós tratamento com MRC (100 μ M) por 6 horas em células HNTMC, MCF-7 e MDA-MB-231.

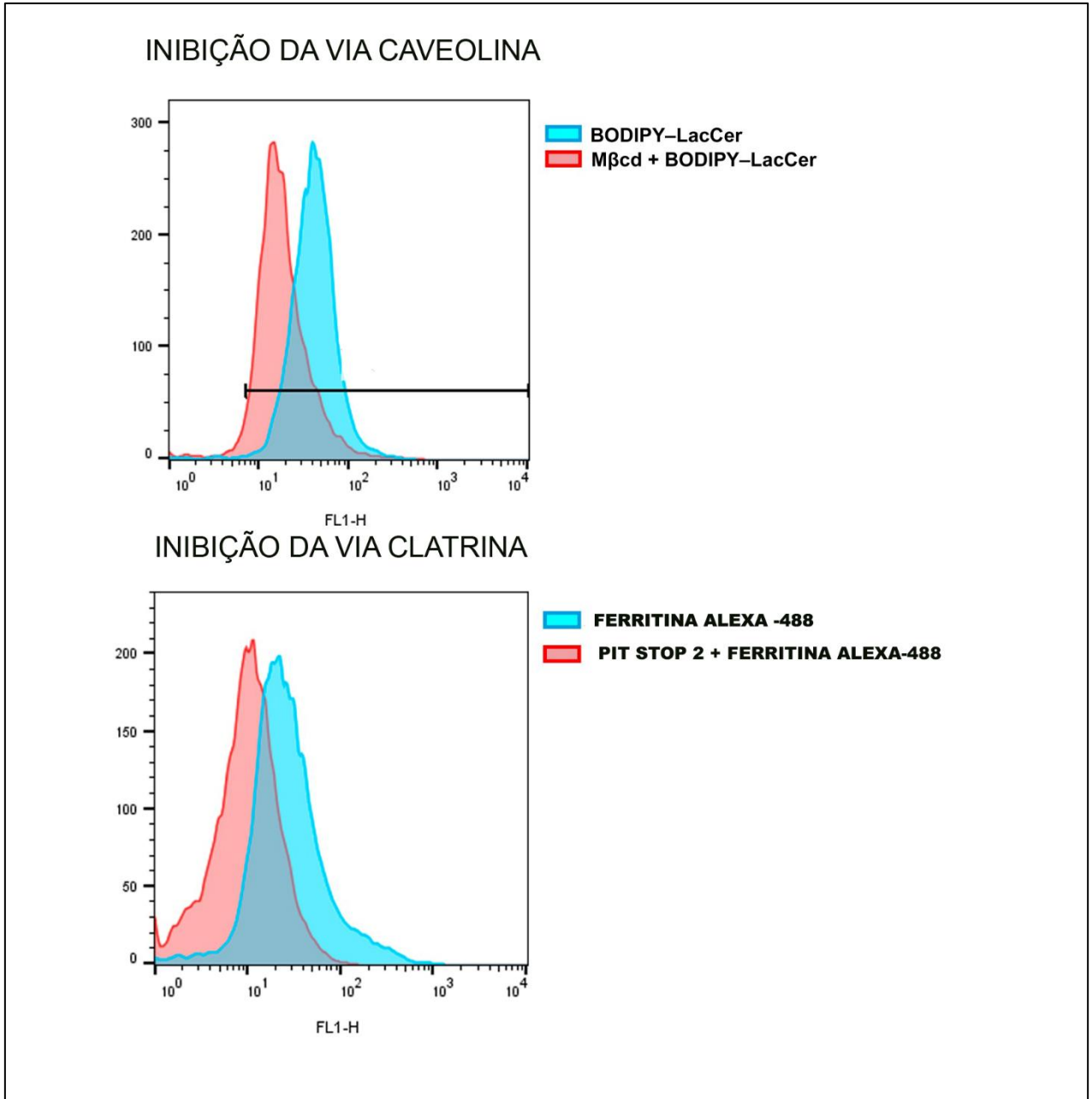


Figura 14. Inibição das vias de endocitose dependente de clatrina e caveolina. Os histogramas mostram que as vias de caveolina (acima) e clatrina (abaixo) foram inibidas. A internalização dos controles de endocitose BODIPY-LacCER (caveolina) e Ferritina-Alexa 488 (clatrina) foram avaliados antes e após a inibição das vias de caveolina e clatrina com metil- β -ciclodextrina e Pit Stop 2, respectivamente.

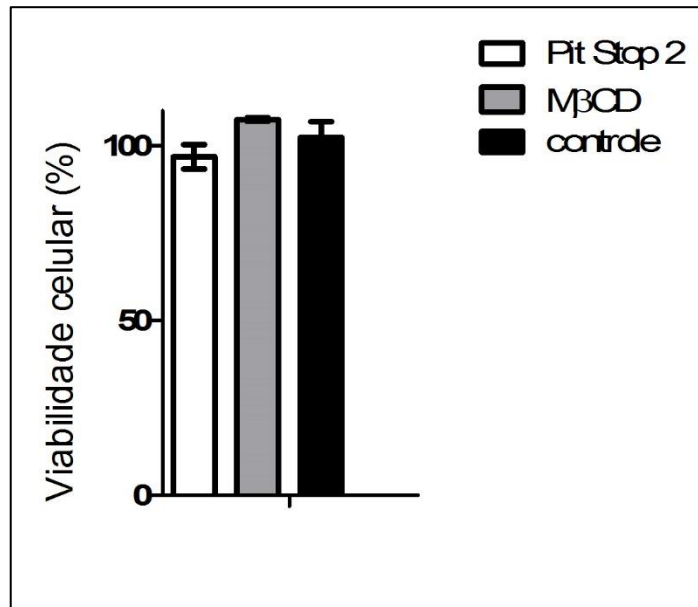


Figura 15. Viabilidade celular após tratamento com inibidores de endocitose. O gráfico representa a viabilidade de células MDA-MB-231 tratadas com 20 μM de inibidores da via clatrina (Pit Stop 2) e caveolina (M β CD) por 2 horas.

6.6 ANÁLISE DE CITOTOXICIDADE

As células não tumorais (HNTMC) não tiveram suas viabilidades estatisticamente alterada pelo tratamento por até 72h com as NPs MRC, e RC nas concentrações de até 200 μM (**Figura 16A, B, C**). Estudos de viabilidade com MRC em linhagens não tumorais já demonstraram baixa toxicidade desse nanocomposto nestas células (Carneiro et al. 2013; Chaves et al. 2015). No entanto, sabe-se que células de linhagens estabelecidas sofrem processos de imortalização que as modificam, tornando-as mais resistentes (Bana & Bagrel 2011). A utilização de células de cultivo primário como as utilizadas no presente trabalho, foi essencial para complementar a elucidação *in vitro* de um

possível efeito específico passivo das NPs. O tratamento contendo nanopartícula (200 μ M MRC) induziu significativamente a inviabilidade de células MDA-MB-231, em 24 horas de tratamento (**Figura 16A**). No entanto, observou-se uma maior redução de células viáveis após 48 e 72h (**Figura 16B, C**). Nota-se que o composto contendo nanopartículas foi mais efetivo nesta linhagem do que o RC livre. Enquanto MRC induziu citotoxicidade progressiva em células MDA-MB-231 ao longo do tempo, em células MCF-7 o efeito não foi dependente do tempo de exposição (**Figura 16A, B, C**). Apesar de terem sua viabilidade reduzida significativamente em 24 horas de tratamento com MRC já na dose intermediária (100 μ M), as células parecem recuperar sua viabilidade a partir de 48 horas de exposição (**Figura 16A, B**). Os diferentes comportamentos observados nos dois modelos celulares testados podem contribuir para um melhor entendimento da ação dessas NPs. Conseqüentemente, esses dados podem auxiliar na predição posológica mais apropriada para as diferentes células. Assim, em tumores com características semelhantes às células MCF-7, a exposição repetitiva a formulação parece ser mais indicada, enquanto em tumores semelhantes às células MDA-MB-231, por ter um efeito mais duradouro, vias de administração intravenosa com intervalos maiores de aplicação podem ser suficiente (Eastman, 2017). No entanto, testes de toxicidade *in vivo* são necessários.

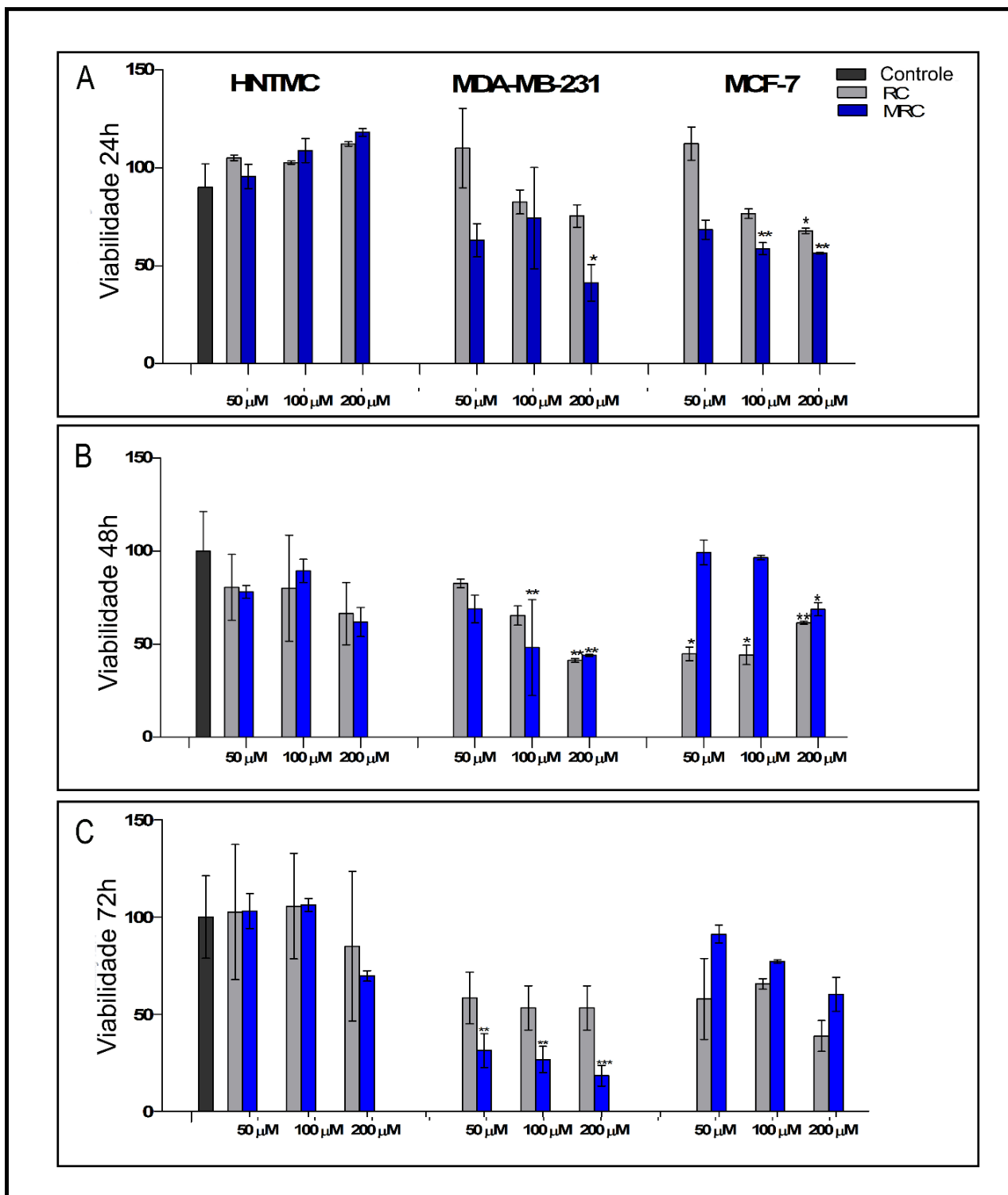


Figura 16. Viabilidade celular de linhagem metastática de câncer de mama (MDA-MB-231), linhagem não metastática de carcinoma mamário (MCF-7) e não tumorais (HNTMC). O ensaio foi realizado após 24 (A), 48 (B) e 72h (C) de exposição ao tratamento com 50, 100 e 200 μ M de citrato de ródio livre (RC) e associado a nanopartículas (MRC). *p < 0.05, ** p < 0.01, ***p < 0.005.

6.7 ACÚMULO DE MRC E SEU EFEITO NAS CÉLULAS TUMORAIS

Após 24 h de tratamento, ambas linhagens apresentaram características de citotoxicidade como vacúolos e núcleo picnótico. Algumas células, especialmente MCF-7, apresentaram um grande vacúolo (V) único (**Figura 17**) sugestivo de processo autofágico (Park et al. 2009; Al-Bahlani et al. 2017). Após 48 h de exposição as NPs, observa-se um acúmulo maior de NPs em células MDA-MB-231 nas mesmas regiões que foram detectadas em 24h (citoplasmática e perinuclear) com aglomerados maiores alcançando mais de 5 µm de diâmetro, enquanto em MCF-7 o espectro das NPs MRC não foi localizado em nenhuma das células analisadas (**Figura 18A, B**). Além disso, nas células MDA-MB-231 as organelas e constituintes celulares estavam bastante desintegrados (**Figura 18B**). A ausência de NPs em MCF-7 após 48h de tratamento pode ser devido a algum mecanismo de resistência ativada por essas células que causam efluxo de droga (Han et al. 2012; Lu et al. 2012). Estudos recentes têm relacionado a autofagia como um mecanismo protetor e sugerem que a indução autofágica é um mecanismo de quimiorresistência (Levy & Thorburn 2011; Guo et al. 2016). Por outro lado, além da controversa em relação ao papel da autofagia em mecanismos preventivos ou promotores tumorais, testes específicos seriam necessários para confirmar a indução de autofagia por MRC nestes modelos de células tumorais.

Os espectros dos núcleos das células tratadas por 24 e 48h em relação a células controles (não tratadas) apresentaram variações em MCF-7 e MDA-

MB-231 no pico 2862 cm^{-1} (**Figura 18C**), sugestivo de alterações conformacionais (alongamento simétrico/assimétrico de CH_2) de lipídeos e proteínas (Movasaghi et al. 2007). Padrões de alterações na conformação destas moléculas já foram descritos em tecidos e órgãos murinos tratados com cisplatina (Huang et al. 2011). Em células MDA-MB-231 as variações dos picos foram mais proeminentes após 48h de tratamento e são compatíveis com o espectro de glicogênio (**Figura 18C, setas amarelas**). Para a divisão celular, as células dependem de energia proveniente, principalmente, de glicólise. Esta demanda é especialmente maior em células tumorais metastáticas, sendo este processo incompatível com a produção de reservas em forma de glicogênio. Portanto, o aumento de glicogênio em células MDA-MB-231, após 48 horas de exposição a NPs MRC pode estar relacionado com a redução de atividades celulares como a divisão e metástase (Crow et al. 2005; Lyng et al. 2007; Daniel et al. 2014). Apesar de o glicogênio estar localizado predominantemente no citoplasma, esta molécula também pode acumular-se no núcleo e mitocôndrias especialmente na forma de glicogênio sintase quinase- 3β (GSK3 β). O aumento de GSK3 β no núcleo de células já foi relacionado com efeito apoptótico após o tratamento com Camptotecina ou Tapsigargina (Bijur & Jope 2003).

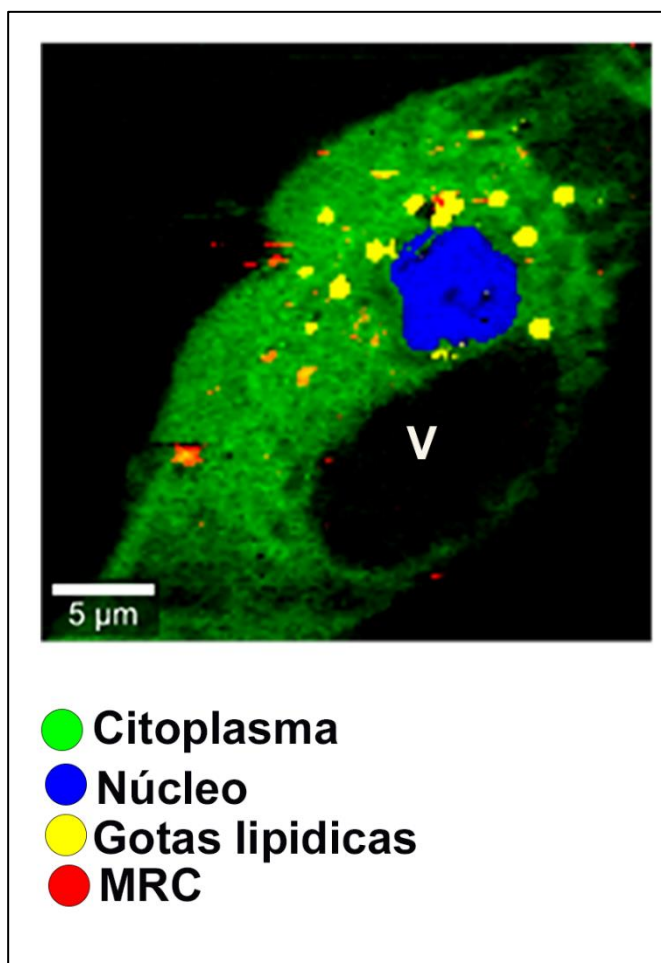


Figura 17. Alterações morfológicas em células tumorais induzidas por MRC. A figura mostra célula MCF-7 tratada com MRC por 24 horas com um grande vacúolo (V) no citoplasma e núcleo picnótico (azul).

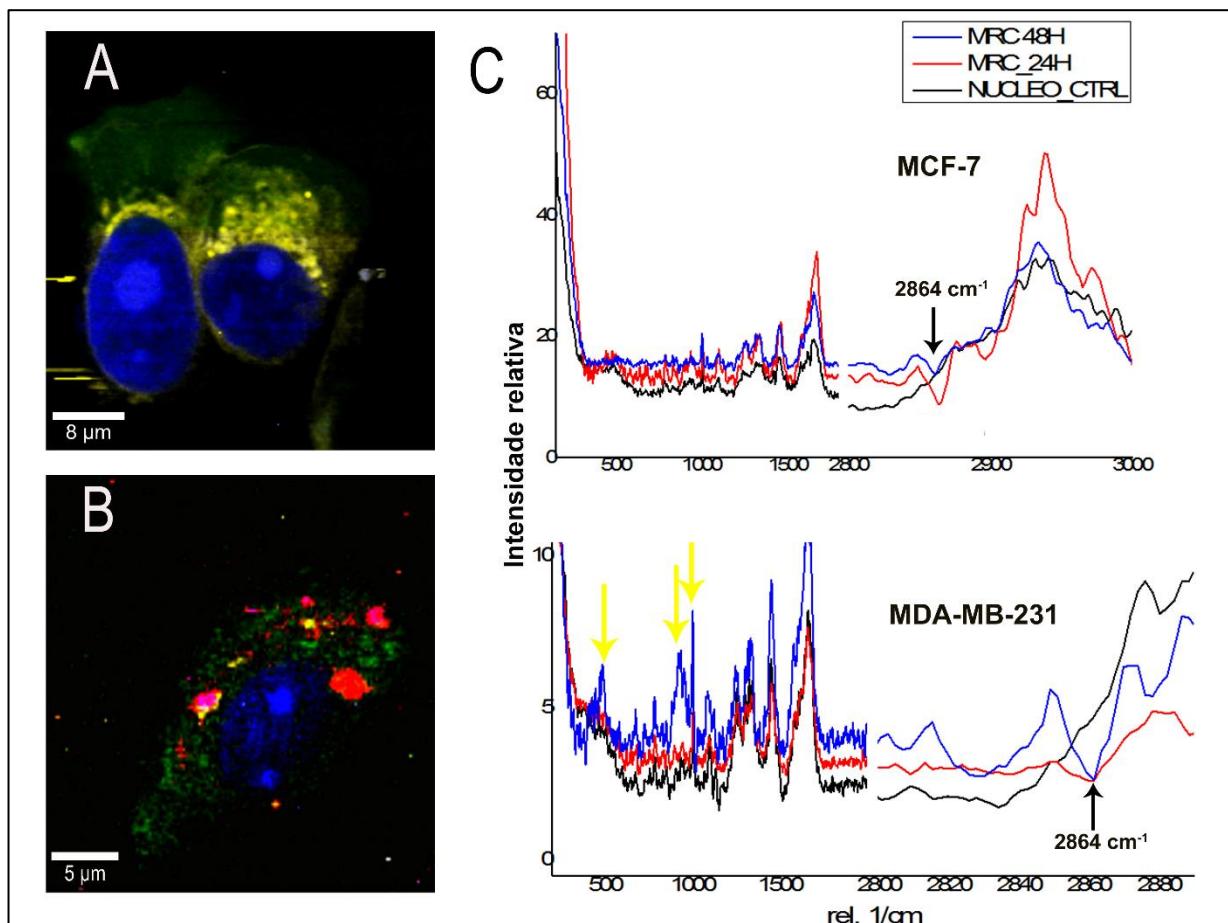


Figura 18. Micro espectroscopia das células de câncer de mama após 48 h de tratamento com MRC. Imagem da distribuição de MRC (48h) em células MCF-7 (A) e MDA-MB-231 (B). Espectros dos núcleos de células MCF-7 (C acima) e MDA-MB-231 (C abaixo). Os espectros pretos correspondem aos núcleos células controle não tratadas e os vermelhos e azuis correspondem aos núcleos de células tratadas com 100 μM de MRC por 24 e 48 horas, respectivamente. As setas amarelas apontam picos alterados (glicogênio) em células MDA-MB-231 tratadas por 48 horas com MRC.

6.8 AVALIAÇÃO DE EXPRESSÃO DE GLICOPROTEÍNA-P (GPP) EM CÉLULAS TUMORAIS TRATADAS COM MRC

As células MDA-MB-231 não tiveram o nível de expressão de glicoproteínas-P alterada após exposição ao tratamento com MRC por 24 e 48h. Já em células MCF-7, houve um aumento significativo da detecção dessa proteína

em 24 horas de tratamento (**Figura 19**). Glicoproteína-P medeia um dos principais processos de resistência a multifármaco, por meio do efluxo em células tumorais (Jain, 2008). Estudos já demonstraram a indução de resistência nesta linhagem (Tsou et al. 2015). Resistência a NPs mediante proteína GPP em células MCF-7 pode explicar a ausência do espectro de Raman de MRC nestas células após 48 horas de exposição às MRC (100 μ M). Este resultado pode ainda relacionar-se com os dados que demonstraram uma ação mais brandas na citotoxicidade ao longo do tempo. Estudos indicam que o aumento da expressão da proteína GPP está relacionado com a resistência adquirida pelas células (Nath et al. 2013). Sabe-se também, que a alta expressão basal dessa proteína, como a demonstrada nesse estudo em MCF-7 comparadas a MDA-MB-231 (**Figura 19**), significa uma maior predisposição de resistência a multifármacos (Wishart et al. 1990). A alta meia concentração inibitória (IC50) também já foi relacionada a um maior índice de resistência (Wu et al. 2014). No presente estudo o IC50 de MRC calculado para 24 horas de tratamento foi 125 e 162 μ M para MDA-MB-231 e MCF-7, respectivamente. Já foi sugerido que o mecanismo de efluxo de NPs pode ser evitado mantendo uma alta concentração de nanopartículas no local do tratamento e com menor tempo de incubação (Panyam & Labhasetwar 2003). Esta relação faz sentido para as células MCF-7 cuja a redução de sensibilidade, de acúmulo e aumento de expressão de proteínas GPP acontecem a partir de 24 horas de exposição (**Figura 16-19**).

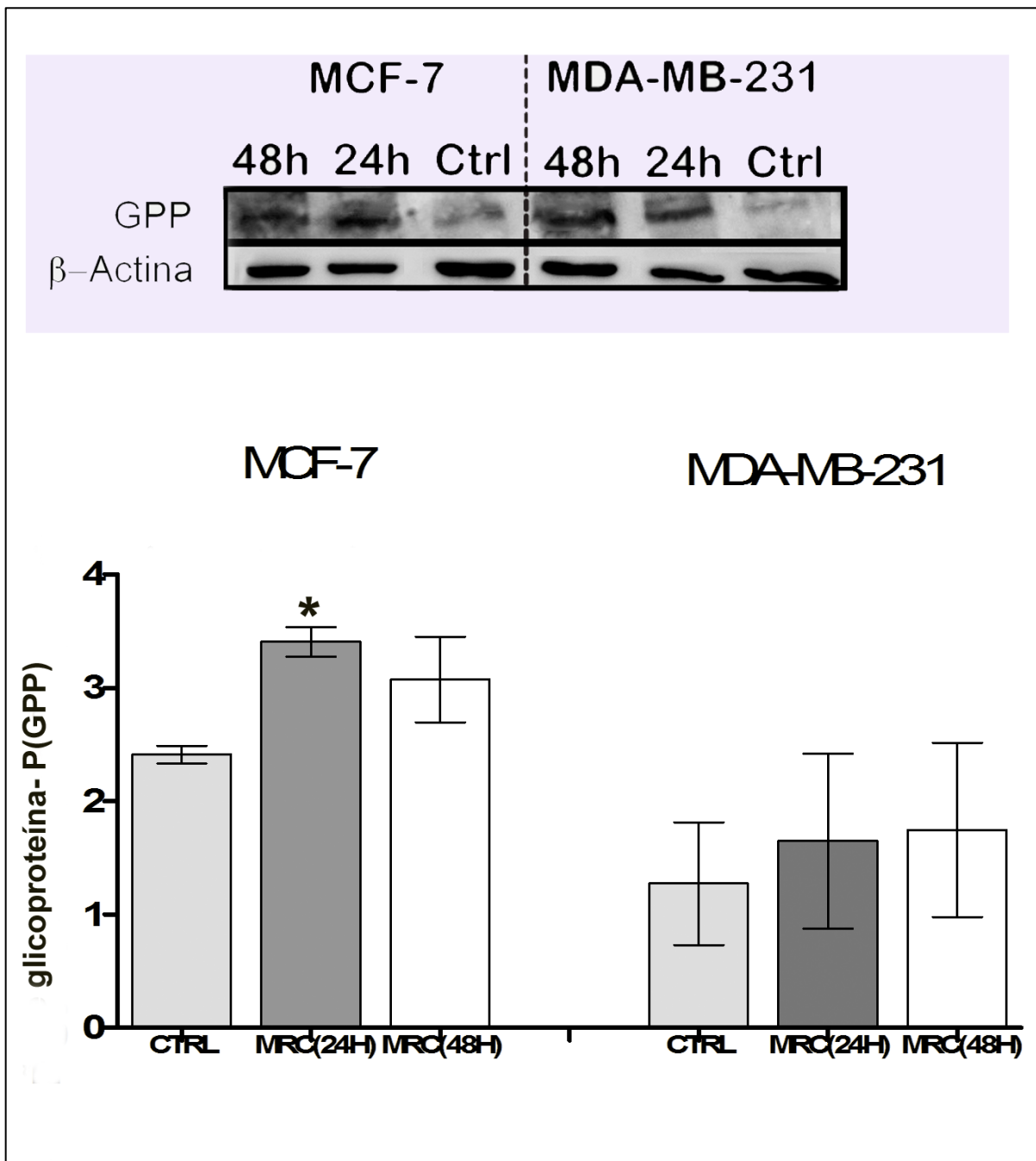


Figura 19. Produção de glicoproteína-P em células MCF-7 e MDA-MB-231. As bandas referentes aos grupos controle (sem tratamento) e tratadas com MRC (100 μ M, 24 e 48 horas) das células MCF-7 e MDA-MB-231 foram quantificadas e normalizadas em relação a expressão de beta actina. Os gráficos representam os resultados da quantificação da produção de GPP.

6.9 EFEITO DAS NANOPARTICULAS DE MRC NA REPLICAÇÃO DE DNA E CICLO CELULAR

O tratamento com NPs por 24h reduziu a síntese de DNA em células MDA-MB-231 e MCF-7. Após 24h, a partir do ponto 0h, houve um aumento da incorporação de timidina em células não tratadas enquanto em células que receberam tratamento (MRC), a detecção de BrdU foi reduzida (comparada com células controles não tratadas em 24 horas), especialmente em células MDA-MB-231 (**Figura 20**). Muitos compostos metálicos atuam no núcleo das células causando alterações que levam a inviabilidade celular (Zhang, 2003). A ação no núcleo por meio de inibição de enzimas essenciais para replicação celular ou por inibição de síntese de DNA do citrato de rádio livre, já foi demonstrada em estudos (Erck et al. 1974; Zyngier et al. 1989). Esta ação nuclear do RC parece manter-se após a associação com nanopartícula de maghemita (MRC) nas células tumorais. Um possível mecanismo de ação de MRC, já sugerido por Zyngier e colaboradores (1989) para o citrato de rádio é a atuação do fármaco na inibição de síntese de DNA. No entanto, uma vez que a síntese de DNA pode ser iniciada independentemente da mitose, por exemplo durante a duplicação de genes, reparação ou apoptose, o marcador BrdU é indicador apenas de síntese de DNA e não necessariamente de divisão celular (Kuan et al. 2004; Duque & Rakic 2011).

A **figura 21** mostra as alterações no ciclo celular induzidas por MRC. Em ambas linhagens, o tratamento induziu a um aumento da fase S refletindo uma

parada nesse ponto do ciclo e conseqüente redução da fase G2, principalmente em MDA-MB-231 (**Figura 21, abaixo**). A progressão do ciclo celular é regulada por múltiplos pontos de checagem em diferentes fases do ciclo celular; os 3 principais são G1/S, G2/M, e na transição metáfase/anáfase durante a mitose. A falha desses pontos de controle pode levar a um crescimento anormal ou apoptose. O ponto de verificação G1/S é o mais crítico para o controle da proliferação celular por meio de sinais intracelulares e extracelulares relacionados ao transporte e integração de moléculas no núcleo (Skotheim et al. 2008). Já foi estabelecida uma relação positiva entre a quantidade de células em fase S e apoptose (Zhu et al. 2014). Além disso, estudo anterior conduzido no nosso grupo já relatou que NPs MRC são capazes de induzir células MCF-7 à apoptose (Chaves et al. 2015). Conjuntamente, nossos dados sugerem que as NPs MRC se acumulam no núcleo das células tumorais inibindo a síntese de DNA, a proliferação celular e induzindo a morte celular.

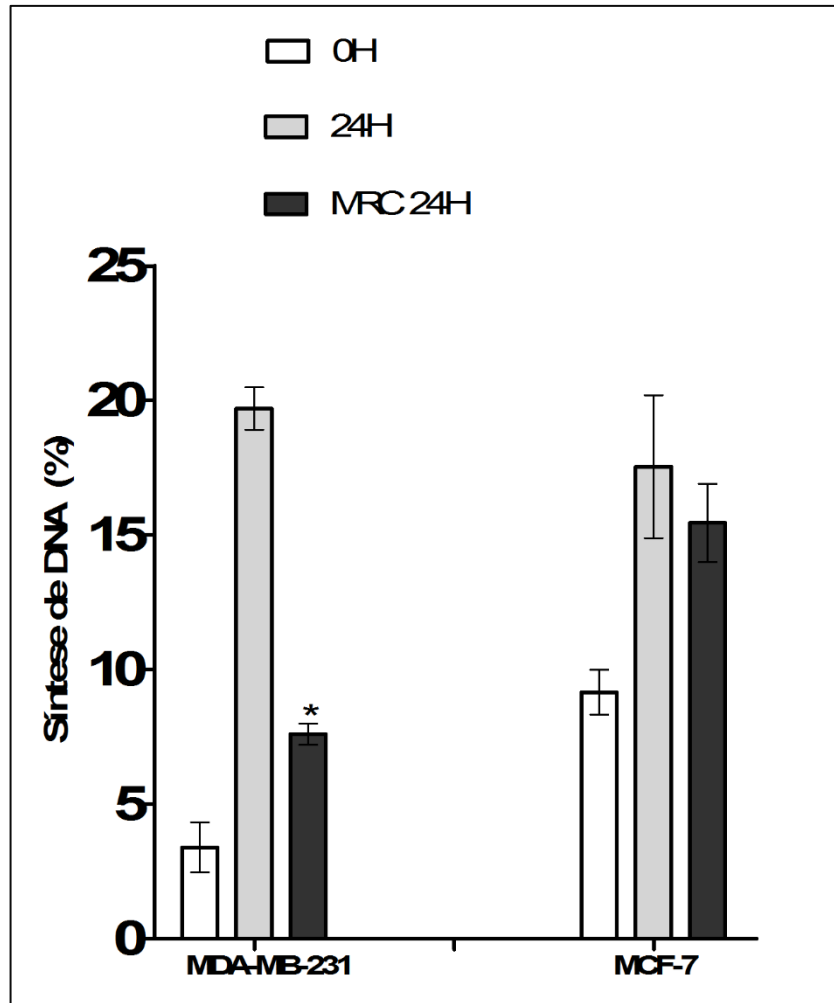


Figura 20. Efeito de NPs MRC na síntese de DNA de células MDA-MB-231 e MCF-7. (A) Análise de síntese de DNA em células tratadas com NPs (24h) comparadas com o controle não tratado (0h e 24h). (*) $p \leq 0,05$.

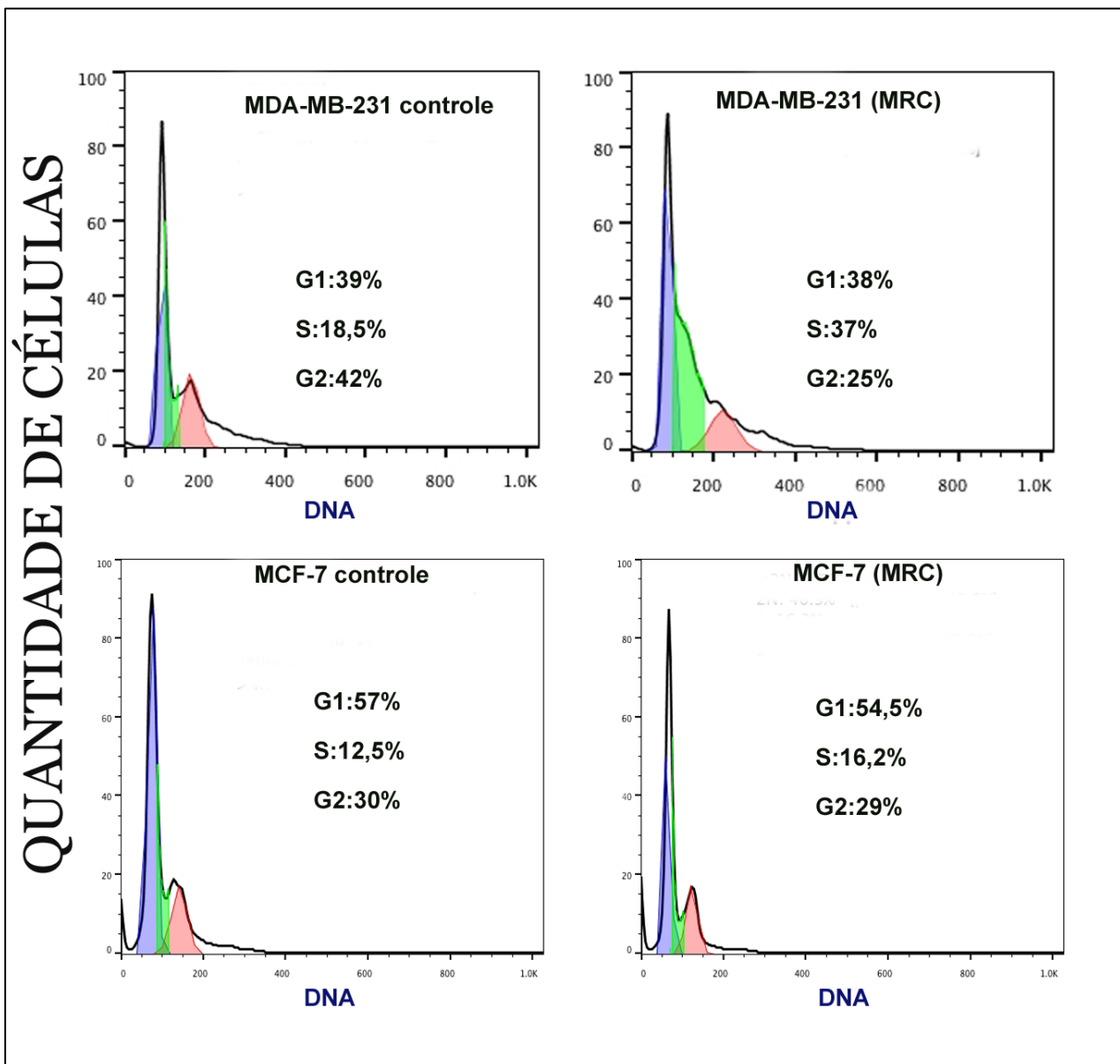


Figura 21. Análise do ciclo celular. G1, S e G2 em células tratadas com NPs (MRC 100 μ M, 24h) na coluna da direita comparadas com o controle não tratado na coluna da esquerda.

6.10 ENSAIO DE MIGRAÇÃO CELULAR

Uma importante característica de células metastáticas é a capacidade de migração. Essa propriedade permite a mobilidade das células para outros sítios. As células MDA-MB-231 tratadas com MRC tiveram sua capacidade de migração reduzida (**Figura 22**). Após tratamento com as NPs, o número de células que foram capazes de transpor o inserto que simula *in vitro* a matriz extracelular (média = 844 células) foi menor estatisticamente que o controle não tratado (média = 1500 células). Não só a citotoxicidade em células tumorais são alvos importantes para o desenvolvimento de fármacos antitumorais; visto que um dos grandes problemas no controle do câncer é a capacidade metastática das células, fármacos e nanocompostos que atuem neste processo também são necessários (Huo 2015). Apesar do mecanismo ainda não ser compreendido, a redução de migração de células MDA-MB-231 tratadas com complexos metálicos a base de rutênio já foi relatada (Cao et al. 2015). A redução *in vitro* da migração de células metastáticas de câncer de mama após o tratamento com as NPs (**Figura 22**), sugere uma ação importante de MRC no controle da metástase. No entanto, teste *in vivo* são necessários.

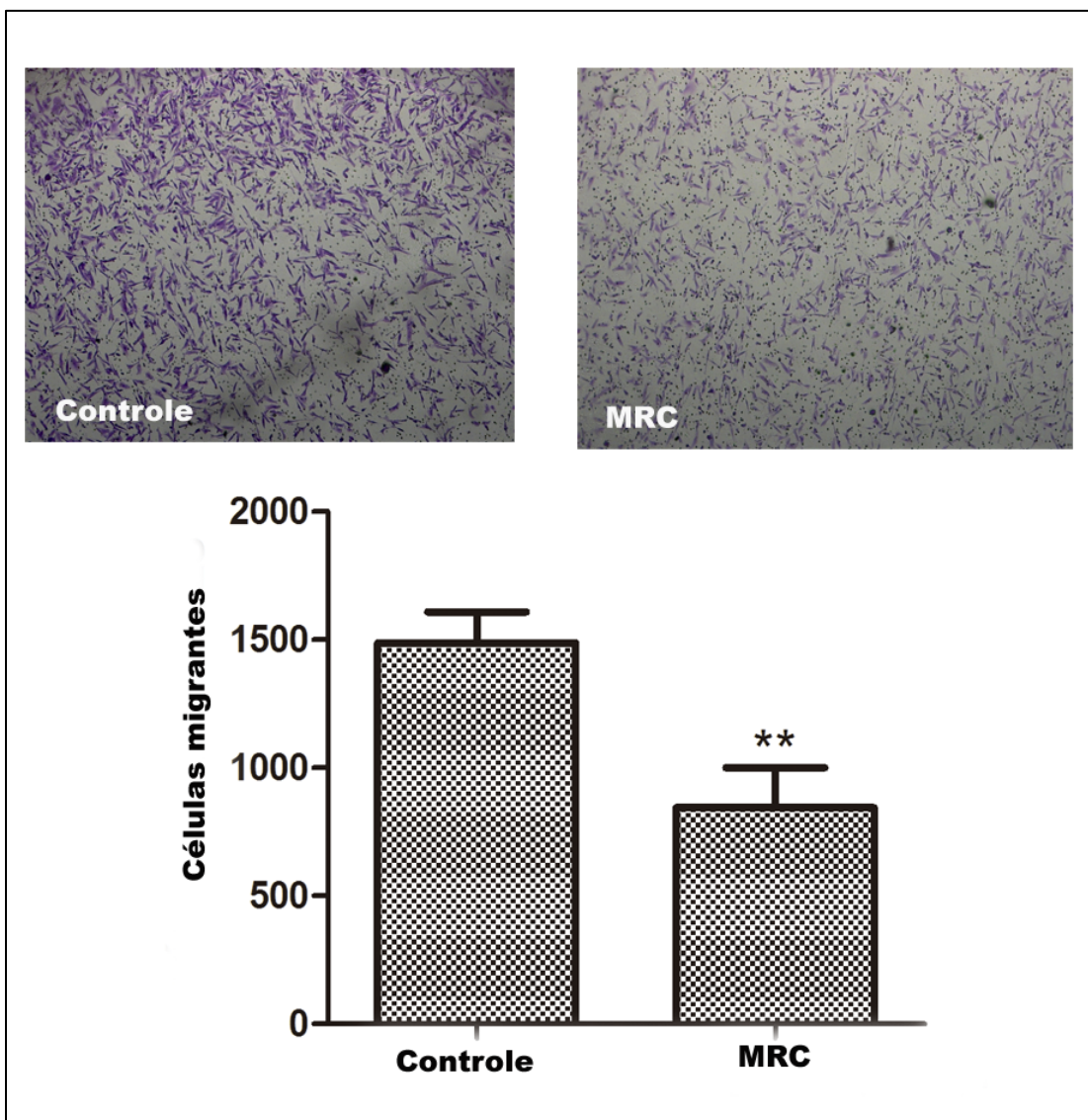


Figura 22. Análise da capacidade de migração celular de MDA-MB-231 após tratamento com NPs. Micrografias de células MDA-MB-231 migrantes tratadas com NPs (MRC) e controle sem tratamento. O gráfico representa a contagem das células (**) $p \leq 0,01$.

7. CONCLUSÕES

Até o presente momento, muitos estudos têm relacionado o tamanho, composição e carga diferentes das nanopartículas com o seu processo de captação e localização nas células. No entanto, apesar de alguns trabalhos mencionarem que o tipo de célula é um fator importante para avaliar este processo, poucos experimentos comparam a captação de uma mesma nanopartícula em diferentes linhagens celulares. Nossos resultados demonstraram que o tipo celular é um fator crítico na interação celular de nanopartículas. O tipo de célula pode definir a eficiência de captação, a localização intracelular e ação intracelular. Por conseguinte, para estudos *in vitro* de mecanismo citotóxico com nanopartículas, nós encorajamos a validação dos estudos com diferentes tipos celulares. Além disso, temos demonstrado a captação preferencial de aglomerados de MRC em células tumorais (MCF-7 e MDA-MB-231) que coincidem com a sua elevada expressão basal de clatrina que medeia a internalização dessas NPs (**Figura 23**). Concluimos também, que os meios de culturas alteram as características das nanopartículas, especialmente o diâmetro hidrodinâmico, mas as alterações foram uniformes entre os meios L15, DMEM e RPMI não influenciando nos diferentes padrões de captação de NPS MRC nas células utilizadas nesse estudo. As nanopartículas MRC alcançaram o núcleo apenas de células tumorais (MCF-7 e MDA-MB-231) sugerindo uma possível ação específica, modulada pelas características das nanopartículas e associadas características naturais das células e suportada pela baixa toxicidade dessas NPs em células não tumorais, HNTMC (**Figura 16**). Uma vez que a localização nuclear está associada a uma ação mais eficaz de fármacos

antitumorais, estes resultados mostram um grande potencial de MRC como um composto antitumoral. Em relação à atividade antitumoral, as MRC têm seu efeito citotóxico dependente da concentração e do tempo de exposição em células metastática MDA-MB-231 enquanto a exposição prolongada não foi efetiva em células MCF-7, podendo induzir inclusive, o efluxo de MRC nestas células. Conjuntamente, os dados sugerem que as NPs MRC atuam no núcleo, inibindo a síntese de DNA, a proliferação e induzindo a morte celular. Os efeitos foram verificados em ambas linhagens tumorais, mas as células MDA-MB-231 parecem ser mais responsivas aos efeitos das NPs. Além disso, as NPs podem também atuar na atividade metastáticas de células remanescentes reduzindo sua capacidade migratória. Nossos resultados sugerem que as nanopartículas de MRC são um nanomaterial promissor que podem fornecer uma rota conveniente para direcionamento e tratamento tumoral.

Internalização celular dependente de clatrina



- A: MDA-MB-231
- B: MCF-70
- C: HNTMC

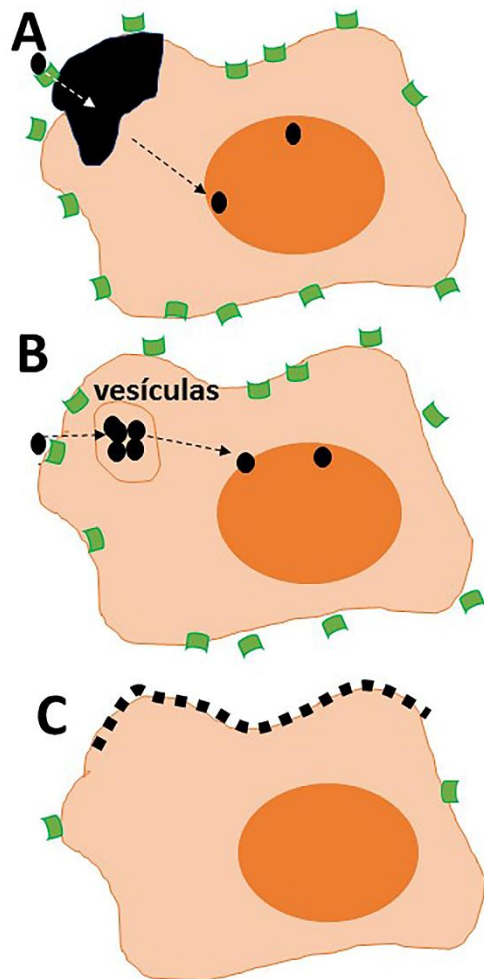


Figura 23. Esquema da internalização de nanopartículas MRC dependente de clatrina em células de câncer de mama MDA-MB-231 (A) e MCF-7 (B) e células não tumorais HNTMC (C). As células tumorais (A e B) produzem mais clatrina favorecendo a internalização de NPs MRC nessas células. Em células não tumorais HNTMC as NPs MRC acumulam-se preferencialmente na superfície da membrana (C). As NPs MRC alcançam o núcleo de células tumorais (A e B) mas não de das células não tumorais HNTMC.

8.1 PERSPECTIVAS

Tomado em conjunto os resultados apontam para estudos posteriores com MRC que avaliem a indução de autofagia *in vitro*, assim como testes de toxicidade, de biodistribuição e de controle de metástases *in vivo*, afim de uma melhor compreensão do efeito de MRC tumor-específico e de sua ação anti-metastática. A relação de expressão de clatrina como marcador tumoral também deve ser avaliada pois é de grande valia o estabelecimento de novos alvos terapêuticos de células de câncer.

9.1 REFERÊNCIAS

- Al-Bahlani, S., B. Al-Dhahli, et al. (2017). "Platinum-Based Drugs Differentially Affect the Ultrastructure of Breast Cancer Cell Types." *BioMed research international* 2017.
- Albanese, A., P. S. Tang, et al. (2012). "The effect of nanoparticle size, shape, and surface chemistry on biological systems." *Annual review of biomedical engineering* 14: 1-16.
- Alexis, F., J. W. Rhee, et al. (2008). *New frontiers in nanotechnology for cancer treatment. Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations*, Elsevier.
- Allen, L. H. and E. Matijević (1969). "Stability of colloidal silica: I. Effect of simple electrolytes." *Journal of colloid and interface science* 31(3): 287-296.
- Allen, T. M. & P. R. Cullis (2004). "Drug delivery systems: entering the mainstream." *Science* 303(5665): 1818-1822.
- Auffan, M., L. Decome, et al. (2006). "In vitro interactions between DMSA-coated maghemite nanoparticles and human fibroblasts: a physicochemical and cyto-genotoxic study." *Environmental science & technology* 40(14): 4367-4373.
- Azzawi, M., A. Seifalian, et al. (2016). *Nanotechnology for the diagnosis and treatment of diseases*, Future Medicine.
- Bana, E. and D. Bagrel (2011). *In Vitro Breast Cancer Models as Useful Tools in Therapeutics*, INTECH Open Access Publisher.
- Banks, W. A. (2016). "From blood-brain barrier to blood-brain interface: new opportunities for CNS drug delivery." *Nature Reviews Drug Discovery*.
- Benmerah, A. and C. Lamaze (2007). "Clathrin- Coated Pits: Vive La Différence?" *Traffic* 8(8): 970-982.
- Bear, J., E. Zysk, et al. (1986). *Precious Metals 1985: Proceedings of the Ninth International Precious Metals Conference*, Zysk, ED, Bonucci, J. A., Eds.
- Berry, D. A., K. A. Cronin, et al. (2005). "Effect of screening and adjuvant therapy on mortality from breast cancer." *New England Journal of Medicine* 353(17): 1784-1792.
- Berg, J. M., A. Romoser, et al. (2009). "The relationship between pH and zeta potential of ~ 30 nm metal oxide nanoparticle suspensions relevant to in vitro toxicological evaluations." *Nanotoxicology* 3(4): 276-283.
- Bijur, G. N. and R. S. Jope (2003). "Glycogen synthase kinase-3 β is highly activated in nuclei and mitochondria." *Neuroreport* 14(18): 2415-2419.

- Blechinger, J., A. T. Bauer, et al. (2013). "Uptake kinetics and nanotoxicity of silica nanoparticles are cell type dependent." *Small* 9(23): 3970-3980.
- Bosslet, K., R. Straub, et al. (1998). "Elucidation of the mechanism enabling tumor selective prodrug monotherapy." *Cancer research* 58(6): 1195-1201.
- Boven, E., W. J. F. van der Vijgh, et al. (1985). "Comparative activity and distribution studies of five platinum analogues in nude mice bearing human ovarian carcinoma xenografts." *Cancer research* 45(1): 86-90.
- Bretscher, M. S. (1984). "Endocytosis: relation to capping and cell locomotion." *Science* 224(4650): 681-686.
- Brunner, T.J., et al., *In vitro cytotoxicity of oxide nanoparticles: comparison to asbestos, silica, and the effect of particle solubility*. *Environmental science & technology*, 2006. 40(14): p. 4374-4381.
- Calero, M., L. Gutiérrez, et al. (2014). "Efficient and safe internalization of magnetic iron oxide nanoparticles: two fundamental requirements for biomedical applications." *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* 10(4): 733-743.
- Callaghan, R., F. Luk, et al. (2014). "Inhibition of the multidrug resistance P-glycoprotein: time for a change of strategy?" *Drug Metabolism and Disposition* 42(4): 623-631.
- Canton, I. and G. Battaglia (2012). "Endocytosis at the nanoscale." *Chemical Society Reviews* 41(7): 2718-2739.
- Carneiro, M. L. B., E. S. Nunes, et al. (2011). "Free Rhodium (II) citrate and rhodium (II) citrate magnetic carriers as potential strategies for breast cancer therapy." *Journal of nanobiotechnology* 9(1): 11.
- Carneiro, M. L. B., R. Peixoto, et al. (2013). "Antitumor effect and toxicity of free rhodium (II) citrate and rhodium (II) citrate-loaded maghemite nanoparticles in mice bearing breast cancer." *J Nanobiotechnol* 11(1): 4.
- Cartiera, M. S., K. M. Johnson, et al. (2009). "The uptake and intracellular fate of PLGA nanoparticles in epithelial cells." *Biomaterials* 30(14): 2790-2798.
- Cavalli, V., M. Corti, et al. (2001). "Endocytosis and signaling cascades: a close encounter." *FEBS letters* 498(2-3): 190-196.
- Cedervall, T., I. Lynch, et al. (2007). "Understanding the nanoparticle-protein corona using methods to quantify exchange rates and affinities of proteins for nanoparticles." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104(7): 2050-2055.
- Cai, Y., C. Cao, et al. (2015). "Enhanced magnetic resonance imaging and staining of cancer cells using ferrimagnetic H-ferritin nanoparticles with increasing core size." *International journal of nanomedicine* 10: 2619.

- Cao, W., W. Zheng, et al. (2015). "Ruthenium polypyridyl complex inhibits growth and metastasis of breast cancer cells by suppressing FAK signaling with enhancement of TRAIL-induced apoptosis." *Scientific reports* 5: srep09157.
- Chamritski, I. and G. Burns (2005). "Infrared-and Raman-active phonons of magnetite, maghemite, and hematite: a computer simulation and spectroscopic study." *The Journal of Physical Chemistry B* 109(11): 4965-4968.
- Chen, J., Z. Luo, et al. (2015). "Cellular localization of iron (II) polypyridyl complexes determines their anticancer action mechanisms." *Biomaterials* 71: 168-177.
- Chaves, N., C. Lopes, et al. (2015). "Rhodium Citrate Associated with Maghemite Nanoparticles Causes DNA Fragmentation Independently of Caspases 3 and Mediated by Reactive Oxygen Species." *J Nanomed Nanotechnol* 6(312): 2.
- Chithrani, B.D., A.A. Ghazani, and W.C (2006). Chan, Determining the size and shape dependence of gold nanoparticle uptake into mammalian cells. *Nano letters*, 6(4): p. 662-668.
- Chou, L. Y., K. Ming, et al. (2011). "Strategies for the intracellular delivery of nanoparticles." *Chemical Society Reviews* 40(1): 233-245.
- Clarke, M. & M. Stubbs (1996). "Interactions of metallopharmaceuticals with DNA." *Metal ions in biological systems* 32: 727.
- Collins, A.R., et al., High throughput toxicity screening and intracellular detection of nanomaterials. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*, 2016.
- Cook, D., D. Brown, et al. (2014). "Lessons learned from the fate of AstraZeneca's drug pipeline: a five-dimensional framework." *Nature Reviews Drug Discovery* 13(6): 419-431.
- Crow, P., B. Barrass, et al. (2005). "The use of Raman spectroscopy to differentiate between different prostatic adenocarcinoma cell lines." *British journal of cancer* 92(12): 2166-2170.
- CTSU, R. I. (2005). "Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials." *Lancet* 365: 1687-1717.
- Danhier, F., O. Feron, et al. (2010). "To exploit the tumor microenvironment: passive and active tumor targeting of nanocarriers for anti-cancer drug delivery." *Journal of Controlled Release* 148(2): 135-146.
- Daniel, A., A. Prakasarao, et al. (2014). "Raman mapping of oral tissues for cancer diagnosis." *Journal of Raman Spectroscopy* 45(7): 541-549.

- da Silva Nunes, E., M. L. B. Carneiro, et al. (2013). "Colloidal stability, surface characterisation and intracellular accumulation of Rhodium (II) citrate coated superparamagnetic iron oxide nanoparticles in breast tumour: a promising platform for cancer therapy." *Journal of nanoparticle research* 15(6): 1683.
- Das, M., C. Mohanty, et al. (2009). "Ligand-based targeted therapy for cancer tissue."
- De Jesus, M. B., A. Radaic, et al. (2014). "Inclusion of the helper lipid dioleoylphosphatidylethanolamine in solid lipid nanoparticles inhibits their transfection efficiency." *Journal of biomedical nanotechnology* 10(2): 355-365.
- Donepudi, M. S., K. Kondapalli, et al. (2014). "Breast cancer statistics and markers." *Journal of cancer research and therapeutics* 10(3): 506.
- Duncan, R. & R. Gaspar (2011). "Nanomedicine (s) under the microscope." *Molecular pharmaceuticals* 8(6): 2101-2141.
- Duque, A. and P. Rakic (2011). "Different effects of bromodeoxyuridine and [3H] thymidine incorporation into DNA on cell proliferation, position, and fate." *Journal of Neuroscience* 31(42): 15205-15217.
- Dürr, S., C. Janko, et al. (2013). "Magnetic nanoparticles for cancer therapy." *Nanotechnology Reviews* 2(4): 395-409.
- Eastman, A. (2017). "Improving anticancer drug development begins with cell culture: misinformation perpetrated by the misuse of cytotoxicity assays." *Oncotarget* 8(5): 8854.
- Elkin, S.R., et al., A systematic analysis reveals heterogeneous changes in the endocytic activities of cancer cells. *Cancer research*, 2015. 75(21): p. 4640-4650.
- Erck, A., L. Rainen, et al. (1974). Studies of rhodium (II) carboxylates as potential antitumor agents. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*. Society for Experimental Biology and Medicine (New York, NY).
- Estelrich, J., E. Escribano, et al. (2015). "Iron oxide nanoparticles for magnetically-guided and magnetically-responsive drug delivery." *International journal of molecular sciences* 16(4): 8070-8101.
- Fang, J., T. Sawa, et al. (2004). Factors and mechanism of "EPR" effect and the enhanced antitumor effects of macromolecular drugs including SMANCS. *Polymer Drugs in the Clinical Stage*, Springer: 29-49.
- Fröhlich, E. (2012). "The role of surface charge in cellular uptake and cytotoxicity of medical nanoparticles." *Int J Nanomedicine* 7(1): 5577-5591.
- Goldhirsch, A., W. Wood, et al. (2011). "Strategies for subtypes—dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011." *Annals of oncology* 22(8): 1736-1747.

- Guo, J. Y., X. Teng, et al. (2016). "Autophagy provides metabolic substrates to maintain energy charge and nucleotide pools in Ras-driven lung cancer cells." *Genes & development* 30(15): 1704-1717.
- Gratton, S.E., et al., The effect of particle design on cellular internalization pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2008. 105(33): p. 11613-11618.
- Han, M., Q. Lv, et al. (2012). "Overcoming drug resistance of MCF-7/ADR cells by altering intracellular distribution of doxorubicin via MVP knockdown with a novel siRNA polyamidoamine-hyaluronic acid complex." *Journal of Controlled Release* 163(2): 136-144.
- Hare, J. I., T. Lammers, et al. (2017). "Challenges and strategies in anti-cancer nanomedicine development: An industry perspective." *Advanced drug delivery reviews* 108: 25-38.
- Harmon, T. L., A. Harbuzariu, et al. (2015). Iron oxide nanoparticle-leptin receptor antagonist: A novel targeted adjuvant therapy for triple negative breast cancer, AACR.
- Hillaireau, H. and P. Couvreur (2009). "Nanocarriers' entry into the cell: relevance to drug delivery." *Cellular and Molecular Life Sciences* 66(17): 2873-2896.
- Huang, N., M. Short, et al. (2011). "Full range characterization of the Raman spectra of organs in a murine model." *Optics express* 19(23): 22892-22909.
- Howlader, N., A. Noone, et al. (2013). "SEER cancer statistics review, 1975–2010. 2013." Bethesda, MD: National Cancer Institute.
- Huefner, A., W.-L. Kuan, et al. (2015). "Characterization and visualization of vesicles in the endo-lysosomal pathway with surface-enhanced Raman spectroscopy and chemometrics." *Acs Nano* 10(1): 307-316.
- Hughes, R., J. Bear, et al. (1972). Synergistic effect of rhodium (II) acetate and anabinosylcytosine on L210. *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.*
- Huo, J. (2015). "Effects of chitosan nanoparticle-mediated BRAF siRNA interference on invasion and metastasis of gastric cancer cells." *Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology* (0): 1-4.
- Iv, M., N. Telischak, et al. (2015). "Clinical applications of iron oxide nanoparticles for magnetic resonance imaging of brain tumors." *Nanomedicine* 10(6): 993-1018.
- Jain, K. K. (2008). "Recent advances in nanooncology." *Technology in cancer research & treatment* 7(1): 1-13.
- Jiao, Y., L.-n. Niu, et al. (2017). "Quaternary ammonium-based biomedical materials: State-of-the-art, toxicological aspects and antimicrobial resistance." *Progress in Polymer Science*.
- Karakatsanis, A., P. Christiansen, et al. (2016). "43. Super paramagnetic iron oxide nanoparticles for sentinel node detection in patients

- with breast cancer: Experience from seven centres in Sweden and Denmark." *European Journal of Surgical Oncology* 42(9): S83.
- Keppler, B. K. (1993). *Metal complexes in cancer chemotherapy*, Wiley-VCH.
- Kettler, K., et al., Cellular uptake of nanoparticles as determined by particle properties, experimental conditions, and cell type. *Environmental toxicology and chemistry*, 2014. 33(3): p. 481-492.
- Kohler, N., et al., *Methotrexate-modified superparamagnetic nanoparticles and their intracellular uptake into human cancer cells*. *Langmuir*, 2005. 21(19): p. 8858-8864.
- Kossatz, S., J. Grandke, et al. (2015). "Efficient treatment of breast cancer xenografts with multifunctionalized iron oxide nanoparticles combining magnetic hyperthermia and anti-cancer drug delivery." *Breast Cancer Research* 17(1): 66.
- Kuan, C.-Y., A. J. Schloemer, et al. (2004). "Hypoxia-ischemia induces DNA synthesis without cell proliferation in dying neurons in adult rodent brain." *Journal of Neuroscience* 24(47): 10763-10772.
- Ledinský, M., P. Löper, et al. (2015). "Raman spectroscopy of organic-inorganic halide perovskites." *The journal of physical chemistry letters* 6(3): 401-406.
- Lesniak, A., F. Fenaroli, et al. (2012). "Effects of the presence or absence of a protein corona on silica nanoparticle uptake and impact on cells." *Acs Nano* 6(7): 5845-5857.
- Lesniak, A., A. Salvati, et al. (2013). "Nanoparticle adhesion to the cell membrane and its effect on nanoparticle uptake efficiency." *Journal of the American Chemical Society* 135(4): 1438-1444.
- Levy, J. M. M. and A. Thorburn (2011). "Targeting autophagy during cancer therapy to improve clinical outcomes." *Pharmacology & therapeutics* 131(1): 130-141.
- Lu, M., N. Majumdar, et al. (2012). "Notch1 affects ABCC1-mediated drug efflux and drug sensitivity in MCF7 breast cancer cells." *Cancer research* 72(8 Supplement): 772-772.
- Lucas, E. F., B. G. Soares, et al. (2001). *Caracterização de polímeros: determinação de peso molecular e análise térmica*, Editora E-papers.
- Lyng, F. M., E. Ó. Faoláin, et al. (2007). "Vibrational spectroscopy for cervical cancer pathology, from biochemical analysis to diagnostic tool." *Experimental and molecular pathology* 82(2): 121-129.
- Maeda, H., H. Nakamura, et al. (2013). "The EPR effect for macromolecular drug delivery to solid tumors: Improvement of tumor uptake, lowering of systemic toxicity, and distinct tumor imaging in vivo." *Advanced drug delivery reviews* 65(1): 71-79.
- Marsh, M. & A. Helenius (2006). "Virus entry: open sesame." *Cell* 124(4): 729-740.

- Mesu, J. G., T. Visser, et al. (2005). "Infrared and Raman spectroscopic study of pH-induced structural changes of L-histidine in aqueous environment." *Vibrational spectroscopy* 39(1): 114-125.
- Merrifield, C. J., D. Perrais, et al. (2005). "Coupling between clathrin-coated-pit invagination, cortactin recruitment, and membrane scission observed in live cells." *Cell* 121(4): 593-606.
- Moore, T.L., et al., Nanoparticle colloidal stability in cell culture media and impact on cellular interactions. *Chemical Society Reviews*, 2015. 44(17): p. 6287-6305.
- Movasaghi, Z., S. Rehman, et al. (2007). "Raman spectroscopy of biological tissues." *Applied Spectroscopy Reviews* 42(5): 493-541.
- Nath, S., K. Daneshvar, et al. (2013). "MUC1 induces drug resistance in pancreatic cancer cells via upregulation of multidrug resistance genes." *Oncogenesis* 2(6): e51.
- Nel, A. E., L. Mädler, et al. (2009). "Understanding biophysicochemical interactions at the nano-bio interface." *Nature materials* 8(7): 543-557.
- Panel, N. I. o. H. C. D. (2001). "National Institutes of Health Consensus Development Conference statement: adjuvant therapy for breast cancer, November 1-3, 2000." *Journal of the National Cancer Institute* 93(13): 979-989.
- Nottingham, I., C. Green, et al. (2004). "Discrimination between ricin and sulphur mustard toxicity in vitro using Raman spectroscopy." *Journal of the Royal Society Interface* 1(1): 79-90.
- Nottingham, I., S. Verrier, et al. (2003). "Spectroscopic study of human lung epithelial cells (A549) in culture: living cells versus dead cells." *Biopolymers* 72(4): 230-240
- Palade, G. (1953). Fine structure of blood capillaries. *Journal of Applied Physics*, amer inst physics circulation fulfillment div, 500 sunny-side blvd, woodbury, NY 11797-2999.
- Pankhurst, Q. A., J. Connolly, et al. (2003). "Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine." *Journal of physics D: Applied physics* 36(13): R167.
- Panyam, J. and V. Labhasetwar (2003). "Dynamics of endocytosis and exocytosis of poly (D, L-lactide-co-glycolide) nanoparticles in vascular smooth muscle cells." *Pharmaceutical research* 20(2): 212-220.
- Park, Y.-E., Y. K. Hayashi, et al. (2009). "Autophagic degradation of nuclear components in mammalian cells." *Autophagy* 5(6): 795-804.
- Patel, L.N., J.L. Zaro, and W.-C. Shen, Cell penetrating peptides: intracellular pathways and pharmaceutical perspectives. *Pharmaceutical research*, 2007. 24(11): p. 1977-1992.
- Paulo, C. S., R. P. das Neves, et al. (2011). "Nanoparticles for intracellular targeted drug delivery." *Nanotechnology* 22(49): 494002.

- Pelkmans, L. & M. Zerial (2005). "Kinase-regulated quantal assemblies and kiss-and-run recycling of caveolae." *Nature* 436(7047): 128-133.
- Persidis, A. (1999). "Cancer multidrug resistance." *Nature Biotechnology* 17(1): 94-95.
- Quinto, C. A., P. Mohindra, et al. (2015). "Multifunctional superparamagnetic iron oxide nanoparticles for combined chemotherapy and hyperthermia cancer treatment." *Nanoscale* 7(29): 12728-12736.
- Rafique, S., M. Idrees, et al. (2010) "Transition metal complexes as potential therapeutic agents." *Biotech. Mol. Biol. Rev* 5, 38-45.
- Rejman, J., et al. (2004). Size-dependent internalization of particles via the pathways of clathrin-and caveolae-mediated endocytosis. *Biochemical Journal*. 377(1): p. 159-169
- Ries, F. & J. Klastersky (1986). "Nephrotoxicity induced by cancer chemotherapy with special emphasis on cisplatin toxicity." *Am J Kidney Dis* 8(5): 368-379.
- Rosenberg, B. & L. Vancamp (1969). "Platinum compounds: a new class of potent antitumour agents." *Nature* 222: 385-386.
- Roth, T. F. and K. R. Porter (1964). "Yolk protein uptake in the oocyte of the mosquito *Aedes aegypti*. L." *The Journal of cell biology* 20(2): 313-332.
- Saie, A. A., M. Ray, et al. (2015). *Engineering the Nanoparticle-Protein Interface for Cancer Therapeutics. Nanotechnology-Based Precision Tools for the Detection and Treatment of Cancer*, Springer: 245-273.
- Schmid, D., C. Ricci, et al. (2015). "Adiposity and risk of thyroid cancer: a systematic review and meta- analysis." *Obesity Reviews* 16(12): 1042-1054.
- Schroeder, A., D. A. Heller, et al. (2012). "Treating metastatic cancer with nanotechnology." *Nature Reviews Cancer* 12(1): 39-50.
- Siegel, R. L., K. D. Miller, et al. (2016). "Cancer statistics, 2016." *CA: a cancer journal for clinicians* 66(1): 7-30.
- Sinisterra, R. D., V. P. Shastri, et al. (1999). "Encapsulation and release of rhodium (II) citrate and its association complex with hydroxypropyl- β - cyclodextrin from biodegradable polymer microspheres." *Journal of pharmaceutical sciences* 88(5): 574-576.
- Skotheim, J. M., S. Di Talia, et al. (2008). "Positive feedback of G1 cyclins ensures coherent cell cycle entry." *Nature* 454(7202): 291.
- Sledge, G. and K. Miller (2003). "Exploiting the hallmarks of cancer: the future conquest of breast cancer." *European Journal of Cancer* 39(12): 1668-1675.

- Smeltzer, S. C., B. G. Bare, et al. (2002). "Histórico e tratamento de pacientes com diabetes mellitus." Brunner LS, organizador. Brunner/Suddarth: tratado de enfermagem médico cirúrgica. 9ª Ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan: 933-983.
- Smith, C. J., N. Grigorieff, et al. (1998). "Clathrin coats at 21 Å resolution: a cellular assembly designed to recycle multiple membrane receptors." *The EMBO journal* 17(17): 4943-4953.
- Stimpson, H. E., C. P. Toret, et al. (2009). "Early-arriving Syp1p and Ede1p function in endocytic site placement and formation in budding yeast." *Molecular biology of the cell* 20(22): 4640-4651.
- Stewart, S. and P. Fredericks (1999). "Surface-enhanced Raman spectroscopy of amino acids adsorbed on an electrochemically prepared silver surface." *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 55(7): 1641-1660.
- Suen, W.L.L. and Y. Chau, Size- dependent internalisation of folate- decorated nanoparticles via the pathways of clathrin and caveolae-mediated endocytosis in ARPE- 19 cells. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 2014. 66(4): p. 564-573.
- Torre, L. A., F. Bray, et al. (2015). "Global cancer statistics, 2012." *CA: a cancer journal for clinicians* 65(2): 87-108.
- Traub, L. M. (2009). "Tickets to ride: selecting cargo for clathrin-regulated internalization." *Nature reviews Molecular cell biology* 10(9): 583-596.
- Trédan, O., C. M. Galmarini, et al. (2007). "Drug resistance and the solid tumor microenvironment." *Journal of the National Cancer Institute* 99(19): 1441-1454. Zhang, L. (2003).
- Tsou, S.-H., T.-M. Chen, et al. (2015). "A critical dose of doxorubicin is required to alter the gene expression profiles in MCF-7 cells acquiring multidrug resistance." *PloS one* 10(1): e0116747.
- van Vlerken, L., D. Shenoy, et al. (2006). Modulation of intracellular ceramide using polymeric nanoparticles to overcome multidrug resistance in tumor cells. Annual Meeting-Society For Biomaterials In Conjunction With The International Biomaterials Symposium.
- Verma, A. and F. Stellacci (2010). "Effect of surface properties on nanoparticle–cell interactions." *Small* 6(1): 12-21.
- Xie, Y., Y. Jiang, et al. (2005). "Detection of amino acid and peptide phosphate protonation using Raman spectroscopy." *Analytical biochemistry* 343(2): 223-230.
- Xu, Z. P., Q. H. Zeng, et al. (2006). "Inorganic nanoparticles as carriers for efficient cellular delivery." *Chemical Engineering Science* 61(3): 1027-1040.

- Zha, L., J. Hu, et al. (2002). "The effect of electrolyte on the colloidal properties of poly (N-isopropylacrylamide-co-dimethylaminoethylmethacrylate) microgel latexes." *Colloid and Polymer Science* 280(12): 1116-1121.
- Zhang, C. X. and S. J. Lippard (2003). "New metal complexes as potential therapeutics." *Current opinion in chemical biology* 7(4): 481-489.
- Zhang, Y., et al., Influence of silica particle internalization on adhesion and migration of human dermal fibroblasts. *Biomaterials*, 2010. 31(32): p. 8465-8474.
- Zhang, Y., M. Yang, et al. (2008). "Zeta potential: a surface electrical characteristic to probe the interaction of nanoparticles with normal and cancer human breast epithelial cells." *Biomedical microdevices* 10(2): 321-328.
- Zhang, S., H. Gao, et al. (2015). "Physical Principles of Nanoparticle Cellular Endocytosis." *Acs Nano* 9(9): 8655-8671.
- Zyngier, S., E. Kimura, et al. (1989). "Antitumor effects of Rhodium (II) citrate in mice bearing Ehrlich tumors." *Braz. J. Med. Biol. Res* 22(3): 397-401.
- WHO (2007). *Cancer control: knowledge into action: WHO guide for effective programmes: early detection.*
- Wicki, A., D. Witzigmann, et al. (2015). "Nanomedicine in cancer therapy: challenges, opportunities, and clinical applications." *Journal of Controlled Release* 200: 138-157.
- Win, K. Y. & S.-S. Feng (2005). "Effects of particle size and surface coating on cellular uptake of polymeric nanoparticles for oral delivery of anticancer drugs." *Biomaterials* 26(15): 2713-2722
- Wishart, G., J. Plumb, et al. (1990). "P-glycoprotein expression in primary breast cancer detected by immunocytochemistry with two monoclonal antibodies." *British journal of cancer* 62(5): 758.
- Wyroba, E., S. Suski, et al. (2015). "Biomedical and agricultural applications of energy dispersive X-ray spectroscopy in electron microscopy." *Cellular and Molecular Biology Letters* 20(3): 488-509.
- Wu, Q., Z. Yang, et al. (2014). "Multi-drug resistance in cancer chemotherapeutics: mechanisms and lab approaches." *Cancer letters* 347(2): 159-166.
- Yang, F., C. Jin, et al. (2011). "Magnetic functionalised carbon nanotubes as drug vehicles for cancer lymph node metastasis treatment." *European journal of cancer* 47(12): 1873-1882.
- Yang, L., H. Kuang, et al. (2015). "Size dependent biodistribution and toxicokinetics of iron oxide magnetic nanoparticles in mice." *Nanoscale* 7(2): 625-636.

10. ANEXOS

10.1 ARTIGO CIENTÍFICO PUBLICADO

Exploring cellular uptake of iron oxide nanoparticles associated with rhodium citrate in breast cancer cells

Exploring cellular uptake of iron oxide nanoparticles associated with rhodium citrate in breast cancer cells

This article was published in the following Dove Press journal:
International Journal of Nanomedicine
2 August 2017
[Number of times this article has been viewed](#)

Natalia L Chaves¹
Irina Estrela-Lopis²
Julia Böttner²
Cláudio AP Lopes¹
Bruna C Guido¹
Aparecido R de Sousa³
Sônia N Bão¹

¹Institute of Biological Sciences, Department of Cell Biology, University of Brasília (UnB), Brasília, Brazil; ²Institute of Biophysics and Medical Physics, University of Leipzig, Leipzig, Germany; ³Institute of Chemistry, Federal University of Goiás, Goiânia, Brazil

Abstract: Nanocarriers have the potential to improve the therapeutic index of currently available drugs by improving their efficacy and achieving therapeutic steady-state levels over an extended period. The association of maghemite–rhodium citrate (MRC) nanoparticles (NPs) has the potential to increase specificity of the cytotoxic action. However, the interaction of these NPs with cells, their uptake mechanism, and subcellular localization need to be elucidated. This work evaluates the uptake mechanism of MRC NPs in metastatic and nonmetastatic breast cancer-cell models, comparing them to a nontumor cell line. MRC NPs uptake in breast cancer cells was more effective than in normal cells, with regard to both the amount of internalized material and the achievement of more strategic intracellular distribution. Moreover, this process occurred through a clathrin-dependent endocytosis pathway with different basal expression levels of this protein in the cell lines tested.

Keywords: maghemite, nanomaterials, cells uptake, endocytosis

Introduction

Over the years, the nanotechnology field has emerged as a promising approach for the development of novel diagnostic and therapeutic applications.¹ The scale of the nanomaterials allows better access to biological sites.^{2–4} Among other applications, cancer-cell targeting would benefit greatly from highly specific and localized drug delivery.^{5–7}

Iron oxide nanoparticles (NPs) hold great promise as diagnostic and therapeutic agents in oncology. Their intrinsic physical properties are particularly interesting for simultaneous drug delivery, molecular imaging, and such applications as localized hyperthermia.^{8,9} These technical features provide special perspectives to breast cancer treatment and diagnosis, especially because of the high incidence, drug resistance, and recurrence risk related to this disease.^{10–12}

Current studies with maghemite (an iron oxide compound) NPs have demonstrated *in vitro*- and *in vivo*-specific cytotoxic action for target cells, indicating these NPs are a promising option for drug delivery.^{13–15} Maghemite–rhodium citrate (MRC) NPs have been recently tested, and showed colloidal stability and antitumor activity in breast cancer cells.^{16–18} However, MRC interaction with cells, their uptake mechanism, and subcellular localization are not understood.

Despite remarkable advances in nanoscience, relatively little is known about the intracellular destination and mechanism of action of NPs. This research field is particularly important in developing effective and safe delivery systems based on nanocomposites. NPs induce a large variety of intracellular responses, depending on

Correspondence: Sônia N Bão
Department of Cell Biology, Institute of Biological Sciences, University of Brasília (UnB), Campus Universitário Darcy Ribeiro, Brasília 70910-900, Brazil
Tel +55 61 3107 3122
Email snbao@unb.br

submit your manuscript | www.dovepress.com

Dovepress    

<http://dx.doi.org/10.2147/IJN.S141582>

International Journal of Nanomedicine 2017:12 5511–5523

5511



© 2017 Chaves et al. This work is published and licensed by Dove Medical Press Limited. The full terms of this license are available at <http://www.dovepress.com/terms.php> and incorporate the Creative Commons Attribution – Non Commercial (unported, v2.0) License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/2.0/>). By accessing the work you hereby accept the Terms. Non-commercial uses of the work are permitted without any further permission from Dove Medical Press Limited, provided the work is properly attributed. For permission for commercial use of this work, please see paragraphs 4.2 and 5 of our Terms (<http://www.dovepress.com/terms.php>).

their physicochemical properties, intracellular concentration, duration of contact time, subcellular distribution, and interactions with biological molecules.^{19,20}

Cellular uptake of NPs includes endocytic pathways, such as pinocytosis, clathrin or caveolin involvement, and clathrin/caveolin-independent internalization.²¹ Each of these processes involves distinctive mechanisms and molecules. Different endocytic routes may be correlated with cell-uptake velocity and cytotoxicity in cells.²² The physicochemical properties and surface reactivity of NPs are essential in determining the endocytosis pathway. In addition, cell types and their differentiation states may also determine the choice of route. The size and shape of the particles are important parameters with regard to the space available in these endocytic compartments.^{19,23,24}

In the present study, the uptake and distribution of the most stable NPs composition based on maghemite were analyzed *in vitro* in different cell lines. Moreover, we evaluate the mechanism of endocytosis and discuss the uptake efficiency of MRC NPs in different cell lines: human breast cancer cell lines (MCF7 and MDA-MB231) and human non-tumor mesenchymal cells (HNTMCs). We focused mainly on NPs interactions with different cells. We concluded that MRC NPs uptake in breast cancer cells is more effective than in normal cells with regard to both the amount of internalized nanomaterial and the achievement of more strategic intracellular distribution. Overall, our study demonstrates that cellular response after exposure to MRC NPs varies among cell lines and that different basal expression levels of clathrin in cells can define the biological pathway of MRC NPs and their uptake efficacy. This phenomenon can be potentially exploited for nanotherapeutic delivery.

Materials and methods

Reagents and equipment

Magnetic fluids used were synthesized by the coprecipitation method of Fe²⁺ and Fe³⁺ ions in alkaline medium and subsequently oxidized by bubbling oxygen. The functionalized fluids of MRC NPs and citrate-loaded maghemite (MC) NPs were obtained by adsorption experiments. MRC with 59.6 μM of $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ and 2.85 μM of RC, MC with 64.7 μM of $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ and 2.55 μM of RC and 2.513 mM Rh₂(H₂Cit)₄ were synthesized at the Institute of Chemistry of Federal University of Goiás (Goiânia, Brazil). For cell-culture maintenance, we used DMEM, RPMI, FBS, and 0.25% trypsin-EDTA (all from Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) and Leibovitz L15 (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA).

The antibodies used in this study were monoclonal anti- β -actin produced in mice, monoclonal anticlathrin

heavy chain produced in mice, polyclonal anti-caveolin 1 produced in rabbits (Sigma-Aldrich), and IgG HRP-conjugated antimouse and antirabbit (Sigma-Aldrich). The reagents used throughout the work were: MTT, BoDipy FL C-lactosylceramide (*N*-[4,4-difluoro-5,7-dimethyl-4-bora-3a,4a-diaza-*s*-indacene-3-pentanoyl]), sphingosyl 1- β -D-lactoside and transferrin from human serum, fluorescein conjugate (Thermo Fisher Scientific), methyl- β -cyclodextrin (M β CD; Sigma-Aldrich), Pitstop 2 (Abcam, Cambridge, UK), and bicinchoninic acid (Thermo Fisher Scientific). For Western blot analyses, we used a protease inhibitor (Hoffman-La Roche, Basel, Switzerland). The development was made with Amersham ECL prime Western blotting detection reagent, and image acquisition and analyses were performed with an Image Quant LAS 4000 (GE Healthcare, Little Chalfont, UK).

Ultrastructural analyses were performed with transmission electron microscopy (TEM, JEM-1011; JEOL, Tokyo, Japan) operating at 100 kV and field-emission scanning electron microscopy (SEM, JSM-7000F; JEOL). Absorbance reading was performed using SpectraMax M5 equipment, and data were analyzed by SoftMax Pro 5.2, both from Molecular Devices (Sunnyvale, CA, USA). Flow cytometry was performed with a FACSCalibur (BD Biosciences, San Jose, CA, USA), and data analysis was performed with FlowJo 5.2.7 (Tree Star, Ashland, OR, USA). Raman analyses were carried out by confocal Raman microspectroscopy (CRM, Alpha300R⁺; WITec, Ulm, Germany). Statistical analyses and graphs were performed using GraphPad Prism 5 software.

Cell culture

The human breast cancer cell lines MCF7 and MDA-MB231 were obtained from the American Type Culture Collection and cultured in DMEM and Leibovitz L15 medium without CO₂, containing 1% (v/v) penicillin-streptomycin and 10% (v/v) heat-inactivated FBS, respectively. FBS and penicillin-streptomycin were obtained from GIBCO – Life Technologies, Carlsbad, CA, USA. Primary cultures of HNTMCs from dental pulp were obtained from health volunteers, who provided informed consent, and with approval from the human ethics committee of the University of Brasilia (104934/2008). HNTMCs were cultured with DMEM and supplemented with 10% (v/v) heat-inactivated fetal bovine serum and 1% (v/v) penicillin-streptomycin.

NPs characterization

Diameter distribution and surface charge of the NPs were analyzed by a Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments,

Malvern, UK) using a technology called dynamic light scattering, which enables estimation of average particle diameter and distribution. Assays were performed at 25°C. Magnetic fluids were characterized by their loading and hydrodynamic diameter in water and diluted with culture medium (DMEM, 10% FBS). Readings were taken immediately after dilutions and after 12 hours of incubation.

Transmission electron microscopy

For ultrastructural analysis of MRC NPs uptake, 8×10⁵ MCF7 and MDA-MB231 cells were plated in six-well plates, and after adhesion, cells were exposed to NPs (200 μM) for 6 hours. Cells were then washed with PBS and fixed with Karnovsky's fixative (2% glutaraldehyde, 2% paraformaldehyde, 3% sucrose, 0.005 M calcium chloride in sodium cacodylate buffer 0.1 M) overnight at 4°C. Subsequently, cells were washed with 0.1 M sodium cacodylate buffer (pH 7.2) and postfixed for 30 minutes with 1% osmium tetroxide and 0.8% potassium ferricyanide in sodium cacodylate buffer and 5 mM CaCl₂. Cells were then washed twice with water and then contrasted with 0.5% uranyl acetate at 4°C. Samples were then dehydrated in increasing gradients of acetone (30%–100%) for 10 minutes each and embedded in Spurr's resin. Ultrathin sections were obtained with ultramicrotomy (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) and analyzed with TEM and SEM.

Raman microspectroscopy

NPs distribution in MDA-MB231 and MCF7 cells was analyzed using CRM. A continuous laser beam was focused into a 300 nm-size spot on a single cell with CRM (Alpha300R⁺) equipped with a piezoelectric scanner (P-500; Physik Instrumente, Karlsruhe, Germany). The 532 nm laser excitation was used in combination with a water-immersion objective (63×/NA1.0; Carl Zeiss Meditec AG, Jena, Germany). Spectra were acquired using a charge-coupled device cooled to -61°C (PI-Max; Princeton Instruments, Trenton, NJ, USA) behind grating (600 g·mm⁻¹) spectrography (Acton; Princeton Instruments) with a spectral resolution of 4 cm⁻¹. The cell surface was scanned with steps of 0.2 μm and integrated over a time of about 0.1–0.3 seconds at 36 mW laser power to produce high-quality cell mapping. Cells were plated on glass-bottom dishes (WillCo Wells, Amsterdam, the Netherlands) for Raman analysis and incubated with the MRC (100 μM) NPs for 24 hours. Afterward, the cells were washed with PBS several times, fixed with 3.7% formaldehyde in PBS for 30 minutes, and washed again. Cell spectra (at least five cells per sample) were obtained and analyzed.

Quantification of cellular uptake

Cells in the growth medium containing 100 μM MRC were fixed in Karnovsky's fixative, postfixed in 1% osmium tetroxide for 1.5 hours, dehydrated, and embedded in resin as previously described. The samples were then cut into slices of 0.3–0.6 μm thickness from resin-embedded cells. Elemental analysis by energy-dispersive spectroscopy was then performed under high vacuum using SEM operating at 15–20 kV. The sections were imaged with secondary electrons for subsequent demarcation of cells, followed by induction, collection, and analysis of X-ray spectra from the selected areas. Assessment of intracellular iron was carried out with strictly the same acquisition settings for all samples. Moreover, micrographs acquired by TEM were used to quantify the mean of intracellular NPs with the software Image-Pro Plus (Media Cybernetics, Rockville, MD, USA).

Endocytosis study

The clathrin and caveolin inhibitors – Pitstop 2 (20 μM) and MβCD (20 μM) – were administered in MDA-MB231 cell culture for 30 minutes. As a positive control for endocytosis, we used ferritin associated with Alexa 488 (clathrin-dependent endocytosis) and lactosylceramide conjugated to BoDipy (caveolin-dependent endocytic pathway). Quantification of cells containing NPs, control or treated with endocytic pathway inhibitors, was performed by flow cytometry. For Western blot, MDA-MB231, MCF7, and HNTMCs (10⁶) were grown in flasks. Fresh medium with 100 μM MRC was added to the flasks, which were incubated for 6 hours at 37°C. Cells were rinsed three times in ice-cold PBS, and protein extraction was performed with lysis buffer (50 mM Tris, pH 7.4; 150 mM NaCl; 5 mM EDTA and 1% Triton X-100 and protease-inhibitor cocktail). Lysates were centrifuged (10 minutes, 4°C). Protein concentrations were determined by bicinchoninic acid assay. Total lysates (20 μg) were separated by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide-gel electrophoresis in a 4%–12% gradient and transferred to a nitrocellulose membrane. Membranes were blocked with 5% nonfat dry milk in Tris-buffered saline–Tween 0.1%, followed by incubation with primary (1:1,000 anti-caveolin 1, 2 μL/mL anticlathrin and 1:5,000 anti-β-actin) and secondary (goat antimouse and goat antirabbit HRP 1:5,000) antibodies. Development was performed with the ECL chemiluminescence kit. The experiment was repeated three times.

Statistical analysis

All graph values are plotted as means ± SE. One-way analysis of variance was used to perform statistical pairwise

comparisons among cell types. We assigned statistical significance for all tests at $P < 0.05$.

Results

NPs characterization

MRC solution diluted in H₂O had a mean hydrodynamic diameter of 119.5 nm, with a polydispersity index (PDI) of 0.17 and ζ -potential of -35 mV, and similar values were maintained after subsequent measurements at different intervals. This nanocomposite diluted in culture medium showed a mean hydrodynamic diameter of 161 nm (PDI 0.17) and 165 nm (PDI 0.17) and ζ -potential of -12.9 mV and -10.6 mV at 0 and 12 hours, respectively. The MC NPs in water kept a mean hydrodynamic diameter of 97 nm (PDI 0.2) and a mean surface charge of -44.7 mV. In culture medium, the mean hydrodynamic diameter of these NPs was 411 nm, with ζ -potential of -12 mV and PDI of 0.37 (0 hours) and 309 nm and -12 mV and PDI of 0.28 (12 hours). MRC NPs showed stability in both water and culture medium. However, MC NPs were not stable in physiological fluids, such as culture-medium conditions. Both NPs formulations had surface-charge and hydrodynamic-diameter alterations (Table 1). These changes were progressive with incubation time.

NPs localization by transmission electron microscopy

After 6 hours of exposure, HNTMC images showed some MRC NPs inside the cytoplasm (Figure 1A and D) and a substantial amount of these elements surrounding the cell-membrane surface (Figure 1D). Images of MCF7 and MDA-MB231 cells revealed MRC NPs often present within cytoplasm. It was possible to identify vesicles containing NPs derived from uptake through the cellular membrane, especially in MCF7 cells (Figure 1B and E). In MDA-MB231 cells, MRC NPs occurred in high concentrations, forming large NPs clusters (Figure 1C, E, and F). It was possible to visualize NPs within nuclei in MCF7 and MDA-MB231

cells. However, the presence of NPs in HNMTMC nuclei was not identified (Figure 1A, D, and G). Cytotoxicity hallmarks were observed in MCF7 and MDA-MB231 cells, such as karyorrhexis (Figure 1H and I) and vacuoles (Figure 1H [arrowhead]). It is known that the occurrence of different sized NPs clusters among cell lines can happen during NPs dilution in culture medium, since the components and pH of culture media can alter their colloidal behavior and stability, favoring aggregation.^{25,26} MRC NPs were analyzed regarding hydrodynamic-diameter alterations after incubation with the three different culture media (L15, RPMI, and DMEM) used in this study, under the same conditions as in MRC treatment of the cells. The results excluded the influence of culture-medium type on the formation of bigger aggregates in MDA-MB231 cells and different uptake patterns observed in the three cell types studied (Figure S1).

NPs translocation in MCF7 and MDA-MB231 cells by confocal Raman microspectroscopy

Uptake and translocation patterns of MRC NPs at the single-cell level were studied in MCF7 and MDA-MB231 cell lines by means of label-free CRM. Raman spectra of MRC NPs dispersed in water and dried on quartz glass exhibited peaks that were characteristic of maghemite (γ -Fe₂O₃) and hematite (α -Fe₂O₃) crystal structures (Figure 2). The presence of two crystal phases can be explained by a laser-induced thermal effect that leads to phase transition from γ - to α -phase.²⁷ The maghemite peaks at 360–370 and 490 cm⁻¹ were able to be assigned to T_{1g} and E_g modes of vibration. In hematite nanostructures of MRC NPs, the peaks at 210, 280, 488, and 600 cm⁻¹ were able to be attributed to A_{1g}, E_g, A_{1g}, and E_g modes, respectively.²⁸ The two main peaks at 210 and 280 cm⁻¹ were used as fingerprint peaks for the identification of the NPs in a biological environment. Figure 2 shows the basic spectra of different cell components of control MDA-MB231 cells, together with their barcodes. The spectra were generated calculating the average of all spectra in regions of interest (eg, lipid droplets [LDs]) and then demixed using the Demix algorithm. Cluster analysis was also used to receive the basic spectra.

The nuclear region of cells was identified by Raman peaks at 788, 1,097, and 1,340 cm⁻¹. The peak at 788 cm⁻¹ was assigned to the O–P–O stretching mode of the DNA backbone.²⁹ The Raman peak in the nucleus spectrum at 1,097 cm⁻¹ was attributed to the PO₂⁻ stretching mode of the DNA,³⁰ and 1,340 cm⁻¹ corresponded to guanine and adenine.²⁹ The high-frequency region above 2,000 cm⁻¹ contained mainly information about C–H stretching modes

Table 1 Nanoparticle characterization

Types of nanoparticles	T (°C)	HD (nm)	PDI	mV
MRC H ₂ O	25	120±1	0.17±0.01	-35±6
MRC DMEM – 0 hours	25	161±2	0.17	-13±2
MRC DMEM – 12 hours	25	166±3	0.17±0.01	-11±1
MC H ₂ O	25	97±1	0.20±0.02	-45±6
MC DMEM – 0 hours	25	411±15	0.37±0.05	-12±1
MC DMEM – 12 hours	25	310±7	0.280±0.003	-12±1

Note: Data presented as mean ± standard deviation.

Abbreviations: T, temperature; HD, hydrodynamic diameter; PDI, polydispersity index; MRC, maghemite–rhodium citrate; MC, maghemite-citrate; HD (nm), hydrodynamic diameter in nanometers; T (°C), temperature in degrees Celsius; DMEM, Dulbecco's Modified Eagle's medium.

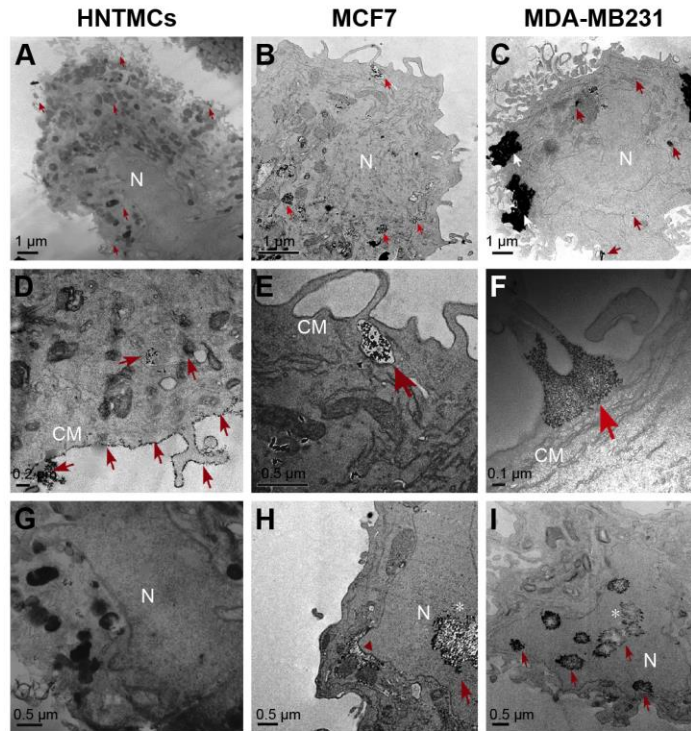


Figure 1 Electron micrography of cells exposed to maghemite–rhodium citrate nanoparticles (MRC NPs) for 6 hours. **Notes:** Human nontumor mesenchymal cells (HNTMC) in first column showing some MRC NPs (indicated by red arrows) inside the cytoplasm (A, D), and a substantial amount of NPs surrounding the cell membrane (CM) surface (D). Images of MCF7 (second column) and MDA-MB231 (third column) cells revealed MRC NPs, often present within cytoplasm (B, C). MRC NPs within vesicles in MCF-7 cells (E). Bigger clusters of MRC NPs (white arrows) were found in MDA-MB231 cells (C, F). MRC NPs reached the nucleus (N) in MCF7 and MDA-MB231 cells (H, I) while free NPs in the nucleus were observed in HNTMCs (G). Red arrowhead shows perinuclear vacuoles in MCF7 cells (H). *Karyorrhexis evidenced in MCF7 (H) and MDA-MB231 (I) nuclei.

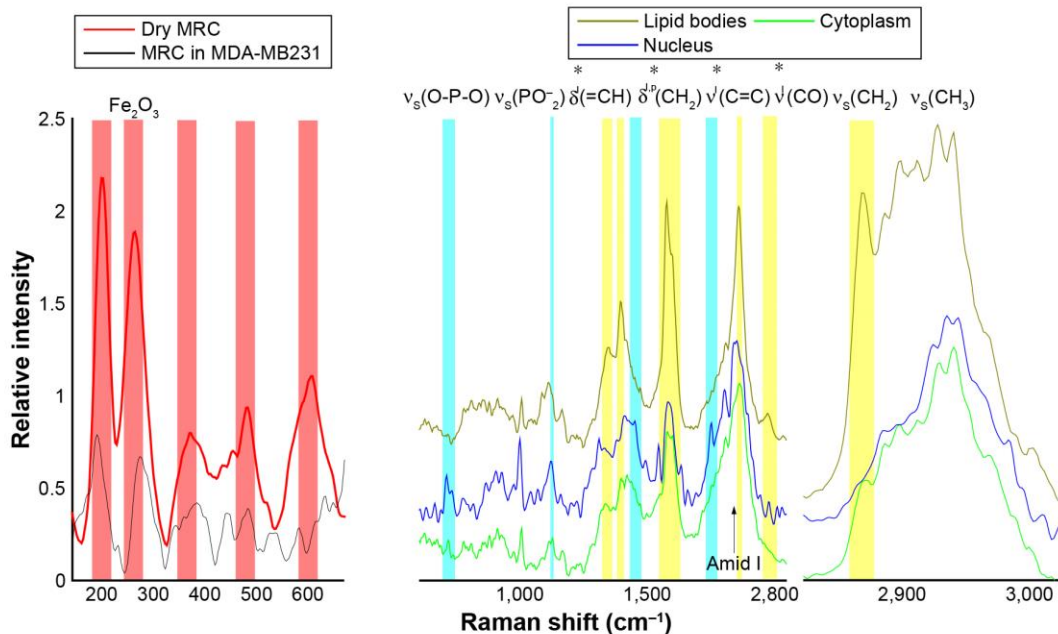


Figure 2 Raman spectra of maghemite–rhodium citrate (MRC) nanoparticles dried on quartz and in MDA-MB231 cells (left). **Notes:** The average spectra of different cellular components of MDA-MB231 cells are shown with their characteristic barcodes (right). The assignment of typical vibrational bands is denoted. ^p and ^l indicate protein and lipid vibrational modes, respectively.

of methylene and methyl groups. In particular, the high-frequency region revealed the presence and proportion of CH_3 and CH_2 groups, which are important for identifying both lipid-rich and protein-rich regions. The symmetric stretch bands of CH_2 ($2,850\text{ cm}^{-1}$) are much more intense in lipids than in the cytoplasm, due to a lower density of CH_2 groups in proteins compared to lipids. In LDs, this stretching mode is very intense. The high specific adenine and guanine bands of nucleus, amide I of proteins and CH_2 stretching, and CO and C=C modes of LDs were able to be observed easily, and served as a tool for the label-free discrimination of cell chemical composition.^{27–29} Figure 3 shows the Raman images of NPs-exposed MCF7 and MDA-MB231 cells generated from molecular fingerprints of different cellular components and NPs. The NPs were fully internalized in both cell lines, showing their cytoplasmic location and heading in the direction of the nucleus after 24 hours. However, NPs revealed a different translocation pattern in MCF7 and MDA-MB231 cells. MRC NPs were found to be strongly aggregated intracellularly

(Figure 3B). This observation was in agreement with TEM data. Furthermore, small agglomerates with low NPs concentration were also localized in the peripheral cytoplasm, close to the plasma membrane. In MCF7 cells, NPs were distributed throughout the whole cell, but most NPs were detected as aggregates, ranging from 0.5 to 1 μm in the perinuclear region (Figure 3). MRC NPs were found also to be partially localized with LDs. Additionally, alteration in cell morphology in both cell lines was observed when cells were exposed to MRC NPs. Most cells showed cytoplasmic vacuole formation and signs of nucleus degradation (Figure 3A).

Endocytosis study

In order to elucidate the endocytosis pathway involved in MRC NPs uptake, we performed a Western blot analysis to evaluate the expression levels of clathrin and caveolin, proteins that characterize two important endocytosis routes in both tumor and normal cells, both control and treated with NPs for 6 hours. MCF7 and MDA-MB231 tumor cells

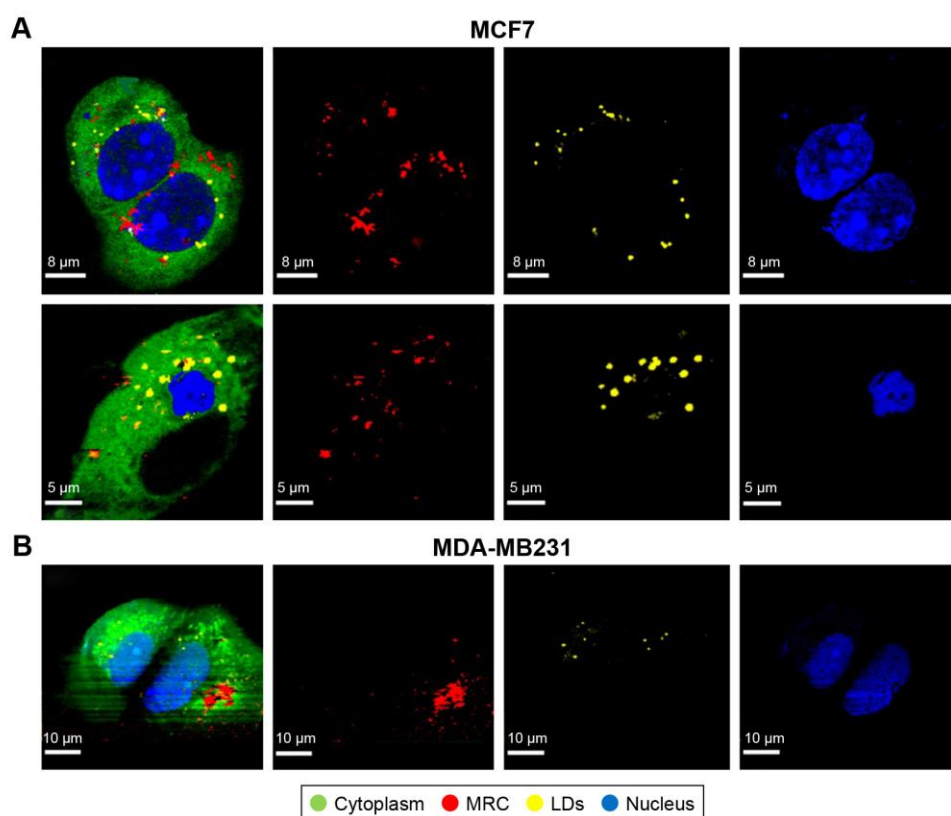


Figure 3 Intracellular maghemite–rhodium citrate nanoparticle (MRC NPs) location by confocal Raman microspectroscopy.

Notes: Images of different components of MCF7 (**A**) and MDA-MB231 (**B**) cells exposed to MRC NPs over 24 hours. The color-coded images on the left represent the overlapping of cytoplasm (green), nuclei (blue), lipids (yellow), and MRC NPs (red).

Abbreviation: LDs, lipid droplets.

showed much higher basal levels of clathrin expression than HNTMCs (Figures 4A and S2). NPs treatment led to an increase in clathrin expression in all cell lines, but in a more pronounced way in HNTMCs and MCF7 cells (Figures 4A and S2). With regard to caveolin expression, no differences were observed between control and treated cells in any of the three cell lines, and as expected epithelial MCF7 cells presented much lower levels of caveolin. These results suggest that MRC NPs endocytosis is probably clathrin-dependent, due to its ubiquitous occurrence in eukaryotes, and since HNTMCs express lower basal levels of this protein, this can explain the better selectivity of MRC NPs for tumor cells compared to the normal cells used in this work. To test this hypothesis, clathrin- and caveolin-dependent endocytic pathways were individually inhibited with noncytotoxic doses (Figure S3) of Pitstop 2 and M β CD, respectively, in MDA-MB231 cells. This analysis was conducted by flow-cytometry evaluation of forward-scatter and side-scatter parameters (Figure 4B). Forward-scatter and side-scatter

intensities are proportional to cell size and intracellular density, respectively, enabling the distinction of cells that have internalized NPs (Figure 4A). Alexa 488-labeled transferrin and lactosylceramide BoDipy–LacCer were used as positive control for clathrin- and caveolin-dependent endocytosis, respectively. Uptake of Alexa 488-labeled transferrin was inhibited by 40% with Pitstop 2 treatment (Figure S4), and uptake of lactosylceramide was also significantly reduced in the presence of M β CD (Figure S5), confirming the effective inhibition of these endocytic pathways. Incubation of MCR NPs-treated MDA-MB231 cells with Pitstop 2 resulted in about 30% inhibition of NPs uptake. However, cell uptake of MRC was not reduced when the caveolin-dependent pathway was inhibited.

Taken together, these results corroborate the previous Western blot results, indicating that this NPs internalization seemed to happen in a clathrin-dependent way. Caveolin seemed not to play a role in the uptake of MRC NPs in these cell lines (Figure 4C).

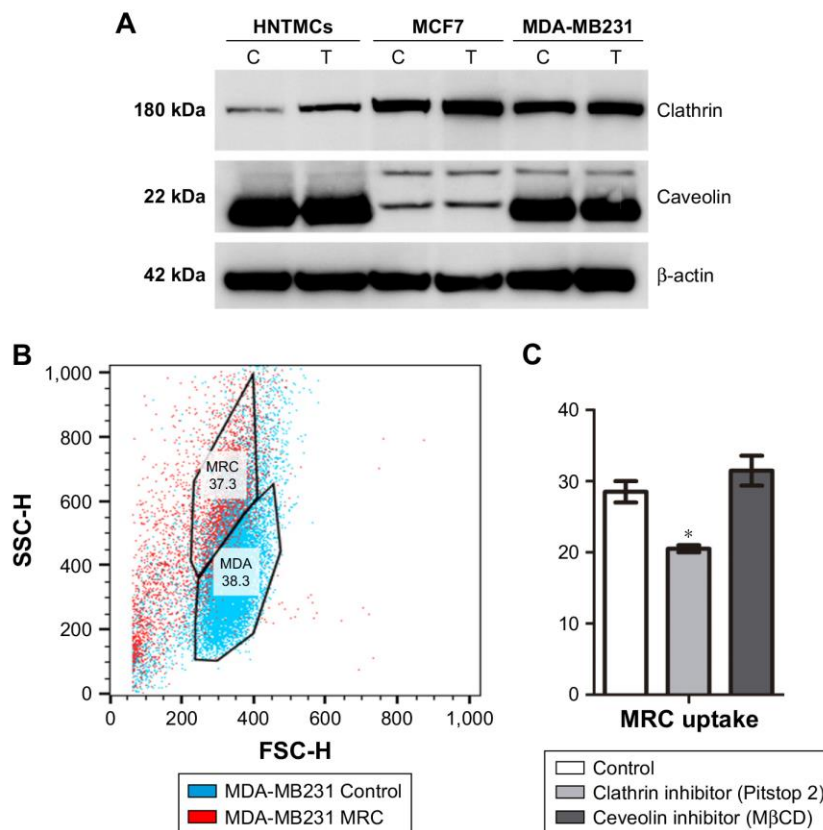


Figure 4 Endocytosis study.

Notes: (A) Western blot showing clathrin and caveolin expression in MDA-MB231, MCF7, and human nontumor mesenchymal cells (HNTMCs), both control (C) and treated (T). Sample loading was adjusted to equalize total protein. (B) Flow-cytometry light-scattering analysis showing MDA-MB231 cells with maghemite–rhodium citrate (MRC) nanoparticles (red) and without MRC nanoparticles (blue). (C) MRC uptake by MDA-MB231 was quantified after clathrin (Pitstop 2) and caveolin (M β CD) inhibition. * $P < 0.05$.

MRC NPs-uptake efficiency

To evaluate MRC NPs-uptake efficiency in MDA-MB231, MCF7 and HNTMCs, SEM and X-ray microanalysis were performed. Cells were demarcated on samples after visualization with secondary electrons (Figure 5A and B), and the presence of osmium on the chemical spectra of the selected areas was used as a control to confirm that no extracellular material was considered in the analysis. This heavy-metal element is used during sample preparation for the fixation of cell membranes, providing resistance to the electron beam and contrast for image formation.³¹ Cellular levels of Fe in MDA-MB231 cells were significantly higher than in the other two cell lines. HNTMCs had the lowest

intracellular amounts of this element (Figure 5C). Similar results were obtained regarding the quantification of intracellular MRC (MRC/ μm^2) NPs on TEM images (Figure 5D). These results reinforce the different patterns of intracellular NPs for breast cancer nonmetastatic (MCF7), breast cancer metastatic (MDA-MB231), and HNTMCs observed in TEM micrographs. Both methods were especially enlightening for this work to achieve clear NPs concentrations inside the cells (due to the slicing) and to exclude undesirable variables, such as cell-size variations and external NPs bound to the cell surface. Furthermore, the techniques applied here are label-free. The use of label-free dosimetry and imaging techniques is encouraged, since they are advantageous in

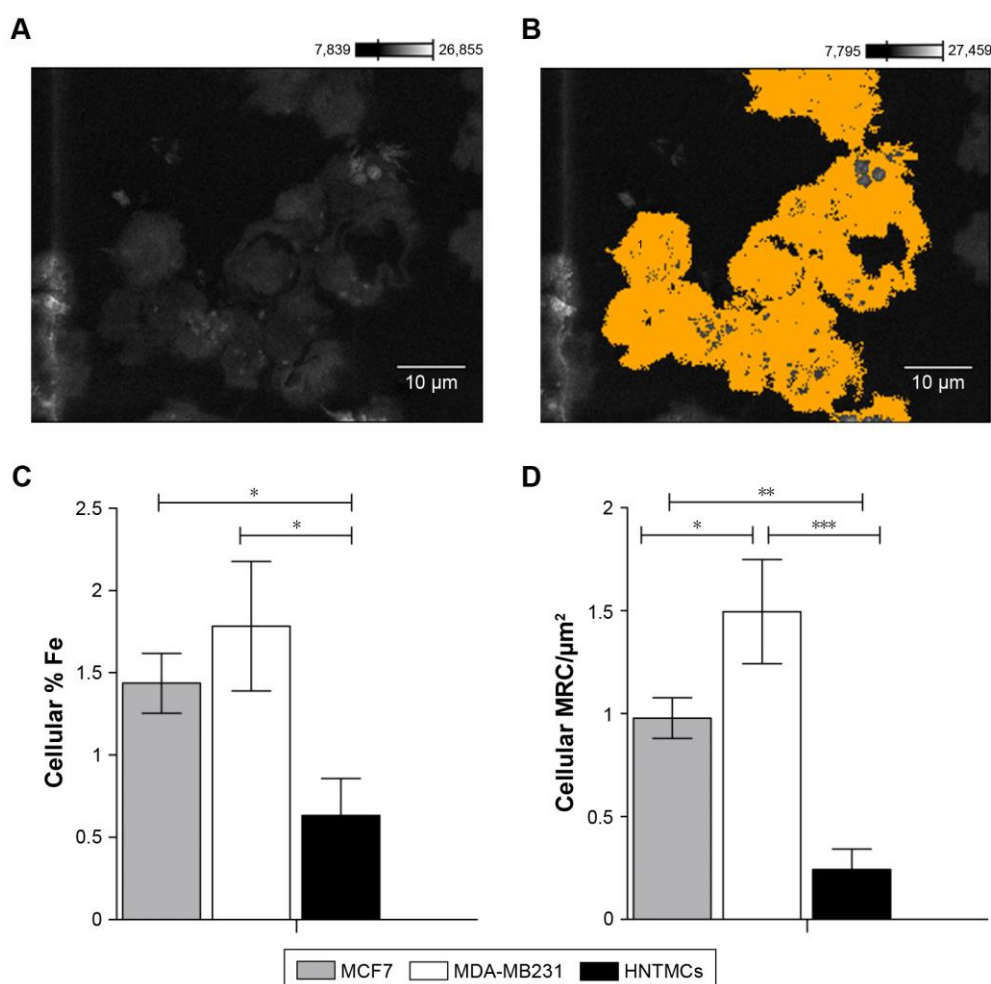


Figure 5 Maghemite–rhodium citrate nanoparticle (MRC NPs)-uptake efficiency in breast tumor cells (MCF7 and MDA-MB231) and human nontumor mesenchymal cells (HNTMCs).

Notes: (A) Cells in a resin section imaged by scanning electron microscopy. (B) Cellular areas demarcated using Point & Shoot acquisition mode (Thermo Fisher Scientific) and completely analyzed by energy-dispersive spectroscopy. (C) Percentage of iron in the analyzed cells. (D) Relative areas (%) containing MRC NPs on transmission electron microscopy of MDA-MB231, MCF7, and HNTMCs. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$. Magnification in A and B $\times 1,800$.

the study of authentic nanomaterials. Such techniques as confocal laser microscopy and flow cytometry employed to NPs localization and quantification require fluorescent labels and dyes, which may significantly change the surface properties of nanomaterials, and thus misrepresent their cellular distribution and uptake.³² We have demonstrated that MDA-MB231 and MCF7 cells had an uptake approximately three- and twofold higher than HNTMCs (nontumor cells), respectively (Figure 5B).

Discussion

We have shown preferential uptake of MRC agglomerates in MDA-MB231 and MCF7 cells that coincide with their high basal clathrin expression, which mediates endosomal internalization. The data found in our work are in accordance with studies showing that the uptake of particles of 500 nm diameter is mediated by clathrin-dependent endocytosis.^{33,34} Despite studies showing that internalization of particles smaller than 200 nm in diameter was mediated by clathrin-coated pits, and when their size was increased, uptake shifted to caveolae-mediated internalization,^{35,36} however, these data conflict with other studies that estimated caveolae-dependent internalization of 50–80 nm-diameter NPs, while NPs of 120 nm diameter were internalized by clathrin-coated pits.^{37–39} Higher internalization is an index for more accumulation of drug molecules, which release slowly and have sustained effects on cancer cells. Internalization and prolonged retention of nanomedicine by tumor cells are desirable for more effective tumor killing and specific action. Previous studies have already estimated internalization of magnetic NPs of similar size in MDA-MB231, MCF7,^{40,41} and cells similar to HNTMCs. In vitro evaluation using cells similar to HNTMCs revealed less internalization of maghemite NPs compared to tumor cells (HeLa),⁴² consistent with our findings. Chithrani and Chan⁴³ demonstrated that the endocytosis mechanism of gold NPs in MCF7 cells was clathrin-dependent. Furthermore, also in accordance with our work, higher uptake of iron oxide NPs by MDA-MB231 compared to MCF7 cells has been evidenced.⁴⁴

The endocytosis process can potentially control many activities related to cancer-cell proliferation and migration. These processes require dynamic modulation of cell-surface proteins by endocytosis. Given this functional connection, it has been suggested that endocytosis is unregulated in cancer, resulting in different cell phenotypes.⁴⁵ Therefore, further work is necessary to explore the role and regulation of clathrin associated with breast cancer-cell phenotype and cancer hallmarks directly.

MRC NPs reached the nuclear region in tumor cells only (MCF7 and MDA-MB231). A recent study demonstrated that cellular localization of drugs can determine their anti-cancer mechanism of action. In this context, compound translocation to the cell nucleus induces cell-cycle arrest in the S phase through triggering p53-mediated DNA damage response, showing higher anticancer efficacy than other formulations that remain localized in the cytoplasm.⁴⁶ Since nuclear location is associated with more efficient action of antitumor drugs, these results show that MRC NPs potential as an antitumor compound must be explored. Furthermore, it is possible to suggest a selective action modulated by the natural design of NPs and cell features. Differences in particle-uptake efficiency can be explained by variations in cell-membrane composition and metabolic activity of the tested cells.^{39,47} The high metabolic activity of tumor cells can lead to overexpression of surface receptors, contributing to an increase in NPs uptake.⁴⁸ In this case, clathrin expression may have favored MRC NPs uptake in breast tumor cells.

Conclusion

In the past few years, many studies have related different NPs size, composition, and charge to uptake processes and localization in cells. However, despite some works mentioning cell type as an important factor in evaluating this process, few experiments have compared single-NPs uptake in different cell lines. Our results demonstrated that cell type is a critical factor in NPs cellular interaction. The expression of different protein levels involved in endocytic pathways among cell types can define the route, mechanism, uptake efficiency, and intracellular distribution of NPs. Therefore, in vitro experiments using different cell lines are encouraged to validate cytotoxic studies. Our results suggest that MRC NPs are a promising nanomaterial, which may provide a convenient route for cellular targeting with great potential for clinical application in cancer treatment.

Acknowledgments

The authors acknowledge financial support from the CNPq, CAPES, FAP-DF, and FINEP. All authors contributed equally to this work.

Disclosure

The authors report no conflicts of interest in this work.

References

1. Azzawi M, Seifalian A, Ahmed W. Nanotechnology for the diagnosis and treatment of diseases. *Nanomedicine (Lond)*. 2016;11(16):2025–2027.

2. Banks WA. From blood-brain barrier to blood-brain interface: new opportunities for CNS drug delivery. *Nat Rev Drug Discov.* 2016;15(4):275–292.
3. Crawford L, Rosch J, Putnam D. Concepts, technologies, and practices for drug delivery past the blood-brain barrier to the central nervous system. *J Control Release.* 2016;240:251–266.
4. Upadhyay RK. Drug delivery systems, CNS protection, and the blood brain barrier. *Biomed Res Int.* 2014;2014:869269.
5. Mirkin CA, Meade TJ, Petrosko SH, Stegh AH. *Nanotechnology-Based Precision Tools for the Detection and Treatment of Cancer.* Heidelberg: Springer; 2015.
6. Pentenero M. Nanotechnology: a novel adjunctive aid to fight cancer. *Oral Dis.* 2017;23(3):273–275.
7. Maeda H, Nakamura H, Fang J. The EPR effect for macromolecular drug delivery to solid tumors: improvement of tumor uptake, lowering of systemic toxicity, and distinct tumor imaging in vivo. *Adv Drug Deliv Rev.* 2013;65(1):71–79.
8. Quinto CA, Mohindra P, Tong S, Bao G. Multifunctional superparamagnetic iron oxide nanoparticles for combined chemotherapy and hyperthermia cancer treatment. *Nanoscale.* 2015;7(29):12728–12736.
9. Iv M, Telischak N, Feng D, Holdsworth SJ, Yeom KW, Daldrup-Link HE. Clinical applications of iron oxide nanoparticles for magnetic resonance imaging of brain tumors. *Nanomedicine (Lond).* 2015;10(6):993–1018.
10. Harmon TL, Harbuzariu A, Yang L, Gonzalez-Perez RR. Iron oxide nanoparticle-leptin receptor antagonist: a novel targeted adjuvant therapy for triple negative breast cancer. *Proc Annu Meet Am Assoc Cancer Res.* 2015;75(15 Suppl):3909.
11. Karakatsanis A, Christiansen P, Fischer L, et al. Super paramagnetic iron oxide nanoparticles for sentinel node detection in patients with breast cancer: experience from seven centres in Sweden and Denmark. *Eur J Surg Oncol.* 2016;42(9):S83.
12. Kossatz S, Grandke J, Couleaud P, et al. Efficient treatment of breast cancer xenografts with multifunctionalized iron oxide nanoparticles combining magnetic hyperthermia and anti-cancer drug delivery. *Breast Cancer Research.* 2015;17:66.
13. Estelrich J, Escrivano E, Queralt J, Busquets MA. Iron oxide nanoparticles for magnetically-guided and magnetically-responsive drug delivery. *Int J Mol Sci.* 2015;16(4):8070–8101.
14. Jurado R, Frączek P, Droetto M, et al. Apomaghemite as a doxorubicin carrier for anticancer drug delivery. *J Inorgan Biochem.* 2016;157:46–51.
15. Graczyk H, Bryan LC, Lewinski N, et al. Physicochemical characterization of nebulized superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs). *J Aerosol Med Pulm Drug Deliv.* 2015;28(1):43–51.
16. Carneiro ML, Peixoto RC, Joanitti GA, et al. Antitumor effect and toxicity of free rhodium (II) citrate and rhodium (II) citrate-loaded maghemite nanoparticles in mice bearing breast cancer. *J Nanobiotechnology.* 2013;11:4.
17. Chaves NL, Lopes CA, Carneiro ML, et al. Rhodium citrate associated with maghemite nanoparticles causes DNA fragmentation independently of caspases 3 and mediated by reactive oxygen species. *J Nanomed Nanotechnol.* 2015;6:312.
18. Peixoto RC, Miranda-Vilela AL, de Souza Filho J, et al. Antitumor effect of free rhodium (II) citrate and rhodium (II) citrate-loaded maghemite nanoparticles on mice bearing breast cancer: a systemic toxicity assay. *Tumour Biol.* 2015;36(5):3325–3336.
19. Zhang S, Gao H, Bao G. Physical principles of nanoparticle cellular endocytosis. *ACS Nano.* 2015;9(9):8655–8671.
20. Paulo CS, das Neves RP, Ferreira LS. Nanoparticles for intracellular-targeted drug delivery. *Nanotechnology.* 2011;22(49):494002.
21. Sahay G, Alakhova DY, Kabanov AV. Endocytosis of nanomedicines. *J Control Release.* 2010;145(3):182–195.
22. Fröhlich E. The role of surface charge in cellular uptake and cytotoxicity of medical nanoparticles. *Int J Nanomedicine.* 2012;7:5577–5591.
23. Nel AE, Mädler L, Velegol D, et al. Understanding biophysicochemical interactions at the nano-bio interface. *Nat Mater.* 2009;8(7):543–557.
24. Saie AA, Ray M, Mahmoudi M, Rotello VM. Engineering the nanoparticle-protein interface for cancer therapeutics. In: Mirkin CA, Meade TJ, Petrosko SH, Stegh AH, editors. *Nanotechnology-Based Precision Tools for the Detection and Treatment of Cancer.* Heidelberg: Springer; 2015:245–273.
25. Moore TL, Rodriguez-Lorenzo L, Hirsch V, et al. Nanoparticle colloidal stability in cell culture media and impact on cellular interactions. *Chem Soc Rev.* 2015;44(17):6287–6305.
26. Baca HK, Ashley C, Carnes E, et al. Cell-directed assembly of lipid-silica nanostructures providing extended cell viability. *Science.* 2006;313(5785):337–341.
27. Chamritski I, Burns G. Infrared- and Raman-active phonons of magnetite, maghemite, and hematite: a computer simulation and spectroscopic study. *J Phys Chem B.* 2005;109(11):4965–4968.
28. Notingher I, Verrier S, Haque S, Polak J, Hench L. Spectroscopic study of human lung epithelial cells (A549) in culture: living cells versus dead cells. *Biopolymers.* 2003;72(4):230–240.
29. Notingher I, Green C, Dyer C, et al. Discrimination between ricin and sulphur mustard toxicity in vitro using Raman spectroscopy. *J R Soc Interface.* 2004;1(1):79–90.
30. Movasaghi Z, Rehman S, Rehman IU. Raman spectroscopy of biological tissues. *Appl Spectrosc Rev.* 2007;42(5):493–541.
31. Wyroba E, Suski S, Miller K, Bartosiewicz R. Biomedical and agricultural applications of energy dispersive X-ray spectroscopy in electron microscopy. *Cell Mol Biol Lett.* 2015;20(3):488–509.
32. Collins AR, Annangi B, Rubio L, et al. High throughput toxicity screening and intracellular detection of nanomaterials. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol.* 2017;9(1):e1413.
33. Blechinger J, Bauer AT, Torrano AA, Gorzelanny C, Bräuchle C, Schneider SW. Uptake kinetics and nanotoxicity of silica nanoparticles are cell type dependent. *Small.* 2013;9(23):3970–3980.
34. Zhang Y, Hu L, Yu D, Gao C. Influence of silica particle internalization on adhesion and migration of human dermal fibroblasts. *Biomaterials.* 2010;31(32):8465–8474.
35. Rejman J, Oberle V, Zuhorn IS, Hoekstra D. Size-dependent internalization of particles via the pathways of clathrin- and caveolae-mediated endocytosis. *Biochem J.* 2004;377(1):159–169.
36. Suen WL, Chau Y. Size-dependent internalisation of folate-decorated nanoparticles via the pathways of clathrin and caveolae-mediated endocytosis in ARPE-19 cells. *J Pharm Pharmacol.* 2014;66(4):564–573.
37. Gratton SE, Ropp PA, Pohlhaus PD, et al. The effect of particle design on cellular internalization pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(33):11613–11618.
38. Patel LN, Zaro JL, Shen WC. Cell penetrating peptides: intracellular pathways and pharmaceutical perspectives. *Pharm Res.* 2007;24(11):1977–1992.
39. Kettler K, Veltman K, van de Meent D, van Wezel A, Hendriks AJ. Cellular uptake of nanoparticles as determined by particle properties, experimental conditions, and cell type. *Environ Toxicol Chem.* 2014;33(3):481–492.
40. Zhang Y, Yang M, Portney NG, et al. Zeta potential: a surface electrical characteristic to probe the interaction of nanoparticles with normal and cancer human breast epithelial cells. *Biomed Microdevices.* 2008;10(2):321–328.
41. Cai Y, Cao C, He X, et al. Enhanced magnetic resonance imaging and staining of cancer cells using ferrimagnetic H-ferritin nanoparticles with increasing core size. *Int J Nanomedicine.* 2015;10:2619–2634.
42. Auffan M, Decome L, Rose J, et al. In vitro interactions between DMSA-coated maghemite nanoparticles and human fibroblasts: a physicochemical and cyto-genotoxic study. *Environ Sci Technol.* 2006;40(14):4367–4373.
43. Chithrani BD, Chan WC. Elucidating the mechanism of cellular uptake and removal of protein-coated gold nanoparticles of different sizes and shapes. *Nano Lett.* 2007;7(6):1542–1550.
44. Yallapu MM, Othman SF, Curtis ET, Gupta BK, Jaggi M, Chauhan SC. Multi-functional magnetic nanoparticles for magnetic resonance imaging and cancer therapy. *Biomaterials.* 2011;32(7):1890–1905.

45. Elkin SR, Bendris N, Reis CR, et al. A systematic analysis reveals heterogeneous changes in the endocytic activities of cancer cells. *Cancer Res.* 2015;75(21):4640–4650.
46. Chen J, Luo Z, Zhao Z, Xie L, Zheng W, Chen T. Cellular localization of iron (II) polypyridyl complexes determines their anticancer action mechanisms. *Biomaterials.* 2015;71:168–177.
47. Brunner TJ, Wick P, Manser P, et al. In vitro cytotoxicity of oxide nanoparticles: comparison to asbestos, silica, and the effect of particle solubility. *Environ Sci Technol.* 2006;40(14):4374–4381.
48. Kohler N, Sun C, Wang J, Zhang M. Methotrexate-modified superparamagnetic nanoparticles and their intracellular uptake into human cancer cells. *Langmuir.* 2005;21(19):8858–8864.

Supplementary materials

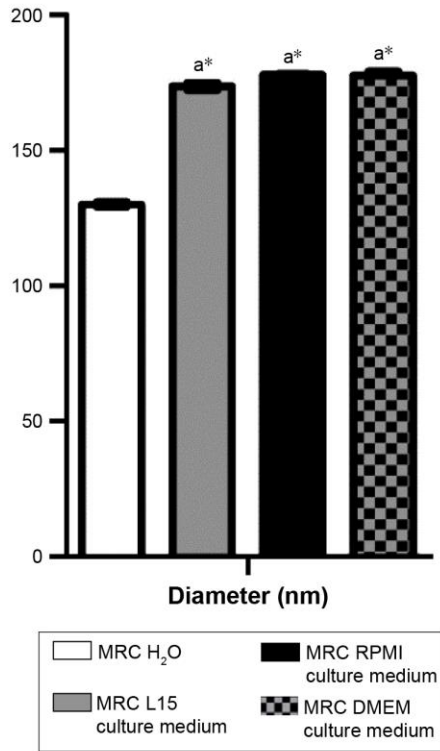


Figure S1 Hydrodynamic diameter analysis in culture media.
Notes: Maghemite–rhodium citrate (MRC) diluted in culture medium had larger hydrodynamic diameter than in water dilution (a*). There was no difference among hydrodynamic diameters of MRC diluted in L15, RPMI, and DMEM culture medium.

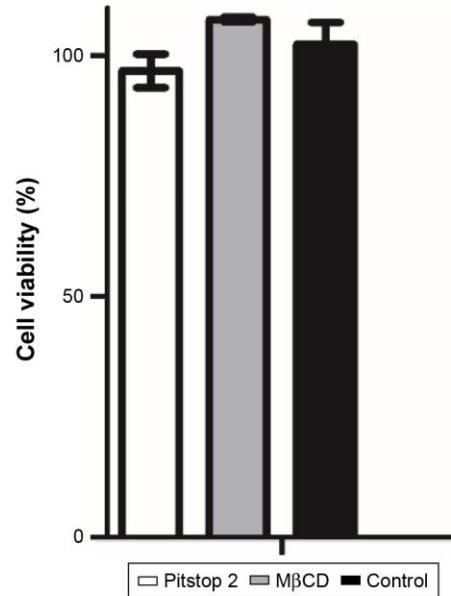


Figure S3 Endosome inhibitor-cytotoxicity analysis. Cell viability analyzed by MTT did not show viability reduction after 2 hours' exposure.

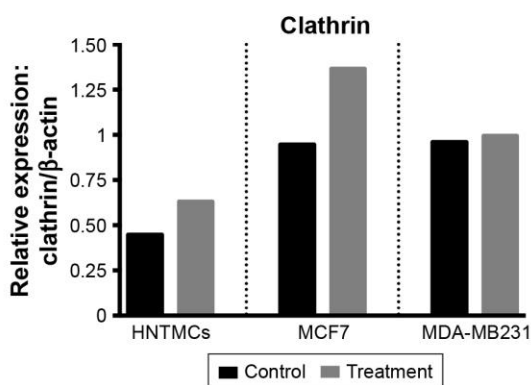


Figure S2 Relative densities of clathrin bands.
Note: Bands in human nontumor mesenchymal cells (HNTMCs), MCF7, and MDA-MB231 cells after 6 hours of exposure of maghemite–rhodium citrate nanoparticles (treatment) in gray bars and control group in black bars (normalized to β-actin, protein loading control).

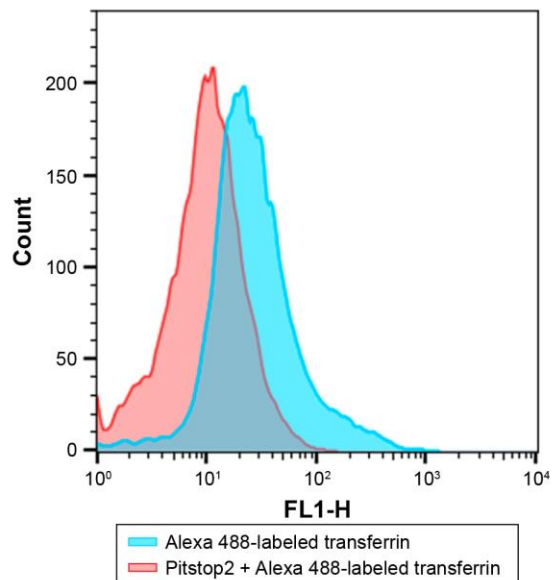


Figure S4 Clathrin inhibition. Alexa 488-labeled transferrin-uptake reduction after Pitstop2 inhibition of clathrin.

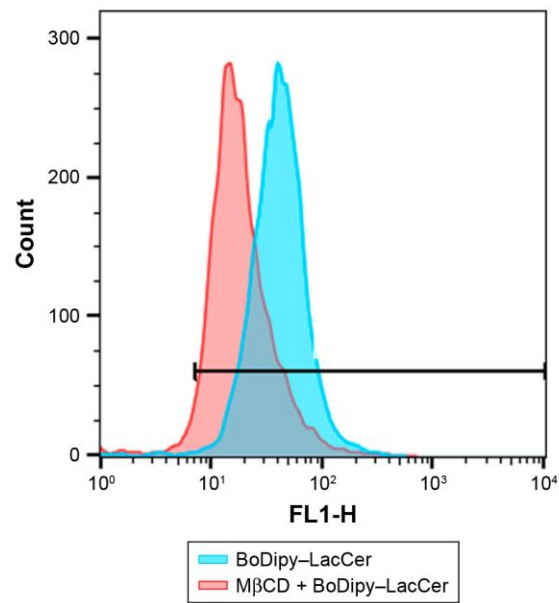


Figure S5 Caveolin inhibition. BoDipy-LacCer-uptake reduction after MβCD inhibition of caveolin.

International Journal of Nanomedicine

Dovepress

Publish your work in this journal

The International Journal of Nanomedicine is an international, peer-reviewed journal focusing on the application of nanotechnology in diagnostics, therapeutics, and drug delivery systems throughout the biomedical field. This journal is indexed on PubMed Central, MedLine, CAS, SciSearch®, Current Contents®/Clinical Medicine,

Journal Citation Reports/Science Edition, EMBase, Scopus and the Elsevier Bibliographic databases. The manuscript management system is completely online and includes a very quick and fair peer-review system, which is all easy to use. Visit <http://www.dovepress.com/testimonials.php> to read real quotes from published authors.

Submit your manuscript here: <http://www.dovepress.com/international-journal-of-nanomedicine-journal>

10.2 CAPÍTULO DE LIVRO

Nanobiotechnology for Breast Cancer Treatment

Nanobiotechnology for Breast Cancer Treatment

Márcia Rocha, Natalia Chaves and Sônia Bão

Additional information is available at the end of the chapter

<http://dx.doi.org/10.5772/66989>

Abstract

Despite many technological breakthroughs, even the best breast cancer treatments available today are not 100% effective. Chemotherapy has improved, but many drugs still do not reach the tumor site at effective doses and are often associated with high systemic toxicity and poor pharmacokinetics. Moreover, for many malignancies, diagnosis is obtainable only in metastatic stages of development, reducing the overall effectiveness of treatment. The choice of available treatments depends on tumor characteristics such as biomarkers, tumor size, metastatic disease, ligands, and antigen or endocrine receptor expression. Combined with surgical resection, chemotherapy and radiation remain the first line of treatment for patients with cancer. Even with these treatments, however, cancer continues to have high fatality rates and current therapeutic modalities have yet to significantly improve the often dismal prognosis of this disease. Nanotechnology is a highly focused approach, which may provide more effective and less toxic treatment when compared to chemotherapy. This area of research has emerged as cancer treatment in the form of new drugs and has reached promising results in preclinical and clinical trials proving its value as a potential tumor therapy.

Keywords: breast cancer, therapy, nanomaterials, nano-oncology

1. Introduction

Nanobiotechnology is defined as the biomedical application of nano-sized systems [1]. Nanomaterials, which measure a few nanometers in length, allow for unique interaction with biological systems at the molecular level. They can also facilitate important advances in detection, diagnosis, and treatment of human cancers and this approach is known as nano-oncology. Breast cancer is one of the most common cancers worldwide [2]. The choice of available treatments depends on tumor characteristics such as biomarkers, tumor size, metastatic disease, ligands, and antigens or endocrine receptors expression. Combined with surgical resection, chemotherapy and radiation remain the first line of treatment for patients

with cancer [3]. Improvements have been made to chemotherapies, because drugs are still not reaching the tumor site at effective doses, and are often associated with high systemic toxicities and poor pharmacokinetics. The nanotechnology is an approach which allows more effective and less toxic chemotherapy.

For many malignancies, diagnosis is obtainable only during metastatic stages of development, reducing the overall effectiveness of treatment [4]. Multidrug resistance, the principal mechanism by which many cancers develop resistance to drugs, is also a key factor in the failure of many forms of chemotherapy. It affects patients with a variety of blood cancers and solid tumors, including breast cancers [5]. Triple-negative breast cancer (TNBC), with absent or minimal expression of estrogen and progesterone receptors, and human epidermal growth factor receptor 2 are most common in younger women. In later stages, the prognosis is more dire, when compared to that of other breast cancer subtypes, with a higher risk of relapse, often involving other organs [6]. Emerging nanotechnologies have exhibited the possibility of specifically treating or targeting breast cancer. Among nanoparticles, various lipid nanoparticles, namely liposomes, solid lipid nanoparticles, nanostructured lipid carriers, and lipid polymer hybrid nanoparticles, have been developed over the past few years for breast cancer therapy and evidence of this is documented [2].

Nanoparticles are also being actively developed for tumor imaging *in vivo*, biomolecular profiling of cancer biomarkers, and targeted drug delivery. These nanotechnology-based techniques can be widely applied for management of varying malignant diseases [7].

2. Breast cancer

2.1. Incidence and epidemiology

Breast cancer is the most frequent carcinoma in females and the second most common cause of cancer-related mortality in women worldwide. Approximately 61,000 new cases of *in situ* and 246,000 cases of invasive breast carcinoma, respectively, are expected to be diagnosed in the United States in 2016. Within this same period in the United States, breast cancer will account for an estimated 40,500 deaths among women [8]. The decline in cancer-related death rates over the past two decades has been driven by continued decreases in fatalities from breast cancer. Death rates for female breast cancer are down 36% from peak rates, most likely, as a result of improvements in early detection and treatment [9, 10]. By contrast, incidence rates increased in men for cancer of the breast. Some suggestive correlations about the increased cancer rate involve changes in environmental risk factors, such as obesity [8, 11].

2.2. Current breast cancer diagnosis and treatment

Breast cancer diagnosis, according to the European guidelines, is based on clinical examination in combination with imaging and confirmed by pathological assessment [3]. Clinical examination includes manual palpation of the breasts and locoregional lymph nodes, along with assessment for distant metastases (bones, liver, lungs, and neurological

examination in the case of symptoms). Other forms of assessment include complete personal and family medical history, including evaluation of menopausal status, physical examination, blood count analysis, liver and renal function tests, and alkaline phosphatase and calcium checks [12].

Pathological diagnosis should be based on core-needle biopsies obtained by manual or preferably by ultrasound or stereotactic guidance. The pathological report should include the histological type, grade, estrogen receptor (ER), and for invasive cancer, progesterone receptor (PgR) along with human growth factor receptor type 2 (HER2) [13]. Routine staging evaluations are directed at locoregional diseases, as asymptomatic distant metastases are very rare and patients do not profit from comprehensive laboratory and radiological staging. Bilateral mammography and ultrasound of the breast and regional lymph nodes are included in imaging [3].

Subsequent to diagnosis, the prognostic and treatment are based on histology and immunohistochemistry (IHC) data. The selection of a treatment strategy is based upon the tumor extent/location (size and location of primary tumor, number of lesions, and number and extent of lymph node involvement) and other factors such as age, lifestyle, and general health status of the patient [14].

Women with a high risk of breast cancer (previous chest wall irradiation for lymphoma or carrying the BRCA1 or BRCA2 gene mutations) may be offered risk-reducing surgery including prophylactic bilateral mastectomy and reconstruction [15].

Ductal carcinoma *in situ* may be treated with breast conservation therapy (BCT), which has replaced radical mastectomy as the treatment of choice for early breast cancer, providing clear resection margins achieve, or with mastectomy, usually followed by radiotherapy and/or chemotherapy [16]. Whole-breast radiotherapy (WBRT) after breast-conserving surgery (BCS) for diagnosis of ductal carcinoma *in situ* (DCIS) decreases the risk of local recurrence [17]. Mastectomy may still be carried out based upon tumor size (relative to breast size), tumor multicentricity, prior radiation of the chest wall or breast, or patient choice [18]. Sentinel lymph node biopsy (SLNB) is now the standard of care. All modalities of chemotherapy, endocrine therapies (ETs), and targeted therapies as adjuvant treatments may be used preoperatively for patients with isolated tumor cells [13].

In HER2-positive breast cancer, trastuzumab therapy should be started in the neoadjuvant setting in association with the taxane part of the chemotherapy regimen. The chemotherapy regimens to be used in the neoadjuvant setting are the same ones used in the adjuvant setting. Unfortunately, there are no validated predictive markers which allow for the tailoring of the regimen to the individual patient. It is therefore recommended that a sequential program of anthracyclines and taxanes is used. ER-positive, HER2-negative carcinomas, especially of the lobular subtype, are generally less responsive to primary chemotherapy than ER-negative and HER2-positive tumors and may benefit more from primary ET. ET is usually given 4–6 months before surgery and continued postoperatively; for post-menopausal patients, aromatase inhibitors (AIs) are more effective than tamoxifen in decreasing tumor size and require less extensive surgery [3, 19].

2.3. Limitations of the current breast cancer treatments

One major challenge to the treatment of cancer is the lack of selective toxicity, which results in a reduced therapeutic index and, as consequence, compromises clinical prognosis. In order to reduce damage to normal tissues, suboptimal doses of anticancer chemotherapeutics are often administered [20].

Furthermore, the high interstitial fluid pressure (IFP) of solid tumors forms a barrier to trans-capillary transport and results in poor biodistribution and penetration of drugs [21]. Another determinant of drug distribution within tissues is the half-life of the drugs in circulation; a drug with longer half-life will establish a more uniform distribution in tissues, even if its extravasation and penetration of tissues are relatively slow, whereas a drug that has a short half-life will have nonuniform distribution [22]. Moreover, vessels in tumor sites are heterogenic and may have fenestrations that increase the extravasation of drugs [23].

It has been shown that the amount of drug accumulated in normal viscera is 10- to 20-fold higher than that in a similarly weighted tumor site [24] and that many anticancer drugs are not able to penetrate more than 40–50 mm (equivalent to the combined diameter of three to five cells) from the vasculature [20, 25, 26]. These defects often lead to incomplete tumor response, multiple drug resistance (MDR), and ultimately therapeutic failure [27–29]. MDR, when tumor cells are treated with one anticancer drug and become resistant to a whole spectrum of drugs, is usually based on overexpressed drug efflux proteins and therefore is an important challenge for breast cancer therapy [30–33].

3. Nanobiotechnology-based platforms for breast cancer therapy

3.1. Properties of nanocarriers

The most current anticancer agents do not have an adequate job of differentiating between cancerous and normal cells and can lead to systemic toxicity and severe side effects. To overcome limitations of conventional chemotherapeutics, nanotechnology offers a more targeted approach and could therefore provide significant benefits to cancer patients. The size, shape, and charge are important parameters in nanoparticle systems that indicate the *in vivo* distribution, targeting ability, and biological destination of nanoparticles.

Nanoparticles have many advantages over free drugs. Some of them are listed below:

- Protect the drugs from early degradation.
- Enhance absorption of the drugs into a selected tissue.
- Control the drug tissue distribution and pharmacokinetic.
- Improve intracellular penetration.
- Prevent drugs from premature interaction with the biological environment.
- Reduce systemic toxicity.

Particles with hydrodynamic diameters below 10 nm are subject to rapid kidney clearance. Most of injected nanoparticles end up in the liver and spleen. Resident macrophages will phagocytose nanoparticles, degrade a small part of them, and exocytose both the degraded and intact nanoparticles. To avoid mechanical filtration by the liver and spleen, particles require size limitations above 200 nm [34, 35].

The zeta potential (surface charge) of nanoparticles has been shown to influence the nanoparticles direction within the tumor. It has been described that positively charged nanoparticles show increased cell uptake and binding due to the interaction between cationic nanoparticles and negatively charged cell membranes. Neutral particles have demonstrated lower interaction with the cell membrane than those nanoparticles with the same size and charge, resulting from the lower number of electrostatic interactions between charged cell membranes and nanoparticles surface [36–38]. In addition, studies have shown that systemically administered nanoparticles, with 30–40 nm [39] and 70 nm [40] in size and having a slightly negative surface charge, revealed internalization by tumor cells in mice and movement away from blood vessels [38].

Neutral polymers are used to minimize nanoparticle surface charge. The polymers are generally used to reduce aggregation caused by particle-particle interactions as well as limiting potential electrostatically induced interactions with other components of circulation, such as plasma membranes of cells (negative charge). Supposing the nanoparticle surface charge is increased, both positively and negatively, the probability that the particle will be removed from circulation by macrophage increases [36, 41]. When nanomaterials are administered into the blood, they are taken up within minutes or by the phagocytic cells of mononuclear phagocyte (MPS). The opsonization can be prevented by adding poly (ethylene) glycol (PEG) to the surface of nanomaterials. This addition drastically increases the blood half-life of all nanomaterials regardless of surface charge, improving the circulation time and accumulation in the target tissue. To create long-circulating nanoparticles, a diameter between 30 and 200 nm is desired [42].

The nanoparticle surface is the site that is modified to include targeting ligands. The reason for including a target ligand is that the cell surface of the cognate receptor is elevated in target cancer cells relative to other cells [43]. The advantages of surface coating are that it offers biocompatibilities, biodistribution of the nanoparticles, and modulating interaction between nanoparticles and cells, tissues, and biomolecules [44].

3.2. Nanoparticle drug delivery arsenal

To construct an appropriate nanocarrier for rapid and effective clinical translation, some important characteristics need to be considered. The nanocarriers must be made from a material that is biocompatible and easily functionalized along with being well characterized, soluble, exhibit extended circulation ability, no aggregation, and high uptake efficiency by the target cells.

Nanocarriers can be classified into three categories based upon materials that they are made from: (1) lipid-based, (2) polymeric, and (3) inorganic (**Figure 1**). These nanocarriers have been used for a variety of applications such as drug delivery, imaging, apoptosis detection, radiation sensitizers, and photothermic ablation of tumors [7, 45, 46]. Some of these nanocarriers are described below.

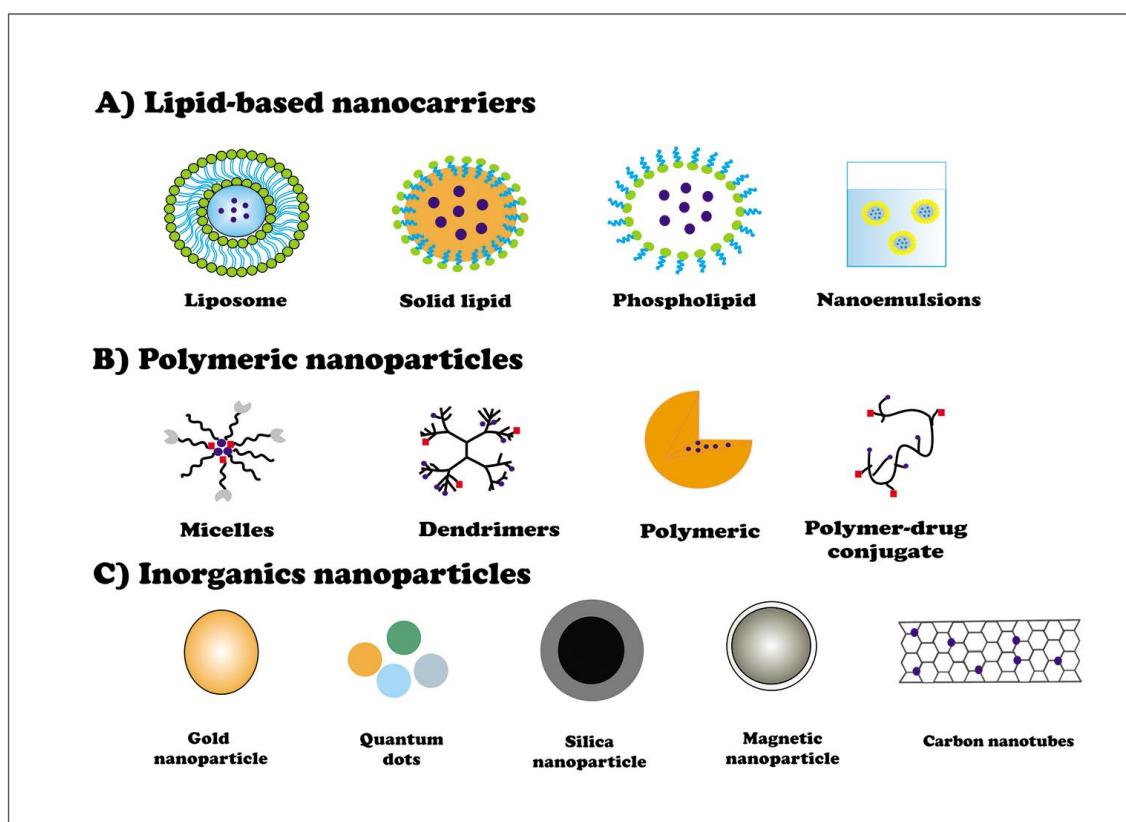


Figure 1. Schematic of different kinds of nanocarriers used for drug delivery. (A) Lipid-based nanocarriers, (B) polymeric nanoparticles, (C) inorganics particles.

3.2.1. Lipid-based nanocarriers

Lipid-based drug delivery systems have attractive properties, as well as biocompatibility, biodegradability, and the ability to entrap both hydrophobic and hydrophilic drugs. Lipid-based nanocarriers include liposomes, nanoemulsion, solid lipid nanoparticles, and phospholipid micelles.

Liposomes were the first nanocarriers, described in 1965 by Bangham [47], and the first that have been clinically approved by the FDA (Food and Drug Administration) to carry chemotherapy drugs (DaunoXome™) (50–80 nm) in 1996 [48]. Liposomes are small vesicles consisting of a bilayer lipid membrane surrounding an aqueous interior compartment [49]. The membranes consist of amphiphilic compounds, such as phospholipids and glycolipids, which make them biodegradable. Hydrophobic molecules are intercalated within the bilayer membrane, and hydrophilic molecules can be entrapped in their aqueous core, making liposomes a good therapeutic carrier [50]. To improve stability and circulation half-life, liposomes can be coated with targeting ligands and polymers such as PEG [51]. For example, a recent study showed that PEG-modified liposomes of ursolic acid enhanced *in vitro* cytotoxicity in gastric cancer cells when compared to standard ursolic acid [38]. Liposomal drug formulation improves the biodistribution and pharmacokinetics of a drug. This means higher drug

concentration can be achieved within tumors while reducing drug concentration in normal tissue [51]. Some disadvantages have been identified in the use of liposomes. Studies have shown that 50–80% of liposomes are adsorbed by the reticuloendothelial system (RES) and mainly by liver cells (Kupffer cells) within the first 15–30 min following intravenous administration [52, 53]. Other problems are related to their stability, poor batch-to-batch reproducibility, and difficulty with sterilization [54].

3.2.2. Polymeric

Polymeric nanoparticles systems are engineered from biocompatible and biodegradable polymers. Polymeric nanocarriers include micelles, dendrimers, and polymer-drug conjugates.

Many biodegradable polymers have been used to produce polymeric nanoparticles such as poly D L-lactic-co-glycolic acid (PLGA), poly D L-lactic acid (PLA), and poly ethylene glycol (PEG) [55]. Polysaccharides such as chitosan, alginate, and pectin have also been used to encapsulate these nanostructures [56, 57]. These nanoparticles are formulated through a self-assembly process using block copolymers with different hydrophilicity and consisting of two or more polymer chains [58]. Polymeric nanoparticles have been formulated to encapsulate either hydrophilic or hydrophobic drugs. This system facilitates surface modifications, and controlled pH- dependent controlled release [59]. A recent study revealed developed albumin-polymer conjugate nanoparticles of curcumin and demonstrated growth inhibition of three-dimensional LNCaP (epithelial cell line derived from a human prostate carcinoma) multicellular tumor spheroids when compared to native curcumin [60]. This result is an interesting option for controlled and target-based delivery.

Dendrimers are polymeric macromolecules with numerous arms extending from a center, resulting in a well-defined topological structure [61]. They have three main components: (1) a central core with two or more groups and repeated units attached to a central core called generations; (2) peripheral functional groups on the surface which determine the physicochemical properties of a dendrimer; (3) peripheral groups that can be modified to obtain both a charged hydrophilic and lipophilic function [62]. Dendrimers are appealing since they can be synthesized at various sizes, molecular weights, and chemical compositions [62]. With the modification of surface groups, interiors, and core, the properties of dendrimers can be optimized to obtain favorable physical characteristics, biodistribution, and receptor-mediated targeting. Dendrimers have shown promise for biomedical applications because they can be easily conjugated with targeting molecules, are biodegradable, biocompatible, and have high water solubility [63, 64]. A successful study using dendrimers was demonstrated in 2005 when methotrexate conjugated to poly-amidoamine (PAMAM) dendrimers resulted in a 10-fold reduction in tumor size compared with that achieved using free systemic methotrexate [60]. In spite of promising results, dendrimers are relatively expensive as compared to other nanoparticles and require many repetitive steps in order to be synthesized, presenting a challenge for large-scale production [65].

3.2.3. Inorganic

The iron oxide nanoparticles (IO) are classified based on their sizes as standard superparamagnetic iron oxide (SSPIOs) at 60–150 nm, superparamagnetic iron oxide (USPIO) 5–40 nm,

and ultra-small and monocrystalline iron oxide (MION) 10–30 nm. Magnetic nanosystem is attractive due to its ability to become magnetized after exposure to a magnetic field but does not retain permanent magnetization once the field is turned off. These nanoparticles need to be small so that they can be superparamagnetic in order to avoid agglomeration after stoppage of the magnetic field and remain in circulation without being removed by the immune system [36]. The IO can be degraded to Fe⁺ ions in the body in the acidic compartments of cells, for example, lysosomes, reducing the potential toxicity of nanoparticles (**Figure 2**). The magnetic flux density and permeability of exterior magnetic fields should be optimized to be strong enough to mediate penetration of nanoparticles across the biological barriers, and provide for sufficient accumulation at target sites while reducing risk to normal tissue [66, 67].

Gold nanoparticles have received attention due to their unique properties. These nanoparticles are easily synthesized and size can be readily controlled by turning the synthesis procedure [68]. These nanoparticle conjugates can exhibit increased targeting rapid transport kinetics, long circulatory half-life, size-enhanced tumor uptake, and biocompatibility. These nanoparticles represent one of the most stable and easily surface functionalized for molecular conjugation [69]. Gold is resistant to oxidation under ambient or physiological conditions, which permits interaction in the biological environment. The shape of gold nanoparticles has been demonstrated to penetrate the cell membrane. When functionalized, they can show increased binding affinity and targeting selectivity with multiple targeting groups as well as tumor selective uptake due to their size [69].

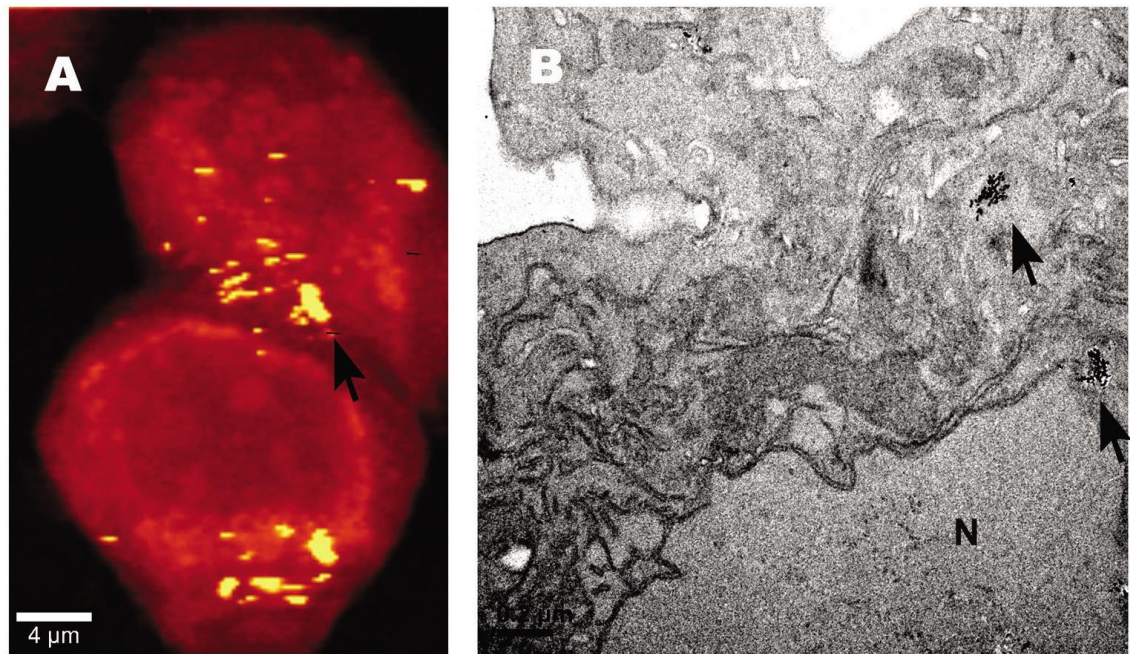


Figure 2. Intracellular occurrence of iron oxide nanoparticles in breast cancer cells analyzed through microscopy. (A) Representative confocal of Raman micrographs after digital contrast enhancement in MDA-MB-231 cells. (B) Ultra-micrographs from transmission electronic microscopic (TEM) in MCF-7 are shown. The cells were treated with 200 μ M iron oxide nanoparticles at 37°C for 24 and 6 h, respectively. The black arrow denotes accumulation of particles in the cytoplasm of tumor cells.

Inorganic nanocarriers have been used due to their physiochemical properties, such as chemical composition, size, shape, good stability, ease of functionalization, and higher surface-to-volume ratios. Inorganic nanoparticles include gold nanoparticles, magnetic nanomaterials, carbon nanotubes, silica nanoparticles, and quantum dots [49].

4. Tumor targeting and uptake

4.1. Types of targeting agents

Targeting agents can be broadly classified as proteins (mainly antibodies and their fragments), nucleic acids, peptides, aptamers, vitamins, and carbohydrates, and they may be conjugated to the carriers [70]. The surface marker should be overexpressed on target cells relative to normal cells. When targeting agents are used to deliver nanocarriers to cancer cells, it is essential that the agent binds with high selectivity to molecules that are uniquely expressed on the cell surface. Nanocarriers will recognize and bind to target cells through ligand-receptor interactions. The carriers are then internalized and the drug is released inside the cell [71]. The vitamin folic acid (folate) has also been used because folate receptors (FRs) are overexpressed in many tumor cells including kidney, ovarian, and endometrial cancer. The folate receptor is used to deliver drug conjugates to selectively accumulating drugs into cancer cell-mediated endocytosis [72]. One of the more commonly used ligands for cancer cells is transferrin (Tf) protein. Transferrin interacts with Tf receptors (TfRs), which are overexpressed in a range of tumor cells including lung, colon, pancreatic, and bladder cancers to increased metabolic rates [73]. Tf receptors binding directly to nanoparticles such as liposomes have resulted in improved intracellular delivery and therapeutic outcomes in animal tumor models [65, 74, 75]. Studies show that Tf is also used to facilitate small interfering RNAs (siRNA) delivery through transferrin receptors, allowing for antitumor activity [76]. Targeting receptors whose expression correlates with metabolic rate, such as folate and Tf, are also expressed in fast-growing healthy cells such as endothelial, epithelial, and fibroblasts cells, and this could lead to non-specific targeting and may increase toxicity and decrease drug efficiency [77].

4.2. Passive nanoparticle target

Nanoparticles circulating in the bloodstream can reach the neoplastic tissue by passive drug targeting through the enhanced permeation and retention effect (EPR) (**Figure 3**) [45, 78]. When a solid tumor reaches a certain size, the normal vasculature present in its early stage is not sufficient enough to provide the oxygen required for proliferation [79]. Because of this, the cells start to die and they secrete growth factors, which trigger angiogenesis, where budding of new blood vessels from the surrounding capillaries occurs, increasing their permeability. Angiogenesis in tumors is the process of rapid development of new, irregular blood vessels that present a discontinuous epithelium and lack the basal membrane of normal vascular structures [80, 81]. Fenestrations in the capillaries, depending on the location and tumor type, can reach sizes from 200 to 2000 nm. The fenestrations between endothelial cells facilitate the extravasation of nanocarriers from the surrounding vessels into the tumor [82]. The extracellular fluids are constantly drained into the lymphatic vessels, and this allows for the renewal

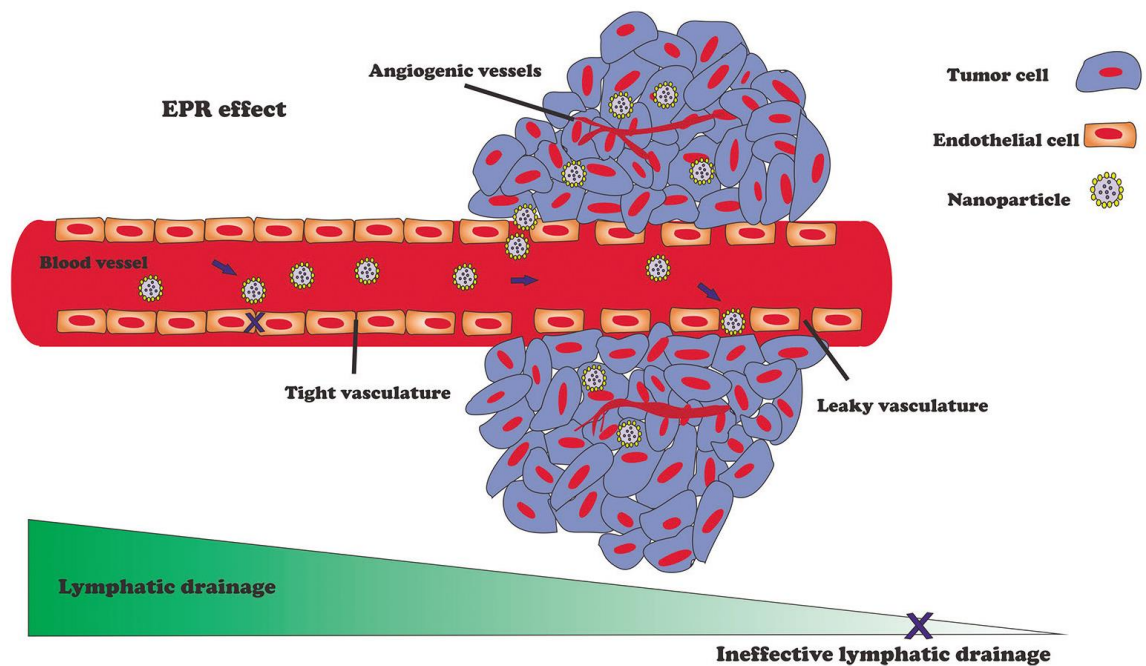


Figure 3. Schematic representation showing enhanced permeability and retention of nanoparticles in tumor.

of interstitial fluid and the recycling of extravagated solutes and colloids back to the circulation [83]. In tumors, the lymphatic function is defective and, consequently, the uptake of the interstitial fluid is minimal [84]. Free drugs may diffuse nonspecifically and a nanocarrier can extravasate into the leaky vessels of tumor tissues through the EPR effect. A study using liposomes of different sizes suggests that particles with a diameter of 200–300 nm are able to extravasate, whereas in another part of the same tumor, molecules only a few nanometers in size may have difficulty entering the interstitium [85]. The success of EPR effect depends on factors such as lymphatic drainage rate, blood flow that is different in various tumor types and degrees of capillary disorder.

4.3. Active nanoparticle target

Passive targeting is available only in certain types of tumors and does not, necessarily, insure internalization of nanocarriers by targeted cells. Nanocarriers can be engineered to attach targeting with selective agents to employ active targeting [86]. As previously described in topic 4.1, some of these agents include peptides [87], proteins [88], antibodies [89], and small organic molecules [90–92]. These agents are complementary to receptors that are overexpressed or present in tumor cells [93]. The objective of passive targeting is to increase interactions between nanoparticles and cells and to enhance internalization of drugs without altering biodistribution [94, 95]. Some physicochemical properties might also affect the efficacy of active targeting *in vitro* and *in vivo*. These properties, such as the size of nanoparticles [96], choice of the targeting ligand [97], and ligand density [98] may affect the efficacy of the active targeting of nanoparticles. The nonspecific binding of proteins during

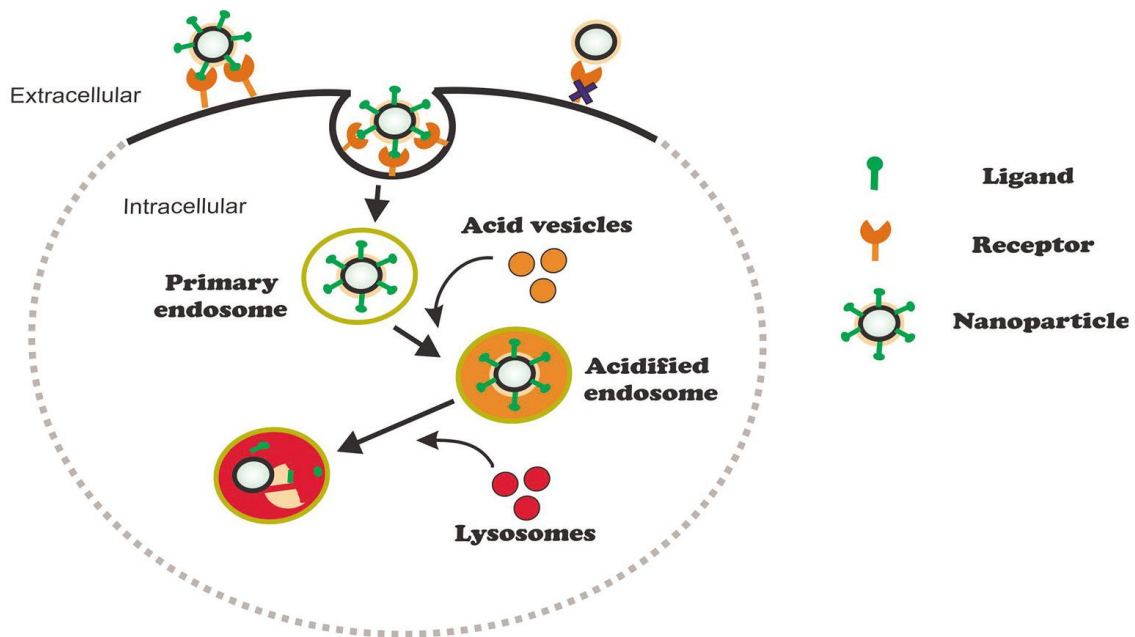


Figure 4. Cellular uptake mechanism. The ligand-coated nanoparticle binds to the membrane receptor, enters the cells by primary endosome, and then forms an acidified endosome. The enzymatic digestion of nanoparticles is done by fusion of lysosomes.

the nanoparticles dislocation through the blood stream and the administration route has been shown to affect the targeting ability of nanocarriers [99]. Active targeting can be used for controlled drug release applications, where the drug is released into the extracellular or intracellular environment. The targeting agents can be used to facilitate nanocarrier internalization into cells, primarily via endocytosis (**Figure 4**) [100].

5. Nanocarriers and multidrug resistance

Multidrug resistance (MDR) limits the potency of many chemotherapeutics can be classified into two types: acquired MDR that can be developed during traditional chemotherapy in common doses and intrinsic MDR that can be developed from preexisting resistance present in tumor cells. MDR is the decreased cell uptake and increased efflux of a drug. MDR transporters carry a variety of anticancer drugs out of cancer cells reducing the intracellular drug doses and produce resistance to chemotherapy [101]. If there is tumor recurrence, chemotherapy may fail because of residual drug-resistant cells dominating the tumor population [5]. Chemotherapy will kill only drug-sensitive cells that do not, or only mildly, express MDR transporters, leaving behind drug-resistant cells that overexpress MDR transporters. The main drug efflux transporters include P-glycoprotein (MDR1 or ABCB1), multidrug resistance-associated proteins (MRP1 or ABCC1), and the breast cancer resistance protein (ABCG2) [102–104]. To combat MDR, stimuli-responsive multifunctional nanoparticle-based drug delivery systems, which can deliver drugs into cells, release the drug in a specific site or

at a specific time. To overcome MDR, an optimal drug delivery system has to release drugs into cytoplasm rapidly and completely, leading to sufficiently high intracellular drug concentration to exceed drug efflux and limit concentration, in order to inhibit the proliferation of drug-resistant cancer cells and kill them. A study done using non-ionic copolymer with a hydrophobic core containing doxorubicin, called SP1049C, has been shown to circumvent p-glycoprotein-mediated drug resistance. The study was done on a mouse model of leukemia and it is currently in clinical evaluation. This study demonstrated the possibility of using nanocarriers to bypass MDR transporters [102, 105–107].

6. Preclinical and clinical trials for nanoparticles breast cancer therapy

The nanomedicine industry perspective toward oncology-based nanomedicinal therapeutics is very promising. The aim of these compounds to improve the therapeutic index of anticancer drugs by modifying their pharmacokinetics and tissue distribution to improve delivery to the site of action is well known and has also been demonstrated clinically. The first anticancer nanomedicine approved by the FDA in 1995, Doxil™/Caelyx™ [108], achieves a differential distribution of doxorubicin versus the free drug and is now approved for several applications, including breast cancer, based upon improved safety with equivalent or superior efficacy versus standard therapies.

Nanomedicines for breast cancer therapy or diagnosis in clinical development can be broadly divided into five main types: liposomes, polymeric conjugates, polymeric nanoparticles, polymeric micelles, and others. Examples of marketed anti-breast cancer nanomedicines and those in clinical development are summarized in **Table 1**.

Nanomedicine type	Drug	Product name/company	Indication	Phase
Liposomes	Doxorubicin	Myocet™/Teva UK	Metastatic Breast Cancer	Approved
	Paclitaxel	LEP—ETU/Insys	Breast cancer	Phase II
		EndoTAG-1/MediGene	Breast cancer	Phase II
Polymeric conjugates	Irinotecan	NKTR102 (PEG)/Nektar	Metastatic breast cancer	Phase III
Polymeric micelles	Paclitaxel	Genexol-PM™/Samyang Biopharmaceuticals	Breast cancer	Approved
	Docetaxel	Genexol-PM™/Samyang Biopharmaceuticals	Breast cancer (NSCLC, prostate, ovarian, head and neck, gastric, and esophageal cancer)	Marketed in South Korea
	Paclitaxel	NK105/NanoCarrier™	Breast cancer	Phase III
Other	Paclitaxel	Abraxane™/Celgene	Advanced breast cancer	Approved
	Phospholipid stabilized microbubble	SonoVue/Bracco Imaging	Ultrasound enhancement for breast and other cancers	Approved

Table 1. Clinically and preclinical nanoparticle for breast cancer therapies and diagnostics, grouped by their trial phases.

7. Conclusions

The choice of appropriate nanocarriers is a difficult one. It is important to understand the key nanoparticle features such as properties, size, targeting ligand, and charge to improve the design for oncology applications. Nanoparticle therapeutics has been used for many treatments of most cancers. Although the field of nanomedicine is developing rapidly, there are still a limited number of nanocarriers approved by the FDA and limited available clinical data. More clinical trials are required to better understand the advantages and disadvantages of nanoparticle therapeutics. Well-designed studies are important for development of these drugs. Further research is needed to develop new nanotherapeutics incorporating a variety of characteristics along with good experimental design in order to achieve improvements in treatments and nanoparticle targeting to overcome current limitations.

Acknowledgements

The authors gratefully acknowledge financial support from the National Council of Technological and Scientific Development (CNPq), Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES), Financing Agency of Studies and Projects (FINEP), and Foundation for Research Support of the Federal District (FAP-DF).

Author details

Márcia Rocha, Natalia Chaves and Sônia Bão*

*Address all correspondence to: snbao@unb.br

Department of Cell Biology, Institute of Biological Sciences, University of Brasília (UnB), Brasília, Brazil

References

- [1] Yezhelyev MV, Gao X, Xing Y, Al-Hajj A, Nie S, O'Regan RM. Emerging use of nanoparticles in diagnosis and treatment of breast cancer. *The Lancet Oncology*. 2007;7(8):657–67. DOI: 10.1016/S1470-2045(06)70793-8
- [2] Prabhakar U, Maeda H, Jain RK, Sevick-Muraca EM, Zamboni W, Farokhzad OC, et al. Challenges and key considerations of the enhanced permeability and retention effect for nanomedicine drug delivery in oncology. *Cancer Research*. 2013;73(8):2412–7. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-12-4561
- [3] Senkus E, Kyriakides S, Penault-Llorca F, Poortmans P, Thompson A, Zackrisson S, et al. Primary breast cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. In: *Annals of Oncology*; 2015;26(5)v8-v30 DOI: 10.1093/annonc/mdv298

- [4] Morris SA, Farrell D, Grodzinski P. Nanotechnologies in cancer treatment and diagnosis. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network*. 2014;**12**(12):1727–33. DOI: 10.4172/2155-9619.1000195
- [5] Koushik O, Rao Y, Kumar P, Karthikeyan R. Nano drug delivery systems to overcome cancer drug resistance—a review. *Journal of Nanomedicine and Nanotechnology*. 2016;**7**(378):2. DOI: 10.4172/2157-7439.1000378
- [6] Johnson R, Sabnis N, McConathy WJ, Lacko AG. The potential role of nanotechnology in therapeutic approaches for triple negative breast cancer. *Pharmaceutics*. 2013;**5**(2):353–70. DOI: 10.3390/pharmaceutics5020353
- [7] Ferrari M. Cancer nanotechnology: opportunities and challenges. *Nature Reviews Cancer*. 2005;**5**(3):161–71. DOI: 10.1038/nrc1566
- [8] Siegel RL, Miller KD, Jemal A. CA: Cancer statistics, 2016. *A Cancer Journal for Clinicians*. 2016;**77**(1):7–30. DOI: 10.3322/caac.21254
- [9] Howlader N, Noone AM, Krapcho M, Garshell J, Miller D, Altekruse SF, Kosary CL, Yu M, Ruhl J, Tatalovich Z, Mariotto A, Lewis DR, Chen HS, Feuer EJ, Cronin KA (eds). SEER Cancer Statistics Review, 1975–2012, SEER [Internet]. April 2015 [Updated: November 2014]. Available from: http://seer.cancer.gov/csr/1975_2012/ [Accessed: April 2015]
- [10] Berry DA, Cronin KA, Plevritis S, Fryback DG, Clarke L, Zelen M, et al. Effect of screening and adjuvant therapy on mortality from breast cancer. *Obstetrical & Gynecological Survey*. 2006;**61**(3):179–80. DOI: 10.1056/NEJMoa050518
- [11] Schmid D, Ricci C, Behrens G, Leitzmann M. Adiposity and risk of thyroid cancer: a systematic review and meta-analysis. *Obesity Reviews*. 2015;**16**(12):1042–54. DOI: 10.1111/obr.12321
- [12] Chlebowski RT, Rohan TE, Manson JE, Aragaki AK, Kaunitz A, Stefanick ML, et al. Breast cancer after use of estrogen plus progestin and estrogen alone: analyses of data from 2 women’s health initiative randomized clinical trials. *JAMA Oncology*. 2015;**1**(3):296–305. DOI: 10.1001/jamaoncol.2015.0494
- [13] van Nijnatten T, Schipper R, Lobbes M, Nelemans P, Beets-Tan R, Smidt M. The diagnostic performance of sentinel lymph node biopsy in pathologically confirmed node positive breast cancer patients after neoadjuvant systemic therapy: A systematic review and meta-analysis. *European Journal of Surgical Oncology (EJSO)*. 2015;**41**(10):1278–87. DOI: 10.1016/j.ejso.2015.07.020
- [14] Coates AS, Winer EP, Goldhirsch A, Gelber RD, Gnant M, Piccart-Gebhart M, et al. Tailoring therapies—improving the management of early breast cancer: St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2015. In: *Annals of Oncology*; 2015. 2015;**26**(8):1533–46. DOI: 10.1093/annonc/mdv221
- [15] Hartmann LC, Lindor NM. The role of risk-reducing surgery in hereditary breast and ovarian cancer. *New England Journal of Medicine*. 2016;**374**(5):454–68. DOI: 10.1056/NEJMra1503523

- [16] Curran J. How effective is mammography in detecting breast cancer recurrence in women after Breast Conservation Therapy (BCT)—A systematic literature review. *Radiography*. 2016; DOI: 10.1016/j.radi.2016.02.001.
- [17] Sweldens C, Peeters S, van Limbergen E, Janssen H, Laenen A, Patil S, et al. Local relapse after breast-conserving therapy for ductal carcinoma in situ: a European single-center experience and external validation of the Memorial Sloan-Kettering Cancer Center DCIS nomogram. *The Cancer Journal*. 2014;**20**(1):1–7. DOI: 10.1097/PPO.0000000000000025
- [18] van Dongen JA, Voogd AC, Fentiman IS, Legrand C, Sylvester RJ, Tong D, et al. Long-term results of a randomized trial comparing breast-conserving therapy with mastectomy: European Organization for Research and Treatment of Cancer 10801 trial. *Journal of the National Cancer Institute*. 2000;**92**(14):1143–50. DOI: 10.1093/jnci/92.14.1143
- [19] Guarneri V, Dieci MV, Frassoldati A, Maiorana A, Ficarra G, Bettelli S, et al. Prospective biomarker analysis of the randomized CHER-LOB study evaluating the dual anti-HER2 treatment with trastuzumab and lapatinib plus chemotherapy as neoadjuvant therapy for HER2-positive breast cancer. *The Oncologist*. 2015;**20**(9):1001–10. DOI: 10.1634/theoncologist.2015-0138
- [20] Lu R-M, Chen M-S, Chang D-K, Chiu C-Y, Lin W-C, Yan S-L, et al. Targeted drug delivery systems mediated by a novel peptide in breast cancer therapy and imaging. *PLoS One*. 2013;**8**(6):e66128. DOI: 10.1371/journal.pone.0066128
- [21] Heldin C-H, Rubin K, Pietras K, Östman A. High interstitial fluid pressure—an obstacle in cancer therapy. *Nature Reviews Cancer*. 2004;**4**(10):806–13. DOI: 10.1038/nrc1456
- [22] Trédan O, Galmarini CM, Patel K, Tannock IF. Drug resistance and the solid tumor microenvironment. *Journal of the National Cancer Institute*. 2007;**99**(19):1441–54. DOI: 10.1093/jnci/djm135
- [23] Hida K, Maishi N, Sakurai Y, Hida Y, Harashima H. Heterogeneity of tumor endothelial cells and drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2016;**99**:140–7. DOI: 10.1016/j.addr.2015.11.008
- [24] Bosslet K, Straub R, Blumrich M, Czech J, Gerken M, Sperker B, et al. Elucidation of the mechanism enabling tumor selective prodrug monotherapy. *Cancer Research*. 1998;**58**(6):1195–201. DOI: 10.1128/JB.01028-09 J
- [25] Primeau AJ, Rendon A, Hedley D, Lilge L, Tannock IF. The distribution of the anticancer drug Doxorubicin in relation to blood vessels in solid tumors. *Clinical Cancer Research*. 2005;**11**(24):8782–8. DOI: 10.1158/1078-0432
- [26] Minchinton AI, Tannock IF. Drug penetration in solid tumours. *Nature Reviews Cancer*. 2006;**6**(8):583–92. DOI: 10.1038/nrc1893
- [27] Maeda H, Nakamura H, Fang J. The EPR effect for macromolecular drug delivery to solid tumors: Improvement of tumor uptake, lowering of systemic toxicity, and distinct tumor imaging in vivo. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2013;**65**(1):71–9. DOI: 10.1016/j.addr.2012.10.002

- [28] Al-Abd AM, Aljehani ZK, Gazzaz RW, Fakhri SH, Jabbad AH, Alahdal AM, et al. Pharmacokinetic strategies to improve drug penetration and entrapment within solid tumors. *Journal of Controlled Release*. 2015;**219**:269–77. DOI: 10.1016/j.jconrel.2015.08.055
- [29] Khawar IA, Kim JH, Kuh H-J. Improving drug delivery to solid tumors: priming the tumor microenvironment. *Journal of Controlled Release*. 2015;**201**:78–89. DOI: 10.1016/j.jconrel.2014.12.018
- [30] Rebutti M, Michiels C. Molecular aspects of cancer cell resistance to chemotherapy. *Biochemical Pharmacology*. 2013;**85**(9):1219–26. DOI: 10.1016/j.bcp.2013.02.017
- [31] Mimeault M, Mehta PP, Hauke R, Batra SK. Functions of normal and malignant prostatic stem/progenitor cells in tissue regeneration and cancer progression and novel targeting therapies. *Endocrine Reviews*. 2008;**29**(2):234–52. DOI: 10.1210/er.2007-0040
- [32] Shah V, Taratula O, Garbuzenko OB, Taratula OR, Rodriguez-Rodriguez L, Minko T. Targeted nanomedicine for suppression of CD44 and simultaneous cell death induction in ovarian cancer: an optimal delivery of siRNA and anticancer drug. *Clinical Cancer Research*. 2013;**19**(22):6193–204. DOI: 10.1158/1078-0432
- [33] Dreher MR, Liu W, Michelich CR, Dewhirst MW, Yuan F, Chilkoti A. Tumor vascular permeability, accumulation, and penetration of macromolecular drug carriers. *Journal of the National Cancer Institute*. 2006;**98**(5):335–44. DOI: 10.1093/jnci/djj070
- [34] Heidel JD, Mark E. Davis. Clinical developments in nanotechnology for cancer therapy. *Pharmaceutical Research*. 2011;**28**(2):187–199. DOI: 10.1007/s11095-010-0178-7
- [35] Perrault SD, Walkey C, Jennings T, Fischer HC, Chan WC. Mediating tumor targeting efficiency of nanoparticles through design. *Nano Letters*. 2009;**9**(5):1909–15. DOI: 10.1021/nl900031y
- [36] Russ Knapp FF, Ashutosh D. Therapeutic radiopharmaceuticals for cancer therapy. In: *Radiopharmaceuticals for Therapy*. Springer (India) Pvt. Ltd., New Delhi, India; 2016. p. 167. DOI: 10.1007/978-81-322-2607-9
- [37] Barua S, Yoo J-W, Kolhar P, Wakankar A, Gokarn YR, Mitragotri S. Particle shape enhances specificity of antibody-displaying nanoparticles. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2013;**110**(9):3270–5. DOI: 10.1073/pnas.1216893110
- [38] Zhao T, Liu Y, Gao Z, Gao D, Li N, Bian Y, et al. Self-assembly and cytotoxicity study of PEG-modified ursolic acid liposomes. *Materials Science and Engineering: C*. 2015;**53**:196–203. DOI: 10.1016/j.msec.2015.04.022
- [39] Schluep T, Hwang J, Hildebrandt IJ, Czernin J, Choi CHJ, Alabi CA, et al. Pharmacokinetics and tumor dynamics of the nanoparticle IT-101 from PET imaging and tumor histological measurements. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2009;**106**(27):11394–9. DOI: 10.1073/pnas.0905487106

- [40] Choi CHJ, Alabi CA, Webster P, Davis ME. Mechanism of active targeting in solid tumors with transferrin-containing gold nanoparticles. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2010;**107**(3):1235–40. DOI: 10.1073/pnas.0914140107
- [41] Zahr AS, Davis CA, Pishko MV. Macrophage uptake of core-shell nanoparticles surface modified with poly (ethylene glycol). *Langmuir*. 2006;**22**(19):8178–85. DOI: 10.1021/la060951b
- [42] Alexandre Albanese, Peter S. Tang, and Warren C.W. Chan. The Effect of Nanoparticle Size, Shape, and Surface Chemistry on Biological Systems. In: April 18, 2012; Canada: Biomedical Engineering; 2012. p. 1–16. DOI: 10.1146/annurev-bioeng-071811-150124
- [43] Tsuchiya K, Nitta N, Sonoda A, Nitta-Seko A, Ohta S, Takahashi M, et al. Evaluation of atherosclerotic lesions using dextran-and mannan–dextran-coated USPIO: MRI analysis and pathological findings. *International Journal of Nanomedicine*. 2012;**7**:2271. DOI: 10.2147/IJN.S29417
- [44] Gregory AE, Williamson D, Titball R. Vaccine delivery using nanoparticles. *Frontiers in cellular and infection microbiology*. 2013;**3**(13):1–13 10.3389/fcimb.2013.00013. DOI: 10.3389/fcimb
- [45] Duncan R. The dawning era of polymer therapeutics. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2003;**2**(5):347–60. DOI: 1038/nrc1958
- [46] Lavan DA, McGuire T, Langer R. Small-scale systems for in vivo drug delivery. *Nature Biotechnology*. 2003;**21**(10):1184–91. DOI: 10.1038/nbt876
- [47] Bangham AD, Horne R. Negative staining of phospholipids and their structural modification by surface-active agents as observed in the electron microscope. *Journal of Molecular Biology*. 1964;**8**(5):660IN2-8IN10. DOI: 10.1016/S0022-2836(64)80115-7
- [48] Forssen EA, Ross ME. Daunoxome® treatment of solid tumors: preclinical and clinical investigations. *Journal of Liposome Research*. 1994;**4**(1):481–512. DOI: 10.3109/08982109409037058
- [49] Bangham A. Liposomes: the Babraham connection. *Chemistry and Physics of Lipids*. 1993;**64**(1):275–85. DOI: 10.1016/0009-3084(93)90071-A
- [50] Torchilin VP. Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2005;**4**(2):145–60. DOI: 10.1038/nrd1632
- [51] Wang AZ, Langer R, Farokhzad OC. Nanoparticle delivery of cancer drugs. *Annual Review of Medicine*. 2012;**63**:185–98. DOI: 10.1146/annurev-med-040210-162544
- [52] Laverman P, Carstens MG, Boerman OC, Dams ETM, Oyen WJ, van Rooijen N, et al. Factors affecting the accelerated blood clearance of polyethylene glycol-liposomes upon repeated injection. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2001;**198**(2):607–12.

- [53] Litzinger DC, Buiting AM, van Rooijen N, Huang L. Effect of liposome size on the circulation time and intraorgan distribution of amphipathic poly (ethylene glycol)-containing liposomes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*. 1994;**1190**(1):99–107. DOI: 10.1016/0005-2736(94)90038-8.
- [54] Allen T, Hansen C. Pharmacokinetics of stealth versus conventional liposomes: effect of dose. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*. 1991;**1068**(2):133–41. DOI: 10.1016/0005-2736(91)90201-I
- [55] Kumari A, Yadav SK, Yadav SC. Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2010;**75**(1):1–18. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2009.09.001
- [56] Arora D, Sharma N, Sharma V, Abrol V, Shankar R, Jaglan S. An update on polysaccharide-based nanomaterials for antimicrobial applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2016;**100**(6):2603–2603. DOI: 10.1007/s00253-016-7315-0
- [57] Ankit S, Chetan N, Noor A, Prem NG. Recent advances in chitosan-based nanomedicines for cancer chemotherapy. In: Pradip Kumar Dutta, editor. *Chitin and Chitosan for Regenerative Medicine*. India: Springer; 2016. p. 229–259. DOI: 10.1007/978-81-322-2511-9_9
- [58] Gu F, Zhang L, Teply BA, Mann N, Wang A, Radovic-Moreno AF, et al. Precise engineering of targeted nanoparticles by using self-assembled biointegrated block copolymers. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2008;**105**(7):2586–91. DOI: 10.1073/pnas.0711714105.
- [59] Lo Y-L, Sung K-H, Chiu C-C, Wang L-F. Chemically conjugating polyethylenimine with chondroitin sulfate to promote CD44-mediated endocytosis for gene delivery. *Molecular pharmaceutics*. 2013;**10**(2):664–76. DOI: 10.1021/mp300432s
- [60] Jiang Y, Lu H, Dag A, Hart-Smith G, Stenzel MH. Albumin–polymer conjugate nanoparticles and their interactions with prostate cancer cells in 2D and 3D culture: comparison between PMMA and PCL. *Journal of Materials Chemistry B*. 2016;**4**(11):2017–27. DOI: 10.1039/C5TB02576A
- [61] Satija J, Gupta U, Jain NK. Pharmaceutical and biomedical potential of surface engineered dendrimers. *Critical Reviews™ in Therapeutic Drug Carrier Systems*. 2007;**24**(3): 257–306. DOI: 10.1615/CritRevTherDrugCarrierSyst.v24.i3.20
- [62] Bai S, Thomas C, Rawat A, Ahsan F. Recent progress in dendrimer-based nanocarriers. *Critical Reviews™ in Therapeutic Drug Carrier Systems*. 2006;**23**(6):437–495. DOI: 10.1615/CritRevTherDrugCarrierSyst.v23.i6.10
- [63] Khandare J, Calderón M. Dendritic polymers for smart drug delivery applications. *Nanoscale*. 2015;**7**(9):3806–7. DOI: 10.1039/C5NR90030A
- [64] Malik N, Wiwattanapatapee R, Klopsch R, Lorenz K, Frey H, Weener J, et al. Dendrimers: Relationship between structure and biocompatibility in vitro, and preliminary studies on the biodistribution of ¹²⁵I-labelled polyamidoamine dendrimers in vivo. *Journal of Controlled Release*. 2000;**65**(1):133–48. DOI: 10.1016/S0168-3659(99)00246-1

- [65] Kukowska-Latallo JF, Candido KA, Cao Z, Nigavekar SS, Majoros IJ, Thomas TP, et al. Nanoparticle targeting of anticancer drug improves therapeutic response in animal model of human epithelial cancer. *Cancer Research*. 2005;**65**(12):5317–24. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-04-3921i.
- [66] Lee D-E, Koo H, Sun I-C, Ryu JH, Kim K, Kwon IC. Multifunctional nanoparticles for multimodal imaging and theragnosis. *Chemical Society Reviews*. 2012;**41**(7):2656–72. DOI: 10.1039/c2cs15261d
- [67] Thorek DL, Tsourkas A. Size, charge and concentration dependent uptake of iron oxide particles by non-phagocytic cells. *Biomaterials*. 2008;**29**(29):3583–90. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2008.05.015
- [68] Das M, Mohanty C, Sahoo SK. Ligand-based targeted therapy for cancer tissue. Expert opinion on drug delivery. 2009;**6**(3):285–304. DOI: 10.1007/s13530-011-0109-y
- [69] Ying X, Wen H, Lu W-L, Du J, Guo J, Tian W, et al. Dual-targeting daunorubicin liposomes improve the therapeutic efficacy of brain glioma in animals. *Journal of Controlled Release*. 2010;**141**(2):183–92. DOI: 10.1016/j.jconrel.2009.09.020.
- [70] Shi J, Xiao Z, Kamaly N, Farokhzad OC. Self-assembled targeted nanoparticles: evolution of technologies and bench to bedside translation. *Accounts of Chemical Research*. 2011;**44**(10):1123–34. DOI: 10.1021/ar200054n
- [71] Liang C, Yang Y, Ling Y, Huang Y, Li T, Li X. Improved therapeutic effect of folate-decorated PLGA-PEG nanoparticles for endometrial carcinoma. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 2011;**19**(13):4057–66. DOI: 10.1016/j.bmc.2011.05.016
- [72] Peer D, et al. Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy. *Nature Nanotechnology*. 2007;**2**(12):751–760. DOI: 10.1038/nnano.2007.387
- [73] Vidal J-M, Koulibaly M, Jost J-L, Duron J-J, Chigot J-P, Vayre P, et al. Differential transferrin receptor density in human colorectal cancer: a potential probe for diagnosis and therapy. *International Journal of Oncology*. 1998;**13**:871–5. DOI: 10.3892/ijo.13.4.871
- [74] Iinuma H, Maruyama K, Okinaga K, Sasaki K, Sekine T, Ishida O, et al. Intracellular targeting therapy of cisplatin-encapsulated transferrin-polyethylene glycol liposome on peritoneal dissemination of gastric cancer. *International Journal of Cancer*. 2002;**99**(1):130–7. DOI: 10.1002/ijc.10242.
- [75] Ishida O, Maruyama K, Tanahashi H, Iwatsuru M, Sasaki K, Eriguchi M, et al. Liposomes bearing polyethyleneglycol-coupled transferrin with intracellular targeting property to the solid tumors in vivo. *Pharmaceutical Research*. 2001;**18**(7):1042–8. DOI: 10.1023/A:1010960900254
- [76] Cinci M, Mamidi S, Li W, Fehring V, Kirschfink M. Targeted delivery of siRNA using transferrin-coupled lipoplexes specifically sensitizes CD71 high expressing malignant cells to antibody-mediated complement attack. *Targeted Oncology*. 2015;**10**(3):405–13. DOI: 10.1007/s11523-014-0345-6

- [77] Ekblom P, Thesleff I, Lehto VP, Virtanen I. Distribution of the transferrin receptor in normal human fibroblasts and fibrosarcoma cells. *International Journal of Cancer*. 1983;**31**(1):111–7. DOI: 10.1002/ijc.2910310118
- [78] Matsumura Y, Maeda H. A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: mechanism of tumoritropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs. *Cancer Research*. 1986;**46**(12 Part 1):6387–92.
- [79] Bates D, Hillman N, Williams B, Neal C, Pocock T. Regulation of microvascular permeability by vascular endothelial growth factors. *Journal of Anatomy*. 2002;**200**(6):581–97. DOI: 10.1046/j.1469-7580.2002.066.x.
- [80] Jain RK. The next frontier of molecular medicine: delivery of therapeutics. *Nature Medicine*. 1998;**5**(6):655–7. DOI: 10.1038/nm0698-655.
- [81] Jain RK, Stylianopoulos T. Delivering nanomedicine to solid tumors. *Nature Reviews Clinical Oncology*. 2010;**7**(11):653–54. DOI: 10.1038/nrclinonc.2010.139
- [82] Hobbs SK, Monsky WL, Yuan F, Roberts WG, Griffith L, Torchilin VP, et al. Regulation of transport pathways in tumor vessels: role of tumor type and microenvironment. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1998;**95**(8):4607–12. DOI: 10.1146/annurev-physiol-021909-135833
- [83] Swartz MA, Fleury ME. Interstitial flow and its effects in soft tissues. *Annual Review of Biomedical Engineering*. 2007;**9**:229–56. DOI: 10.1146/annurev.bioeng.9.060906.151850
- [84] Padera TP, Stoll BR, Tooredman JB, Capen D, di Tomaso E, Jain RK. Pathology: cancer cells compress intratumour vessels. *Nature*. 2004;**427**(6976):695. DOI: 10.1038/427695a
- [85] Farokhzad OC, Langer R. Impact of nanotechnology on drug delivery. *ACS Nano*. 2009;**3**(1):16–20. DOI: 10.1021/nn900002m
- [86] Lammers T, Kiessling F, Hennink WE, Storm G. Drug targeting to tumors: principles, pitfalls and (pre-) clinical progress. *Journal of Controlled Release*. 2012;**161**(2):175–87. DOI: 10.1016/j.jconrel.2011.09.063
- [87] Gunn J, Wallen H, Veisoh O, Sun C, Fang C, Cao J, et al. A multimodal targeting nanoparticle for selectively labeling T cells. *Small*. 2008;**4**(6):712–5. DOI: 10.1002/smll.200701103
- [88] Jun Y-w, Huh Y-M, Choi J-s, Lee J-H, Song H-T, Kim S, et al. Nanoscale size effect of magnetic nanocrystals and their utilization for cancer diagnosis via magnetic resonance imaging. *Journal of the American Chemical Society*. 2005;**127**(16):5732–3. DOI: 10.1021/ja0422155
- [89] Zhang Y, Kohler N, Zhang M. Surface modification of superparamagnetic magnetite nanoparticles and their intracellular uptake. *Biomaterials*. 2002;**23**(7):1553–61. DOI: 10.1016/S0142-9612(01)00267-8.
- [90] Kohler N, Sun C, Wang J, Zhang M. Methotrexate-modified superparamagnetic nanoparticles and their intracellular uptake into human cancer cells. *Langmuir*. 2005;**21**(19):8858–64. DOI: 10.1021/la0503451

- [91] Sun C, Sze R, Zhang M. Folic acid-PEG conjugated superparamagnetic nanoparticles for targeted cellular uptake and detection by MRI. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 2006;**18**(3):550–7. DOI: 10.1002/jbm.a.30781
- [92] Kamaly N, Xiao Z, Valencia PM, Radovic-Moreno AF, Farokhzad OC. Targeted polymeric therapeutic nanoparticles: design, development and clinical translation. *Chemical Society Reviews*. 2012;**41**(7):2971–3010. DOI: 10.1039/c2cs15344k
- [93] Byrne JD, Betancourt T, Brannon-Peppas L. Active targeting schemes for nanoparticle systems in cancer therapeutics. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2008;**60**(15):1615–26. DOI: 10.1016/j.addr.2008.08.005
- [94] Alexis F, Pridgen E, Molnar LK, Farokhzad OC. Factors affecting the clearance and biodistribution of polymeric nanoparticles. *Molecular Pharmaceutics*. 2008;**5**(4):505–15. DOI: 10.1021/mp800051m
- [95] Monopoli MP, Åberg C, Salvati A, Dawson KA. Biomolecular coronas provide the biological identity of nanosized materials. *Nature Nanotechnology*. 2012;**7**(12):779–86. DOI: 10.1038/nnano.2012.207
- [96] Valencia PM, Hanewich-Hollatz MH, Gao W, Karim F, Langer R, Karnik R, et al. Effects of ligands with different water solubilities on self-assembly and properties of targeted nanoparticles. *Biomaterials*. 2011;**32**(26):6226–33. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2011.04.078
- [97] Sinha R, Kim GJ, Nie S, Shin DM. Nanotechnology in cancer therapeutics: bioconjugated nanoparticles for drug delivery. *Molecular Cancer Therapeutics*. 2006;**5**(8):1909–17. DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-06-0141
- [98] Montet X, Weissleder R, Josephson L. Imaging pancreatic cancer with a peptide-nanoparticle conjugate targeted to normal pancreas. *Bioconjugate Chemistry*. 2006;**17**(4):905–11. DOI: 10.1021/bc060035
- [99] Jiang W, Kim BY, Rutka JT, Chan WC. Nanoparticle-mediated cellular response is size-dependent. *Nature Nanotechnology*. 2008;**3**(3):145–50. DOI: 10.1038/nnano.2008.30
- [100] Veisheh O, Gunn JW, Zhang M. Design and fabrication of magnetic nanoparticles for targeted drug delivery and imaging. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2010;**62**(3):284–304. DOI: 10.1016/j.addr.2009.11.002
- [101] Samaddar JS, Gaddy VT, Duplantier J, Thandavan SP, Shah M, Smith MJ, et al. A role for macroautophagy in protection against 4-hydroxytamoxifen-induced cell death and the development of antiestrogen resistance. *Molecular Cancer Therapeutics*. 2008;**7**(9):2977–87. DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-08-0447
- [102] Van Veen HW, Konings WN. The ABC family of multidrug transporters in microorganisms. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*. 1998;**1965**(1):31–6. DOI: 10.1016/S0005-2728(98)00039-5
- [103] Loo TW, Clarke DM. Molecular dissection of the human multidrug resistance P-glycoprotein. *Biochemistry and Cell Biology*. 1999;**77**(1):11–23. DOI: 10.1139/o99-014

- [104] Natarajan K, Xie Y, Baer MR, Ross DD. Role of breast cancer resistance protein (BCRP/ ABCG2) in cancer drug resistance. *Biochemical Pharmacology*. 2012;**83**(8):1084–103. DOI: 10.1016/j.bcp.2012.01.002
- [105] Peer D, Margalit R. Fluoxetine and reversal of multidrug resistance. *Cancer Letters*. 2006;**237**:180–7. DOI: 10.1016/j.canlet.2005.06.003
- [106] Haran G, Cohen R, Bar LK, Barenholz Y. Transmembrane ammonium sulfate gradients in liposomes produce efficient and stable entrapment of amphipathic weak bases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*. 1993;**1151**(2):201–12. DOI: 10.1016/0005-2736(93)90105-9.
- [107] Gabizon AA, Shmeeda H, Zalipsky S. Pros and cons of the liposome platform in cancer drug targeting. *Journal of Liposome Research*. 2006;**16**(3):175–83. DOI: 10.1080/08982100600848769
- [108] Barenholz YC. Doxil®—the first FDA-approved nano-drug: lessons learned. *Journal of Controlled Release*. 2012;**160**(2):117–34. DOI: 10.1016/j.jconrel.2012.03.020

INTECH

