



Universidade de Brasília - UnB
Instituto de Ciências Biológicas/IB
Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal – PPG BioAni

GIOVANNA DE CARVALHO NARDELI BASILIO LÔBO

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTITUMORAL
DE *NANORODS* DE ÓXIDO DE COBRE EM
TUMORES DE MAMA

Brasília

2022

Giovanna de Carvalho Nardeli Basílio Lôbo

Avaliação do potencial antitumoral de *nanorods* de óxido de cobre em tumores de mama

Orientadora: Profa. Dra. Sônia Nair Bão

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Mestre em Biologia Animal.

Brasília
2022

Giovanna de Carvalho Nardeli Basílio Lôbo

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade de Brasília, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Mestre em Biologia Animal.

Aprovada em __/__/__

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Sônia Nair Bão (Presidente)

Prof. Dr. Luís Alexandre Muehlmann (Membro Titular)

Prof. Dr. Aparecido Ribeiro de Souza (Membro Titular)

Profa. Dra. Laise Rodrigues de Andrade (Membro Suplente)

Dedico este trabalho a minha família por serem meu alicerce, apoiando-me nos meus sonhos e oferecendo todos os recursos necessários para minha formação. Rose, Paulo e Giulia, vocês são minha força e inspiração e sem vocês eu nada seria!

Agradecimentos

À Deus.

Aos meus pais Rose e Paulo, a quem eu dedico todo o meu amor e a minha imensa gratidão. Por depositarem tanta confiança e apoiarem as minhas empreitadas da vida. Por sonharem esse mestrado junto comigo e por sempre me darem força e afago nos momentos obscuros! Vocês são minha inspiração e sou muito privilegiada pela educação e estrutura familiar que vocês me proporcionaram.

À minha amada irmã Giulia, por me mostrar que a vida sempre tem várias perspectivas e que se você tiver força de vontade tudo é possível.

Ao meu amor Gabriel, dedico não somente este trabalho, como dedico todo o meu coração. Obrigada pelas palavras doces nos meus momentos de anseios e aflições, por ser minha calma nas tempestades. Por preencher a minha vida com amor, luz e alegria e pelo imenso apoio nos meus sonhos. A vida é melhor com você ao meu lado.

Ao meu doce amigo Mateus Coutinho, que apesar de ter entrado na minha vida na reta final do mestrado, foi meu confidente nos dias em que eu me sentia insuficiente e sempre escutava com atenção as minhas indagações.

À minha orientadora Profa. Dra. Sônia Nair Bão, pela orientação, oportunidade e acolhimento em seu laboratório. Levo comigo todos os ensinamentos e admiração pelo seu trabalho. Obrigada pela disponibilidade em sanar minhas dúvidas e pelos momentos maravilhosos de descontração.

Ao Prof. Dr. Leonardo Giordano Paterno, por desenvolver este projeto comigo, pela resiliência quando eu estava desacreditada e pelos conselhos nos momentos difíceis. Agradeço também ao Laboratório de Pesquisa em Polímeros e Nanomateriais e ao aluno Mateus Sales.

Ao meu melhor amigo Rafael Martins, agradeço pela compreensão nas minhas ausências, pelas palavras gentis nos momentos de ansiedade e por permanecer ao meu lado em mais uma fase importante da minha vida. Você foi meu alicerce e apoio nesse momento decisivo e sei que em qualquer fase ou situação você estará comigo.

À minha grande amiga Melissa Monteiro, dedico este trabalho e minha eterna amizade, este sonho foi possível por causa de você. Obrigada por me acolher e me ensinar tudo o que eu sei sobre pesquisa, acredito que todos na vida deveriam ter a sorte de conhecer alguém como você. Espero de todo meu coração que nossa amizade ultrapasse as paredes da Universidade de Brasília, você foi meu maior apoio e eu levarei comigo todos os momentos bons e ruins que passamos juntas. Tenho um imenso orgulho da pesquisadora competente que você é e desejo que você conquiste tudo o que almejar. Eu sempre estarei ao seu lado.

À Ana Luísa Gouvea, por ser uma amiga maravilhosa, pelos conselhos e por acreditar em mim quando eu não acreditava. Obrigada pelo ensinamento e empenho demonstrado na realização dos ensaios experimentais, por compartilhar um pouco das suas vivências e experiências e pelas discussões acerca do meu trabalho de forma tão didática! Espero levar um pedacinho de você sempre comigo.

À Ingrid Gracielle e Karine Brenda, obrigada pelos conselhos e por me manterem com o pé no chão. Obrigada pela dedicação, suporte, generosidade e acima de tudo pelas críticas construtivas, pois só assim eu pude aprender e evoluir.

Ao Laboratório de Microscopia e Microanálise e todos os excelentes pesquisadores que nele integram (Amada, Marina Mesquita, Laís, Marina Radicchi, Victor Mello, Victor Rocha, Ariane Pandolfo, Ana Beatriz, Leidiane Moraes e Luís Medeiros) por sofrerem comigo, por me darem apoio e contribuírem de forma significativa com o meu trabalho. Todos vocês foram um divisor de águas na minha vida e os grandes responsáveis por tornarem os meus dias mais leves e divertidos.

Ao Grupo “Plastic Bags” por serem compostos de pessoas tão incríveis que me ajudaram, me questionaram e sempre tiveram interesse em ouvir o meu trabalho. Obrigada pelas trocas de experiências e por todos os momentos de risadas. Levo com muito carinho cada um de vocês.

À minha psicóloga, Janis Lohara por me ouvir, me aconselhar e por me mostrar a vida em outras perspectivas em todas as nossas sessões. Este trabalho foi muito leve e desenvolto graças a você.

Ao meu Parisiense favorito João Paulo Braz, que mesmo estando do outro lado do Atlântico sempre me ligava para saber como estava o andamento do meu projeto e me preenchia com sua alegria e leveza e nas palavras gentis e de apoio.

À CAPES, às agências de fomento – CNPq, FINEP, FAPDF e ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal pelo financiamento deste trabalho. À Universidade de Brasília, que foi minha segunda casa por 3 anos e proporcionou momentos inesquecíveis.

“O que é ciência afinal? Nós começamos confusos e terminamos confusos em um nível mais alto.”

(David John Chalmers)

RESUMO

O câncer, sendo um conjunto de doenças responsáveis pela segunda maior causa de morte global, é um dos principais problemas de saúde pública atualmente. O câncer de mama, apresenta a letalidade mais elevada quando comparado aos demais tipos de cânceres e se destaca principalmente em mulheres. O diagnóstico precoce em conjunto com a melhor escolha de alternativas terapêuticas é fundamental para o sucesso do tratamento. A nanotecnologia vem sendo desenvolvida e ganhando destaque para o diagnóstico precoce, entrega direcionada e biocompatibilidade celular. Com isso, o presente trabalho sugere a avaliação do potencial anti-tumoral de *nanorods* de óxido de cobre funcionalizados com citrato (CuO-nr cit) para o tratamento de câncer de mama. Foram utilizadas duas diferentes linhagens de carcinoma mamário humano (MCF-7 e MDA-MB-231) e uma linhagem de origem epitelial de glandula mamária humano não tumoral (MCF10A). As CuO-nr foram obtidas por hidrólise alcalina de cloreto de cobre com hidróxido de sódio e funcionalização posterior com citrato de sódio. As CuO-nr cit apresentaram comprimento médio de $41,45 \pm 0,47$ nm e largura média de $13,99 \pm 0,31$ nm (razão de aspecto ~3), diâmetro hidrodinâmico de $107,1 \pm 0,67$ nm e potencial zeta de $-23,8 \pm -1,87$ mV. Nos estudos *in vitro* a linhagem MCF-7 apresentou uma redução significativa (~60%) da viabilidade celular após tratamento com CuO-nr cit, fato não observado na linhagem não tumoral (MCF10A) (~50%) e na linhagem tumoral MDA-MB-231 (~50%). Pode-se observar por microscopia eletrônica de varredura e de luz a alteração da morfologia celular das células tratadas com CuO-nr cit como diminuição do número de células aderidas, redução do tamanho celular e perda dos pontos focais de adesão e projeções citoplasmáticas características nas linhagens tumorais em comparação com a linhagem não tumoral. Por citometria de fluxo foi possível observar que a morte celular lítica são os principais tipos de morte celular. No ensaio de ciclo celular CuO-nr cit interfere na fase S do ciclo na linhagem MCF-7. Os estudos realizados evidenciam que CuO-nr cit mostrou-se promissor para tratamento de câncer de mama.

Palavras chave: câncer de mama; nanotecnologia; nanopartículas de óxido de cobre

ABSTRACT

Cancer, being a set disease responsible for the second leading cause of global death, is one of the main public health problems today. Breast cancer has the highest lethality when compared to other types of cancer and stands out mainly in women. Early diagnosis together with the best choice of therapeutic alternatives is essential for successful treatment. Nanotechnology has been developed and gaining prominence for early diagnosis, targeted delivery and cell biocompatibility. Thus, the present work suggests the evaluation of the antitumor potential of copper oxide nanorods functionalized with citrate (CuO-nr cit) for the treatment of breast cancer. Two different strains of human mammary carcinoma (MCF-7 and MDA-MB-231) and a strain of tumorous human mammary gland epithelial origin (MCF10A) were used. CuO-nr were obtained by alkaline hydrolysis of copper chloride with sodium hydroxide and subsequent functionalization with sodium citrate. The CuO-nr cit showed an average length of 41.45 ± 0.47 nm and an average width of 13.99 ± 0.31 nm (aspect ratio~3), hydrodynamic diameter of 107.1 ± 0.67 nm and zeta potential of -23.8 ± -1.87 mV. In in vitro studies, the MCF-7 cell line showed a significant reduction (~60%) in cell viability after treatment with CuO-nr cit, a fact not observed in the non-tumor cell line (MCF10A) (50%) and in the tumor cell line MDA-MB-231 (~50%). By means of scanning and light electron microscopy, the alteration of the cell morphology of cells treated with CuO-nr cit can be observed, such as a decrease in the number of adhered cells, reduction in cell size and loss of adhesion focal points and characteristic cytoplasmic projections in cell lines tumor cells compared to the non-tumor cell lineage. By flow cytometry it was possible to observe that lytic cell death are the main types of cell death. In the cell cycle assay CuO-nr cit interferes with the S phase of the cycle in the MCF-7 cell line. The studies carried out show that CuO-nr cit has shown to be promising for the treatment of breast cancer.

Keywords: breast cancer; nanotechnology; copper oxide nanoparticles

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estimativa para o triênio 2020-2022 das taxas brutas de incidência dos números de caso de câncer segundo sexo.....	17
Figura 2. Traços característicos de uma célula tumoral.....	19
Figura 3. Diagrama do delineamento experimental desenvolvido no trabalho.....	27
Figura 4. Características estruturais de CuO-nr cit.....	35
Figura 5. Características morfológicas de CuO-nr cit.....	36
Figura 6. Histogramas de distribuição de tamanho para CuO-nr cit.....	37
Figura 7. Estabilidade coloidal de CuO-nr cit no período de 180 dias. (A) Potencial Zeta (mV) e pH, (B) Diâmetro Hidrodinâmico (DH) e Índice de Polidispersão (PdI).....	38
Figura 8. Avaliação da viabilidade celular por alamarBlue™ das linhagens MCF-7, MDA-MB-231 e MCF10A após 24, 48 e 72 horas de tratamento com CuO-nr cit em diferentes concentrações.....	39
Figura 9. Avaliação da viabilidade celular por alamarBlue™ das linhagens MCF-7, MCF 10A após 24, 48 e 72 horas de tratamento com Cu livre em diferentes concentrações.....	40
Figura 10. Avaliação do ciclo celular em células MCF-7 e MDA-MB-231 tratadas com CuO-nr cit (IC ₅₀ , 48 horas).....	43
Figura 11. Avaliação do perfil de morte celular induzido por CuO-nr cit (50 µg/mL, 48 horas) em células MCF-7 e MDA-MB-231.....	45
Figura 12. Avaliação da morfologia celular das linhagens tumorais e não tumoral após 6, 24 e 48h de exposição ao tratamento de CuO-nr cit (50 µg/mL ⁻¹).....	47
Figura 13. Alteração da morfologia das linhagens tumorais e não tumorais após exposição ao tratamento com CuO-nr cit.....	48
Figura 14. Internalização celular por CuO-nr cit após 3h e 48h das linhagens tumorais MCF-7 e MDA-MB-231.....	49

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Reagentes.....	26
Tabela 2. Concentração inibitória de 50% de CuO-nr cit das linhagens MCF-7 e MCF10A em 24, 48 e 72 horas.....	41
Tabela 3. Concentração inibitória de 50% de Cu livre das linhagens MCF-7 e MCF10A em 24, 48 e 72 horas.....	41

LISTA DE ABREVIATURAR E SIGLAS

°C	Graus Celsius
BCRJ	Banco de Células do Rio de Janeiro
BCRA1	Proteína do tipo 1 de susceptibilidade ao câncer de mama
BCRA2	Proteína do tipo 2 de susceptibilidade ao câncer de mama
CuO NPs	Nanopartícula de óxido de cobre
CuO-nr	<i>Nanorods</i> de óxido de cobre
CuO-nr cit	<i>Nanorod</i> de óxido de cobre composta por citrato
DH	Diâmetro Hidrodinâmico
DLS	Espalhamento de luz dinâmica
DMEM-F12	Meio de Eagle modificado por Dulbecco: Mistura de nutrientes F-12
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EROS	Espécies Reativas de Oxigênio
DRX	Difração de Raio X
HER2	Receptor do fator de crescimento epidermal humano 2
IC₅₀	Concentração Inibitória de 50%
INCA	Instituto Nacional do Câncer
kDa	Quilodalton
keV	Elétron-volt
L-15	<i>Leibowitz médium</i>
MCF 10A	Célula epitelial da glândula mamária humana
MCF7	Linhagem de adenocarcinoma mamário
MDA-MB-231	Linhagem de adenocarcinoma mamário
MET	Microscopia Eletrônica de Transmissão
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura

NPs	Nanopartícula
PBS	Tampão Fosfato Salina (<i>Phosphate buffered saline</i>)
PdI	Índice de Polidispersão
RE	Receptor de estrógeno
RP	Receptor de progesterona
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute medium</i>
SFB	Soro fetal bovino
SFE	Soro fetal equino
TG	Análise Termogravimétrica

SUMÁRIO

1. Introdução.....	17
1.1. Câncer.....	17
1.2. Câncer de mama.....	19
1.3. Tratamentos convencionais para o câncer.....	20
1.4. Nanobiotecnologia.....	21
1.5. Nanopartículas metálicas e óxidos metálicos.....	22
2. Justificativa.....	24
3. Objetivos.....	25
3.1. Objetivo geral.....	25
3.2. Objetivo específicos.....	25
4. Materiais e Métodos.....	26
4.1. Reagentes.....	26
4.2. Delineamento Experimental.....	27
4.3. Síntese e Caracterização de CuO-nr.....	27
4.4. Manutenção das linhagens celulares.....	25
4.5. Ensaio de Viabilidade Celular.....	29
4.6. Análises Morfológicas.....	30
4.6.1. Microscopia de Luz.....	30
4.6.2. Microscopia de Varredura.....	30
4.6.3. Microscopia de Transmissão.....	31
4.7. Caracterização da morte celular induzida por CuO-nr cit.....	31
4.8. Análise do ciclo celular por marcação com iodeto de propídeo.....	32
4.9. Análise Estatística.....	33
5. Resultados.....	33
5.1. Caracterização das nanopartículas.....	33
5.2. Análise da citotoxicidade de Cobre (Cu) e CuO-nr cit.....	38
5.3. Cálculo da concentração inibitória de 50% de CuO livre e CuO-nr cit (IC ₅₀).....	40
5.4. Alterações no perfil do ciclo celular de células MCF-7, MDA-MB-231 decorrente do tratamento com CuO-nr cit.....	41
5.5. Análise do tipo de morte celular causada pelo tratamento com CuO-nr cit.....	44

6. Análises morfológicas.....	46
6.1. <i>Microscopia de Luz e Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....</i>	<i>46</i>
6.2. <i>Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET).....</i>	<i>49</i>
7. Discussão.....	50
8. Conclusão.....	54
9. Perspectivas.....	55
10. Referências Bibliográficas.....	56

1. Introdução

1.1. Câncer

Conforme os dados do INCA, o câncer é a denominação de um conjunto de mais de 100 doenças que possuem em comum o crescimento desordenado de células [1]. É a segunda causa de mortes global, superado apenas pelas doenças cardiovasculares, sendo assim, considerado um dos principais problemas de saúde pública atual [2]. Para o Brasil, a estimativa para cada ano do triênio 2020-2022 aponta que ocorrerão 625 mil casos novos de câncer (450 mil, excluindo os casos de câncer de pele não melanoma). O câncer de pele não melanoma será o mais incidente (177 mil), seguido pelos cânceres de mama e próstata (66 mil cada), cólon e reto (41 mil), pulmão (30 mil) e estômago (21 mil). Os tipos de câncer mais frequentes em homens, à exceção do câncer de pele não melanoma, serão próstata (29,2%), cólon e reto (9,1%), pulmão (7,9%), estômago (5,9%) e cavidade oral (5,0%). Nas mulheres, exceto o câncer de pele não melanoma, os cânceres de mama (29,7%), cólon e reto (9,2%), colo do útero (7,5%), pulmão (5,6%) e tireoide (5,4%) figurarão entre os principais. O câncer de pele não melanoma representará 27,1% de todos os casos de câncer em homens e 29,5% em mulheres [1-5]. (Figura 1)

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

*Números arredondados para múltiplos de 10.

Figura 1. Estimativa para o triênio 2020-2022 das taxas brutas de incidência dos números de caso de câncer segundo sexo. Fonte: INCA, 2022.

O câncer consiste em uma enfermidade crônica, caracterizada pelo crescimento desordenado de células neoplásicas, o qual é resultante de alterações no material genético.

Entre 5-10% dos cânceres são resultados diretos da herança de genes relacionados à neoplasia, mas a maior parte envolve danos ao material genético que se acumulam ao longo do tempo. Estes danos podem ser de origem física, química ou biológica [4-5].

Dentre as características fundamentais para o desenvolvimento do câncer, estão a evasão ao sistema imune, a promoção da inflamação no ambiente tumoral, a imortalidade celular, a capacidade de invasão, a indução da angiogênese, a instabilidade genômica, a resistência, a apoptose, a desregulação do metabolismo energético, a proliferação descontrolada e, finalmente, a evasão aos supressores de crescimento celular. Na elaboração mais recente desse conceito desbloquear a plasticidade fenotípica, reprogramação epigenética não mutacional, microbiomas polimórficos e senescência celular são consideradas capacidade essenciais para viabilizar o desenvolvimento do câncer [2-5]. Todas essas treze características apresentadas pelas células tumorais podem ser observadas na figura 2.

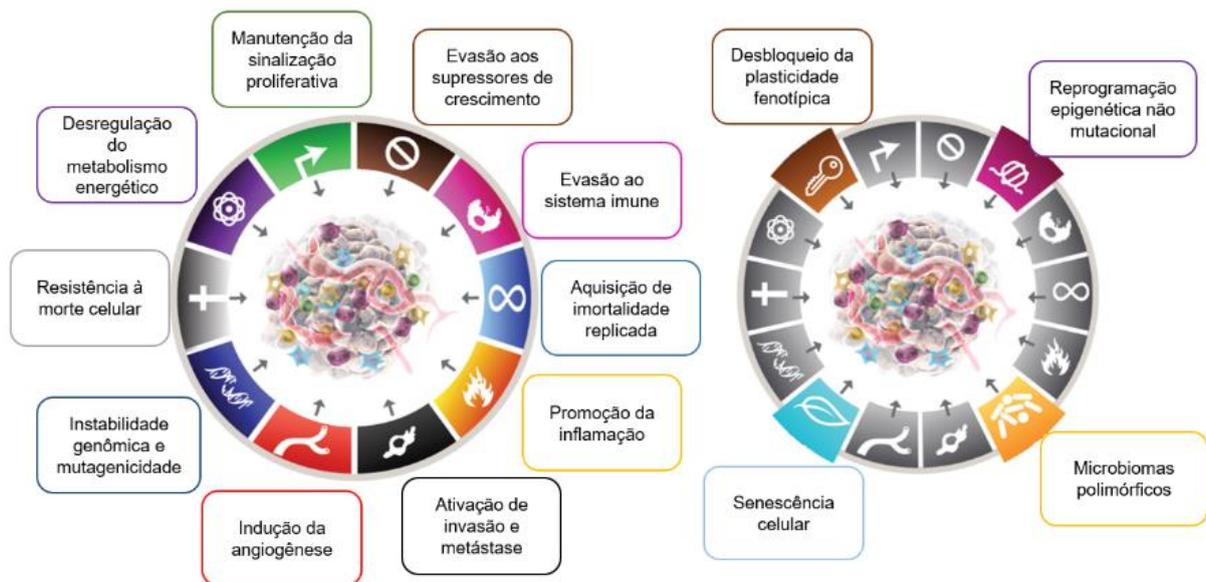


Figura 2. Traços característicos de uma célula tumoral. A figura ilustra as dez características principais adquiridas pelas células tumorais (imagem da esquerda): manutenção da sinalização proliferativa, evasão aos supressores de crescimento, aquisição de imortalidade replicada, promoção da inflamação, ativação de invasão e metástase, indução da angiogênese, instabilidade genômica e mutagenicidade, resistência à morte celular e desregulação do metabolismo energético. Na elaboração mais recente desse conceito (imagem da esquerda) desbloquear a plasticidade fenotípica, reprogramação epigenética não mutacional, microbiomas polimórficos e senescência celular são consideradas capacidade essenciais para viabilizar o desenvolvimento do câncer (Adaptado de Hanahan, 2022).

1.2. Câncer de mama

Atribuindo a complexidade advinda dessa doença, destaca-se o câncer de mama que é o segundo tipo de câncer mais comum no mundo e a principal causa de morte entre mulheres. O adenocarcinoma de mama é considerado uma doença heterogênea clínica e morfológica. Existem mais de 20 subtipos diferentes da doença [4-7].

Fatores genéticos, vida reprodutiva, comportamento e estilo de vida estão intimamente relacionados à ocorrência e desenvolvimento desta enfermidade. Envelhecimento, histórico familiar, densidade do tecido mamário, uso de anticoncepcionais orais, menopausa tardia, terapia de reposição hormonal e menarca precoce são os fatores de risco mais amplamente conhecidos para o desenvolvimento de câncer de mama [4, 5].

Aproximadamente de 4-9% dos casos são geralmente causados por mutações nos genes das proteínas BRCA1 e BRCA2, cuja expressão das variantes aumentam a suscetibilidade ao câncer, principalmente em famílias com histórico de câncer de mama [5-7]

Localizado no braço longo do cromossomo 17, o gene BRCA1 codifica proteínas envolvidas na regulação da expressão gênica. Como um gene supressor de tumor, este gene tem sido implicado no reparo de DNA através da excisão de nucleotídeos, regulação do *checkpoint* do ciclo celular, ubiquitinação de proteínas, remodelação da cromatina e silenciamento do cromossomo X. O gene BRCA2, encontrado no cromossomo 13 é responsável assim como o BRCA1 em codificar proteínas na regulação da transcrição e responsável por manter a estabilidade do genoma por meio de sua recombinação homóloga, *checkpoint* mitótico e atividades de posicionamento do centrôssomo durante a citocinese [5,6].

A principal classificação molecular usada para estes tipos de cânceres é baseada na análise de biomarcadores tumorais, expressão de HER2 e receptor de estrogênio (ER) e progesterona (RP) para fornecer opções ideais de diagnóstico e tratamento. Nos últimos anos por meio da tecnologia de *microarrays*, o câncer de mama foi classificado em cinco subtipos principais com base em perfis de marcadores moleculares, incluindo luminal A, luminal B, *normal-like*, HER2 e basalóide [6-9].

O subtipo luminal A é caracterizado pela presença do receptor RP e/ou ER e pela ausência de superexpressão de HER2 em suas células, enquanto o subtipo luminal B possui receptores hormonais e alta expressão de HER2. Os *normal-like*, que se agrupam com fibroadenomas e amostras de mama normais e que contêm alta concentração de células estromais, não são considerados o subtipo mais comum desse câncer [10-11].

Os subtipos classificados incluem HER2+ e câncer basaloide, o que contribuem para a maior incidência e mortalidade dessa doença. As células HER2+ carecem de receptores hormonais, mas apresentam superexpressão da proteína HER2. O câncer de mama basalóide não possui receptores hormonais ou a proteína HER2 e representa aproximadamente 20% dos cânceres de mama considerados triplo negativo (TN) [12-13].

1.3.Tratamentos convencionais para o câncer

Como outros tipos de câncer, o diagnóstico precoce reflete significativamente o bom prognóstico da doença, com uma taxa de sobrevida maior de cerca de 65% das pacientes. A descoberta desse câncer se dá principalmente por meio do toque regular e da mamografia, mas o número de mulheres que morrem antes do fim do tratamento ainda é alto. Devido ao aumento da morbidade, mortalidade e custos do tratamento desta doença, o câncer de mama tornou-se um sério problema de saúde pública em todo o mundo [6-9].

Os tratamentos convencionais para esta doença consistem em ressecção cirúrgica, radioterapia, quimioterapia, terapia hormonal e imunoterapia, que oferecem riscos de danos aos tecidos sadios ou erradicação incompleta das células malignas, além de baixa qualidade de vida do paciente. Nesse sentido, torna-se necessária a busca por novas modalidades terapêuticas capazes de promover um melhor tratamento dessa doença [10, 11].

1.4.Nanobiotecnologia

A revolução médica que começou no século passado mesclou pesquisas interdisciplinares e deu origem a um campo científico inovador com aplicações biomédicas promissoras: a nanobiotecnologia. Este campo da ciência refere-se a compreensão e controle da matéria e processos em nanoescala, normalmente, mas não exclusivamente, abaixo de 100 nanômetros em uma ou mais dimensões onde o início de

fenômenos dependentes do tamanho permite novas aplicações, utilizando as propriedades de átomos, moléculas e material a granel individuais para criar materiais, dispositivos e sistemas aprimorados que exploram novas propriedades [12]. Na última década, a nanobiotecnologia facilitou o desenvolvimento de ferramentas importantes para fins terapêuticos, fornecendo soluções para as limitações atuais do diagnóstico, tratamento e gestão clínica de doenças humanas [13,14].

A nanotecnologia, na forma de nanopartículas, pode aumentar as propriedades farmacológicas de compostos comumente usados no tratamento e diagnóstico do câncer, razão pela qual se tornou uma possibilidade inovadora para intervenção no tratamento do câncer e direcionamento de medicamentos [15]. Isso geralmente pode ser obtido por meio de diferentes vias de administração, como oral, nasal, intravenoso, entre outros. Para o tratamento, além de aumentar a disponibilidade de medicamentos, as nanopartículas também podem ser projetadas com o objetivo de atuar de forma direcionada e segura. O aumento da biodisponibilidade, propiciar a dispersão de fármacos hidrofóbicos em meios aquosos, propriedades únicas (superparamagnetismo, plasmônica de superfície etc), aumento da permeação de fármacos por epitélios tem permitido à nanobiotecnologia melhorar o efeito terapêutico e reduzir a toxicidade sistêmica de diversos tratamentos [16-18].

1.5. Nanopartículas metálicas e óxidos metálicos

Dentre os mais diversos nanomateriais utilizados para esses fins, as nanopartículas de metais e óxidos metálicos desempenham um papel benéfico no tratamento do câncer proporcionando melhor direcionamento, silenciamento de genes e administração de medicamentos, funcionalizados com ligantes, reduzindo a oferta de energia para os tumores. Também são utilizadas como ferramenta de diagnóstico para geração de imagens de células cancerosas, fornecendo não apenas diagnósticos e terapias

simultâneos como também liberação controlada e direcionada de medicamentos [19, 20].

Nanopartículas de óxido de cobre (CuO NPs) têm sido aplicadas em várias áreas devido às suas excelentes propriedades termofísicas, catalíticas e antibacterianas. Além disso, têm um interesse crescente em aplicações biomédicas, possuindo uma capacidade de biocompatibilidade e aplicabilidade de se acumular no tecido tumoral após administração sistêmica desencadeando a indução de morte celular por apoptose ao elevar o estresse oxidativo, depletando antioxidantes celulares e disfunção mitocondrial [21, 22]. As aplicações de CuO NPs se estendem também para a eletrônica, catálise, sensores, células solares, entrega de fármacos, agricultura, preservação de alimentos, têxteis, tintas, revestimentos e tratamento de água [21-24]. Mais especificamente, o CuO em forma de nanobastão (CuO-nr) demonstrou propriedades aprimoradas devido à sua maior proporção entre superfície e volume em comparação com os esféricos [22]. Mais especificamente no campo da medicina, biologia e ciências da vida as CuO NPs vêm sendo estudados para o desenvolvimento de drogas, *drugs deliverys* e marcadores biológicos [25, 26]. Estudos recentes mostraram a toxicidade mediada pelo estresse oxidativo de NPs de CuO em diferentes linhagens de células humanas, quando é capaz de induzir a apoptose em células tumorais [27-29]. A indução por apoptose é um mecanismo crítico para o agente anticâncer ideal trazendo mudanças morfológicas expressivas como arredondamento/perfil oval, distribuição aleatória, encolhimento celular e condensação e agregação da cromatina, esses fatores acrescentam aos *nanorods* de óxido de cobre um potencial agente antitumoral para inibir a proliferação de células cancerosas [30-32].

2. JUSTIFICATIVA:

O diagnóstico tardio e impreciso associado aos métodos tradicionais de tratamento utilizados no combate a essas doenças não tem sido capaz de reduzir seus danos socioeconômicos. Entre os cânceres que afetam as mulheres, o câncer de mama é o segundo tipo mais comum, sendo o câncer não melanoma o mais incidente. Atualmente, além do possível surgimento de células tumorais resistentes a medicamentos nas estratégias de tratamento desses tumores, existem também reações adversas que prejudicam a saúde e a qualidade de vida dos pacientes.

Diante da problemática apresentada, torna-se necessária a busca por terapias alternativas capazes de visarem com precisão a entrega direcionada do fármaco, diminuição da toxicidade sistêmica, diagnóstico precoce e preciso propiciando melhores condições para a vida do paciente têm sido amplamente estudadas pela comunidade científica nos últimos anos. Tendo em vista o desenvolvimento de terapias mais eficientes para o combate ao câncer, o presente trabalho sugere a avaliação do potencial antitumoral de *nanorods* de óxido de cobre funcionalizados com citrato (CuO-nr cit) no tratamento de câncer de mama.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral:

- Avaliar o potencial antitumoral de nanopartículas *nanorods* de óxido de cobre (CuO-nr) funcionalizados com citrato (CuO-nr cit) em células de adenocarcinoma mamário humano (*in vitro*).

3.2. Objetivos específicos:

- Síntese e caracterização de CuO-nr cit
- Estudo da viabilidade celular com diferentes concentrações e tipo de morte celular;
- Estudo da internalização celular das nanopartículas e alterações na morfologia celular;
- Estudo dos efeitos no ciclo celular e divisão celular da terapia proposta.

4. MATERIAIS E MÉTODOS:

4.1. Reagentes

Os reagentes utilizados para realização dos experimentos desse projeto estão listados no Tabela 1.

Tabela 1. Reagentes utilizados para realização dos experimentos

Fabricante	Materiais
Dinâmica, Brasil	Formaldeído P.A. – ACS; Acetona P.A. - ACS
GIBCO, EUA	L-15; RPMI; DMEM-F12; Soro Fetal Bovino (SFB); Tripsina 0,25% em EDTA; Solução Antibiótica (penicilina e estreptomicina)
Invitrogen, EUA	Alamar Blue; Anexina-V cj FITC
Laborclin, Brasil	Tampão Fosfato Salino (PBS)
Molecular Probes, EUA	Iodeto de Propídeo
Polysciences, EUA	Tetróxido de ósmio; Acetato de uranila
Roche, Suíça	Complete Tablets, Mini EDTA-Free
Sigma-Aldrich, EUA	Cloreto de cobre dihidratado 98%, citrato de sódio trihidratado 99%, Formvar solution
Vetec, Brasil	Paraformaldeído 37%, hidróxido de sódio 99%

4.2. Delineamento Experimental

Os experimentos realizados nesse trabalho estão esquematizados abaixo (Figura 3).

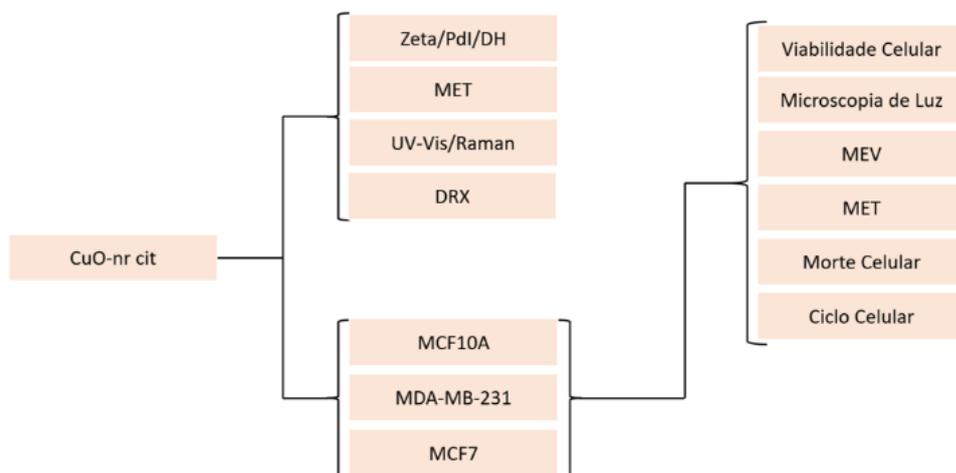


Figura 3. Diagrama do delineamento experimental desenvolvido no trabalho. Procedimentos utilizados na síntese e caracterização de CuO-nr cit e Ensaios *in vitro* utilizando linhagens humanas de adenocarcinoma de mama e linhagem humana de origem epitelial não tumoral. Pdl= Índice de Polidispersão; DH= Diâmetro Hidrodinâmico; MET= Microscopia Eletrônica de Transmissão; UV-Vis= Espectroscopia no ultravioleta visível; DRX= Difratograma de Raio-X; MEV= Microscopia Eletrônica de Varredura.

4.3. Síntese e Caracterização de CuO-nr

A síntese e caracterização das nanopartículas de CuO-nr foram realizadas no Laboratório de Pesquisa em Polímeros e Nanomateriais (LABPOLN) do Instituto de Química da Universidade de Brasília.

Os CuO-nr funcionalizados com citrato foram produzidos seguindo procedimento descrito por Misra *et al* (2014) [33] com pequenas modificações. Na primeira etapa, uma solução aquosa de $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0,02 M, 75 mL) preparada com água deionizada foi aquecida até ebulição e sob agitação magnética num balão reacional de duas bocas acoplado a um condensador. Em seguida, 0,4 g (0,01 mol) de NaOH foram adicionados, de uma só vez, e a mistura foi mantida em ebulição e agitação magnética por mais 15

minutos. O precipitado marrom escuro de CuO-nr obtido após esse período foi isolado por decantação e submetido a dois ciclos de lavagem com água deionizada e centrifugação (8.000 rpm) por 10 minutos para remover o excesso de íons não reagidos (Cl^- , OH^- , Cu^{2+} e Na^+). Depois disso, o precipitado foi suspenso em solução de citrato de sódio (1% m/v) sob sonicação pulsada (10 min., 1s on/1s off, 150W) usando um sonicador de ponteira (Branson 450A). A suspensão resultante foi transferida para sacos de diálise de celulose (corte de massa molar: 12 kDa) e dialisada em água deionizada por 48h para remover o excesso de citrato. Sua concentração foi determinada por espectroscopia de absorção atômica (Varian AA 240 FS) usando solução padrão de cobre certificada da Sigma-Aldrich.

A suspensão coloidal obtida foi caracterizada por espectrofotometria de absorção na região UV-Vis, Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS – do inglês *Dynamic Light Scattering*), Mobilidade Eletroforética (potencial Zeta de superfície), Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) e de Alta Resolução, Difração de raios X (DRX), Espectroscopia Raman e Análise Termogravimétrica (TG); sendo que para DRX, Raman e TG a amostra foi previamente liofilizada.

Para obtenção do espectro UV-Vis foi utilizado um espectrofotômetro Varian Cary 5000 (intervalo: 200-800 nm; taxa de varredura: 10 nm s⁻¹; resolução: 0,5 nm). O diâmetro hidrodinâmico, o índice de polidispersão e o potencial Zeta das NPs foram obtidos no equipamento Malvern Zetasizer Nano ZS90.

O espectro Raman foi registrado em um microscópio Raman InVivo Renishaw na configuração de *backscattering* (faixa: 200-800 cm⁻¹; excitação 632,8 nm; potência do laser: 25 mW; resolução 1cm⁻¹). A difratograma de raios X foi adquirido em um difratômetro D8 Focus Bruker (incremento: 0,05°; taxa de varredura: 0,5 graus min⁻¹). E a análise termogravimétrica foi realizada com o termoanalisador DTG 60H Shimadzu (atmosfera de ar de 10 mL L⁻¹; taxa de aquecimento: 10 °C min⁻¹).

4.4. Manutenção das linhagens celulares

Para realização dos ensaios biológicos *in vitro* foram selecionadas duas linhagens de adenocarcinoma mamário, MDA-MB-231 (humano, triplo negativa) e MCF-7 (humano, positivo para receptores de estrógeno e progesterona) e uma linhagem não tumoral MCF10A (humano, epitelial isolada de uma glândula mamária). As linhagens MCF-7, MDA-MB-231 e MCF10A foram obtidas no Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ). As células MCF-7, MDA-MB-231 e MCF10A foram cultivadas em meios de cultura Roswell Park Memorial Institute médio 1640 (RPMI-1640), Leibovitz's (L-15) e Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Nutrient Mixture F-12 Ham (DMEM- F12) respectivamente. Todos os meios foram suplementados com 10% de soro fetal bovino (SFB) e 1% de antibiótico (penicilina 10.000 U e estreptomicina 10 mg/L). Para suplementação do meio DMEM-F12, foram adicionados 55 µl de Fator de Crescimento Epidérmico (EGF) (10 µg/mL), 55 µl de tóxina colérica (1mg/mL), 275 µl de hidrocortisona (1 mg/mL), 550 µl de insulina e 10% de soro fetal equino (SFE). As células foram mantidas com meio de cultura em incubadora úmida a 37°C com 5% de CO₂. Os repiques foram realizados por meio da ação proteolítica de solução 0,25% de tripsina-EDTA (Gibco, USA). A contagem de células foi feita em câmara de *Neubauer* utilizando-se o método de exclusão por Azul de *Tripan* (Sigma) para distinção de células viáveis.

4.5. Ensaio de viabilidade celular

A viabilidade das células normais (MCF10A) e tumorais (MCF-7 e MDA-MB-231) tratadas com a *nanorods* de óxido de cobre (CuO-nr) e o cobre livre (Cu), foi determinada pelo ensaio padrão por Alamar Blue (AlamarBlue™ Cell Viability Reagent, Invitrogen™). Para este experimento, foram plaqueadas 3×10^5 células em placas de 96 poços. Em seguida foi realizado o tratamento com *nanorods* de óxido de cobre (CuO-nr) e o cobre (Cu^{2+}) em diferentes concentrações (25; 50; 75 e $100 \mu\text{g mL}^{-1}$) dispersas em meio de cultura e em diferentes tempos (24, 48 e 72 horas). A fluorescência emitida foi lida no espectrofotômetro *Spectramax M5* (Molecular Devices – USA) (λ_{ex} : 560; λ_{em} : 590). O ensaio de Alamar Blue foi realizado em triplicata para cada concentração utilizada. Os experimentos ocorreram em série de três repetições.

4.6. Análises Morfológicas

4.6.1. Microscopia de luz

Para o estudo das alterações morfológicas de células tumorais (MDA-MB-231 e MCF-7) e não tumoral (MCF10A) foram plaqueadas 1×10^5 (células/poço) de cada linhagem em placas de 12 poços. Após 24 horas foi adicionado $50 \mu\text{g/mL}$ de CuO-nr cit com o meio de cultura ao qual permaneceu incubada durante 48 horas. As imagens foram obtidas com o auxílio do software EVOS FL Auto no microscópio de luz EVOS FL Auto (ThermoFischer, EUA) do Laboratório de Nanotecnologia do Departamento de Genética e Morfologia da Universidade de Brasília, UnB.

4.6.2. Microscopia Eletrônica de Varredura

A fim de analisar as diferenças morfológicas presentes na superfície celular em decorrência da terapia proposta, as células tumorais e não tumorais foram analisadas em microscópio eletrônico de varredura (MEV) (JEOL, Japan). Inicialmente, 1×10^4 (células/poço) foram plaqueadas em lamínulas $18 \times 18 \text{ mm}$ colocadas em placas de 6 poços. As células foram tratadas com $50 \mu\text{g/mL}$ de CuO-nr cit. Após 48 horas de

tratamento, ocorreu descarte do meio de cultivo e do tratamento e as células passaram pelo processo de lavagem e fixação em 2% de paraformaldeído, 2% de glutaraldeído em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7,2 *overnights* à 4 °C. Posteriormente, as linhagens foram lavadas com tampão cacodilato de sódio 0,1 M e pós-fixadas por 30 min com tetróxido de ósmio 1% em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7,2. Em seguida as células passaram por uma desidratação seriada com concentrações crescentes de acetona (30%-100%), pela secagem ao ponto crítico CPD 030 (BALZERS, EUA) e metalização SCD 500 (LEICA, Germany). As amostras foram analisadas no Microscópio Eletrônico de Varredura JSM-7001F (JEOL, Japan).

4.6.3. *Microscopia Eletrônica de Transmissão*

As células foram plaqueadas em placas de 6 poços com 1×10^5 (células/poço). Após a adesão elas foram tratadas com 50 µg/mL de CuO-nr cit por 6, 24 e 48 horas, depois foram desaderidas com tripsina, lavadas com PBS e em seguida foram fixadas por 3 horas em solução de 4% de paraformaldeído e 2% de glutaraldeído em tampão cacodilato de sódio 0.1 M, pH 7,2; lavadas no mesmo tampão; pós-fixadas por 1 hora em 1% de tetróxido de ósmio 1% e 0,8% de ferrocianeto na proporção em tampão cacodilato de sódio 0.1 M, pH 7,2; desidratadas gradualmente com acetona (30%-100%) e incluída com resina Spurr. Os cortes ultrafinos obtidos em ultramicrotomo Leica em UC7 (LEICA, Germany) foram contrastados em acetato de uranila e citrato de chumbo e analisadas em Microscópio eletrônico de transmissão Jeol 1011 (JEOL, Japan).

4.7. Caracterização da morte celular induzida por CuO-nr cit

A análise do tipo de morte celular induzida pelo tratamento de CuO-nr cit foi realizada pela marcação das células tumorais (MCF-7 e MDA-MB-231) com Anexina V-FITC e Iodeto de Propídio (PI). Para o ensaio 5×10^5 células foram plaqueadas em placas de 12 poços e, após 24 h, as linhagens foram incubadas com o tratamento CuO-nr cit (50 µg/mL) ou com o volume equivalente de meio de cultivo (controle). Os tratamentos foram deixados

durante 48 h e, 30 min antes de completar o tempo esperado, o grupo controle de apoptose foi tratado com 10 mM de peróxido de hidrogênio. Posteriormente, as células aderentes e em solução foram recolhidas e centrifugadas a 300g por 3 min para a retirada do meio. Os pellets obtidos foram lavados com PBS e, após esse processo, ressuspensos em 100 µL de tampão de ligação de anexina V (10 mM HEPES, 140 mM NaCl e 2,5 mM de CaCl₂ – pH 7,4). O grupo controle de necrose foi aquecido à 100°C por 10 min. Foram adicionados 3 µL de anexina-V nas amostras que ficaram incubadas com a solução por 15 min à temperatura ambiente e protegidas da luz. Passado esse período, 400 µL do tampão de ligação da Anexina V foram adicionados, seguido da adição de 500 µL da solução de PI (PBS e Iodeto de Propídeo, concentração final de 2 µg/mL). As células foram incubadas por mais 5 min no gelo, lavadas com PBS e, a partir desse momento, as amostras foram analisadas pelo citômetro FACSCalibur (Becton Dickinson), canais FL-2 e FL- 1, com o auxílio do *software CellQuest-Pro* para análise dos dados. O estudo foi composto por 3 experimentos independentes realizados em triplicata e a quantificação do tipo de morte celular foi determinada utilizando-se a plataforma do *software FlowJo*.

4.8. Análise do ciclo celular por marcação com iodeto de propídeo (PI)

A fim de quantificar as populações celulares que estarão em G₀/G₁ (2N de DNA), em G₂/M (4N de DNA) e em fase S (quantidade intermediária de DNA), foi realizado o ensaio de marcação de DNA com o PI e análise em citômetro de fluxo. As células (3×10^5) foram plaqueadas em placas de 12 poços, após 24 h, foram tratadas com meio de cultivo (controle) ou com CuO-nr cit (IC₅₀). Passadas 24 h, as células foram desaderidas e centrifugadas a 300g por 3 min para a retirada do meio de cultura. O pellet foi lavado em 500 µL de PBS 1X, 4,5 mL de etanol 70% e mantido por 2 h no gelo para fixação. Posteriormente, as células foram lavadas com PBS e incubadas em solução de PI (0,1% de triton X-100, 10 µg/mL de PI e 100 µg/mL de RNase livre de DNase) diluído em PBS por 10 min a temperatura ambiente. Após a incubação, as amostras passaram por um processo de

centrifugação e foram ressuspendidas em PBS 1X e 8000 eventos de cada amostra foram analisados por citometria de fluxo. O conteúdo de DNA das células nas diferentes fases do ciclo foi determinado pela plataforma de ciclo celular do *software FlowJo*. Foram realizados três experimentos independentes.

4.9. Análise estatística

Os dados obtidos foram analisados no programa Graphpad Prism 5.0 submetidos a testes específicos com confiança estatística de 95%. Foram utilizados os testes de Anova Two Way e com pós-teste Tukey.

5. RESULTADOS

5.1. Caracterização das Nanopartículas

As características físico-químicas das suspensões coloidais de CuO-nr cit foram avaliadas quanto aos perfis indicativo de ressonância plasmônica de superfície (RPS) (análise espectrofotométrica) e estrutural (difração de raios X); aos possíveis grupamentos funcionais (espectroscopia Raman); à variação da massa da amostra em função da temperatura (análise termogravimétrica); ao diâmetro seco e à morfologia (microscopia eletrônica de transmissão); ao diâmetro hidrodinâmico e o índice de polidispersão (espalhamento dinâmico de luz); e quanto ao potencial Zeta de superfície (mobilidade eletroforética).

A Figura 4 (A, B e C) apresenta resultados que corroboram entre si e sugerem a formação do CuO nanoestruturado.

O espectro Uv-Vis (Figura 4A), com máximo de absorção centrado em 278 nm, pode ser atribuído à nanoestruturação do CuO [34-35]. Este máximo característico ocorre devido aos elétrons presentes na banda de condução do metal, que, após receberem energia e transicionarem da banda de valência, entram em ressonância com a radiação (luz) incidente (a qual é ajustada no espectrofotômetro). O máximo de absorção tende a variar de acordo

com o material utilizado na funcionalização, com o tamanho e com a forma do nanomaterial [36].

O difratograma de raios X (Figura 4B) indicou a estrutura cristalina de CuO na fase monoclinica (célula unitária característica), com picos de difração e reflexões (ângulos) próprios de CuO-nr [32]. O diâmetro médio do cristalito (D_{hkl}) foi determinado utilizando a equação de Scherrer (equação 1), a partir da largura a meia altura (β) do pico mais intenso (110), e obtido após o ajuste Lorentziano adequado. Para $\lambda = 1,54$ angstroms (comprimento de onda da fonte de radiação do feixe de raios X (Cu-K α)), D_{hkl} encontrado foi de 48 nm.

$$(Equação 1) \quad D_{hkl} = \frac{0.9\lambda}{\beta \cos\theta}$$

O espectro Raman (Figura 4C), adquirido na região compreendida entre 200 e 800 cm^{-1} , indicou a geometria molecular de CuO-nr cit, definida por três modos vibracionais principais, sendo eles, A_g (283 cm^{-1}), B_g^1 (334 cm^{-1}) e B_g^2 (616 cm^{-1}); os quais podem sofrer desvios de acordo com a cobertura do nanomaterial [35].

Adicionalmente, a Figura 4D apresenta as curvas termogravimétricas para CuO-nr cit em comparação com aquelas registradas para CuO-nr (sem citrato) e citrato de sódio individuais. A principal diferença entre CuO revestido com citrato é a massa residual ao final do experimento, que é menor neste último. Isso porque parte de sua massa se deve às moléculas de citrato, que são decompostas com o aquecimento. De fato, o citrato representa cerca de 24% da massa de CuO-nr cit, conforme determinado pela diferença entre essas duas curvas.

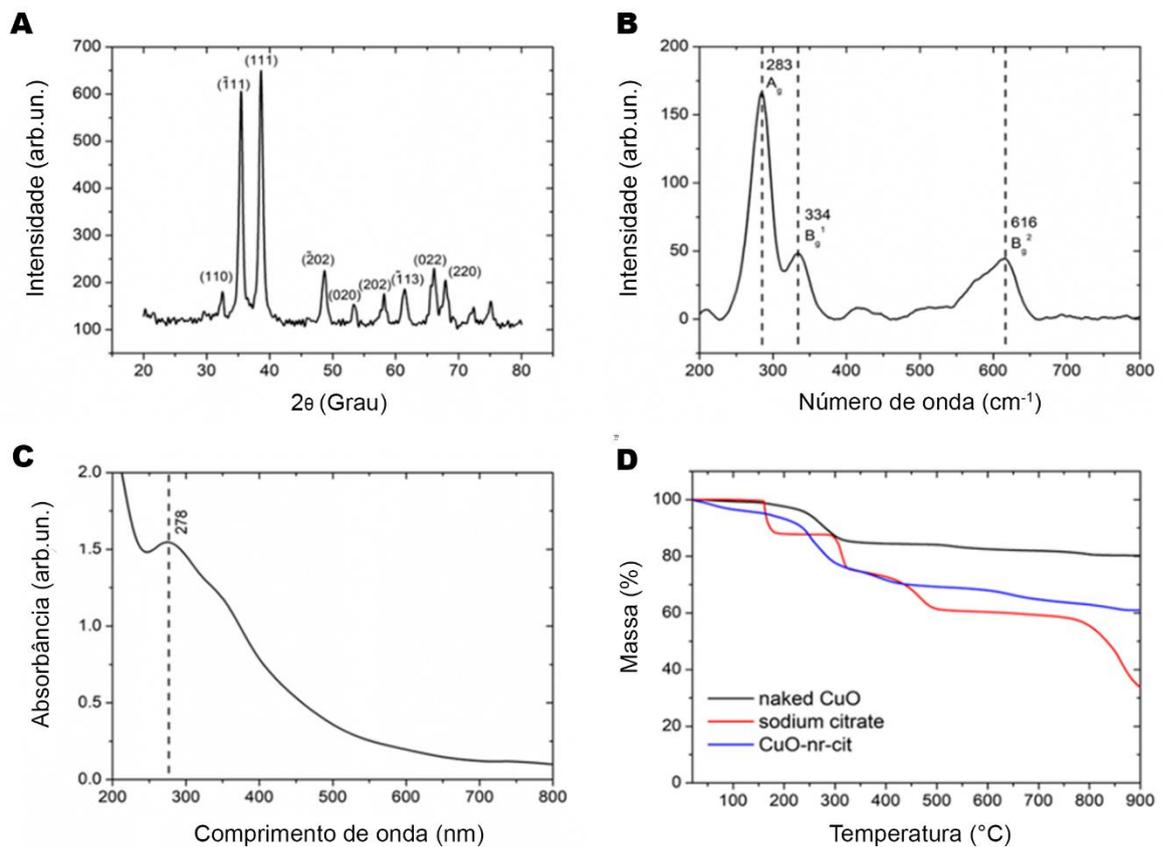


Figura 4. Características estruturais de CuO-nr cit. (A) Espectro de absorção UV-Vís, (B) Difratoograma de raios X, (C) Espectro Raman, e (D) Curvas termogravimétricas.

A amostra de CuO-nr cit foi também caracterizada pelas Microscopias Eletrônica de Transmissão e Alta Resolução (Figura 5). CuO-nr cit apresentaram morfologia típica de bastonetes com pontas facetadas (Figura 5A). O padrão de difração de elétrons de área selecionado (Figura 5B) é indexado com os planos de difração mais intensos na fase monoclinica CuO, de acordo com o padrão de difração de raios X fornecido (Figura 4B). A micrografia de alta resolução na Figura 5C revela planos cristalográficos em detalhes. A distância interplanar média estimada a partir desta micrografia é de $0,188 \pm 0,010$ nm. Este valor corresponde ao plano (200) (após usar a equação de Bragg (equação 2); onde n é um número inteiro, d é a distância interplanar do plano cristalino, e λ e θ correspondem ao comprimento de onda e o ângulo de difração da radiação incidente, respectivamente.

$$(Equação 2) \quad n\lambda = 2d \operatorname{sen}(\theta)$$

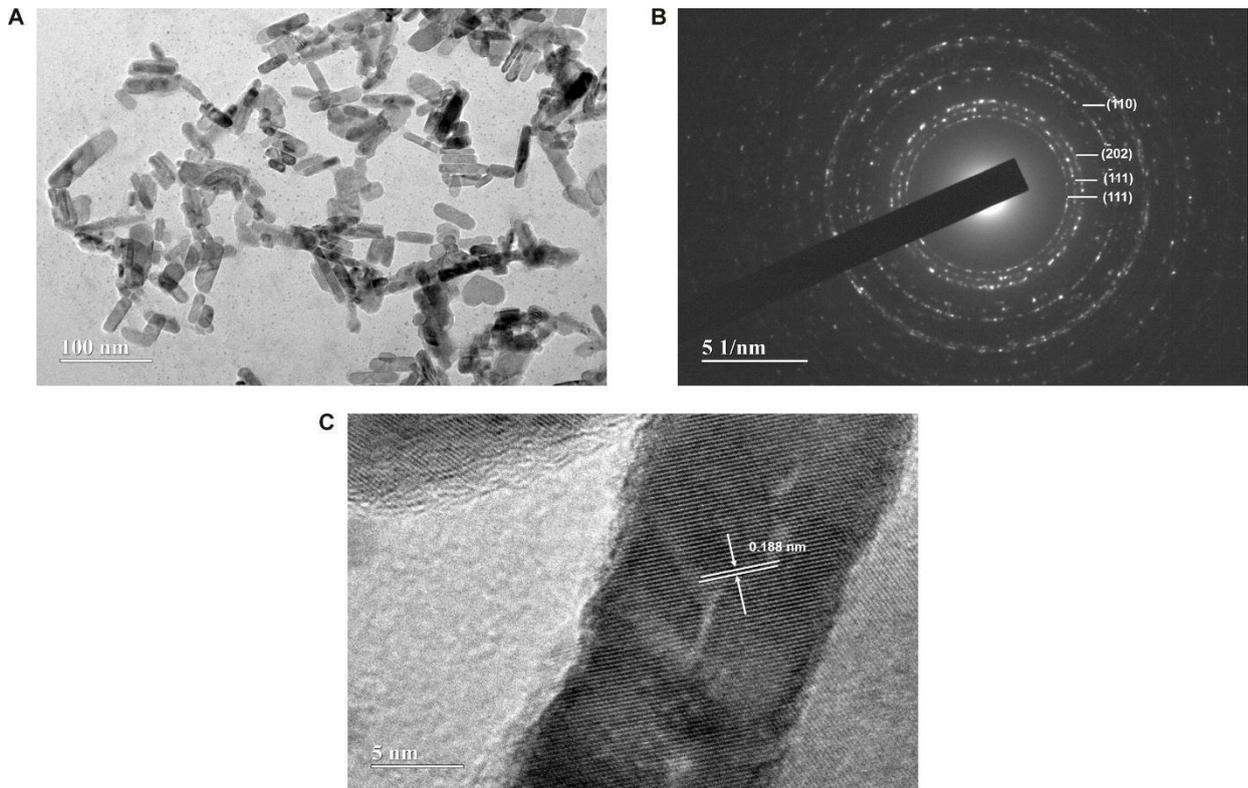


Figura 5. Características morfológicas de CuO-nr cit. (A) Microscopia Eletrônica de Transmissão. Barra de escala= 100 nm, (B) Padrão de Difração de elétrons de área selecionada. Barra de escala= 51 nm e (C) Microscopia Eletrônica de Alta Resolução. Barra de escala= 5 nm (Universidade Federal do Goiás- UFG).

Os histogramas apresentados nas Figuras 6A e 6B fornecem o comprimento e largura das CuO-nr cit, e foram adquiridos a partir da micrografia representativa via MET (Figura 5A). Os tamanhos médios, obtidos após ajuste log-normal, foram equivalentes a $41,45 \pm 0,47$ nm e $13,99 \pm 0,31$ nm, para comprimento e largura, respectivamente. Vale ressaltar que o comprimento da nanopartícula é compatível com o tamanho do cristalito determinado pela difratometria de raios X (48 nm).

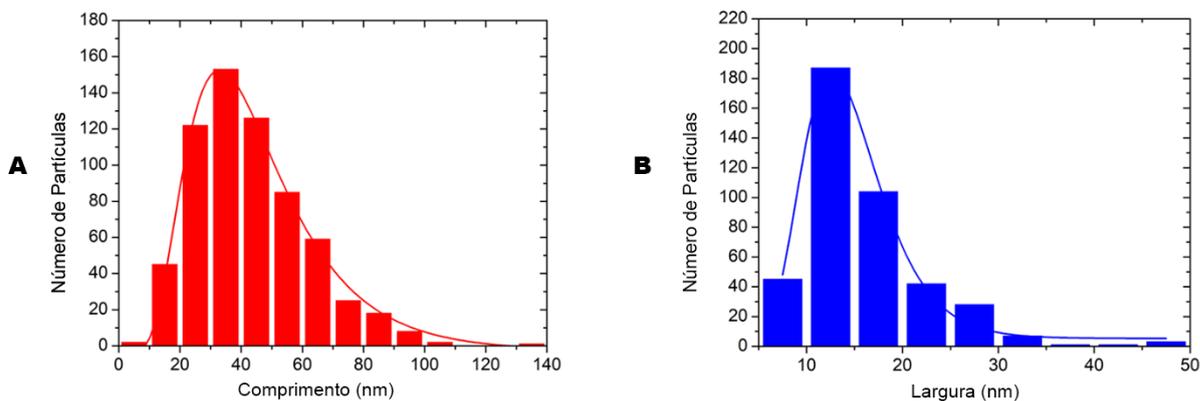


Figura 6. Histogramas de distribuição de tamanho para CuO-nr cit. (A) Comprimento e (B) Largura. Os tamanhos médios, obtidos após ajuste log-normal, foram equivalentes a $41,45 \pm 0,47$ nm e $13,99 \pm 0,31$ nm, para comprimento e largura, respectivamente.

A Figura 7 apresenta a avaliação da manutenção das propriedades coloidais de CuO-nr cit quanto à carga de superfície (potencial Zeta) e do pH (Figura 7A), bem como do diâmetro hidrodinâmico e índice de polidispersão (Figura 7B).

Ao longo de 180 dias, a carga superficial variou entre -30 mV e -20 mV e o pH entre 7 e 6. O diâmetro hidrodinâmico apresentou variações expressivas nos primeiros dias de monitoramento, decrescendo até o 15º dia e retornando ao valor inicial ($107,1 \pm 0,67$ nm) a partir de então. A inspeção visual, realizada periodicamente, não indicou a formação de sedimentos ou flocos; e com base nos resultados apresentados na Figura 7, é possível concluir que a suspensão coloidal de CuO-nr cit mostrou-se estável, pelo menos durante o período de monitoramento.

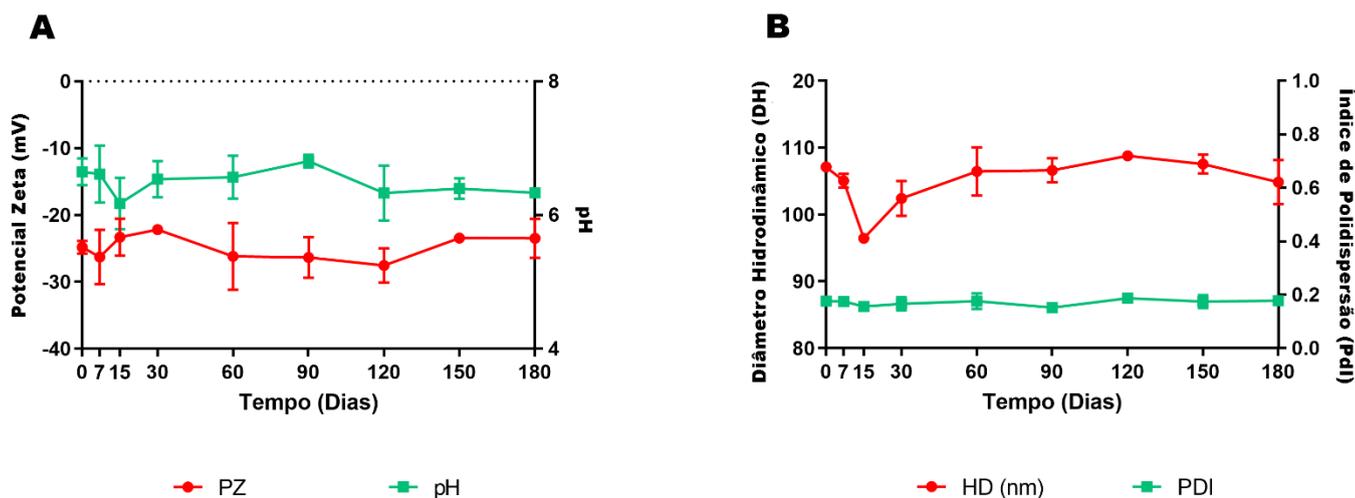


Figura 7. Monitoramento da estabilidade coloidal de CuO-nr cit no período de 180 dias. (A) Potencial Zeta (mV) e pH, (B) Diâmetro Hidrodinâmico (DH) e Índice de Polidispersão (PdI).

5.2. Análise da citotoxicidade de Cobre (Cu) e CuO-nr cit

Para aplicação da formulação desenvolvida na terapia de câncer como um passo importante, foram avaliadas a citotoxicidade *in vitro* de CuO-nr cit e Cu em duas linhagens de carcinoma mamário (MDA-MB-231 e MCF-7) (Figura 8 A e B) e uma linhagem não tumoral (MC10A) (Figura 8C). As concentrações selecionadas para o tratamento (25, 50, 75 e 100 $\mu\text{g/mL}$) basearam-se em estudos bibliográficos [24, 29-32]. Os resultados sugerem que o CuO-nr cit apresentou toxicidade dependente de dose e tempo na linhagem MCF-7. A linhagem tumoral (MCF-7) (Figura 8A) foi mais sensível à nanoestrutura apresentando uma redução significativa na viabilidade em concentrações mais altas de CuO-nr cit (75-100 $\mu\text{g mL}^{-1}$). A linhagem tumoral (MDA-MB-231) (Figura 8B) apresentou resposta ao tratamento (~50%), demonstrando ser mais resistente a terapia proposta apresentando uma melhora na viabilidade celular mesmo após exposição da nanoestrutura na maior dose e maior tempo. A linhagem celular não tumoral (MCF10A) (Figura 8C) também mostrou-se mais sensível (~60%) ao tratamento de CuO-nr cit, pois houve uma redução expressiva na viabilidade e a sensibilidade foi mais significativa apenas quando expostas a maiores concentrações por mais tempo. Ainda é possível observar que a linhagem possui uma

recuperação celular após 72 horas de exposição da nanoestrutura mesmo após maiores concentrações.

Também foi avaliado a citotoxicidade *in vitro* do Cobre (Cu) para averiguar se o composto sozinho causaria toxicidade nas linhagens tumorais e não tumoral. A linhagem tumoral (MCF-7) (Figura 9A) apresentou uma redução significativa mais expressiva da viabilidade (~60%) nas quatro concentrações estabelecidas em comparação com o CuO-nr cit o que demonstra que o Cu na sua forma livre é mais citotóxico para a linhagem tumoral do que na sua associada a nanopartícula. A linhagem MDA-MB-231 (Figura 9B) também apresentou redução significativa (~40%) quando comparada com o CuO-nr cit demonstrando a resistência da célula à exposição do tratamento. A linhagem não tumoral MCF10-A (Figura 9C) demonstrou mais sensibilidade ao tratamento de Cu em concentrações maiores que 50 µg/mL em comparação ao nanossistema.

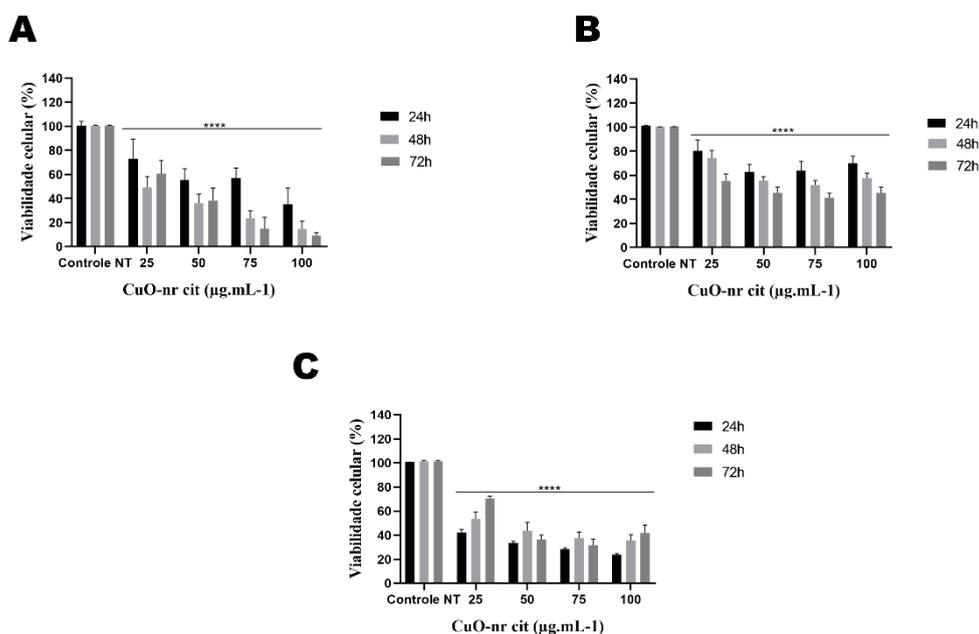


Figura 8. Avaliação da viabilidade celular por alamarBlue™ das linhagens MCF7, MDA-MB-231 e MCF 10A após 24, 48 e 72 horas de tratamento com CuO-nr cit em diferentes concentrações. Gráfico de viabilidade da linhagem MCF-7 (A), MDA-MB-231 (B) e MCF10A (C). As barras representam a viabilidade celular em porcentagem para cada linhagem nas concentrações indicadas. Os dados representam a média ± SEM de três experimentos independentes em quadruplicatas ****P<0,0001. Tratamento comparado ao controle não tratado.

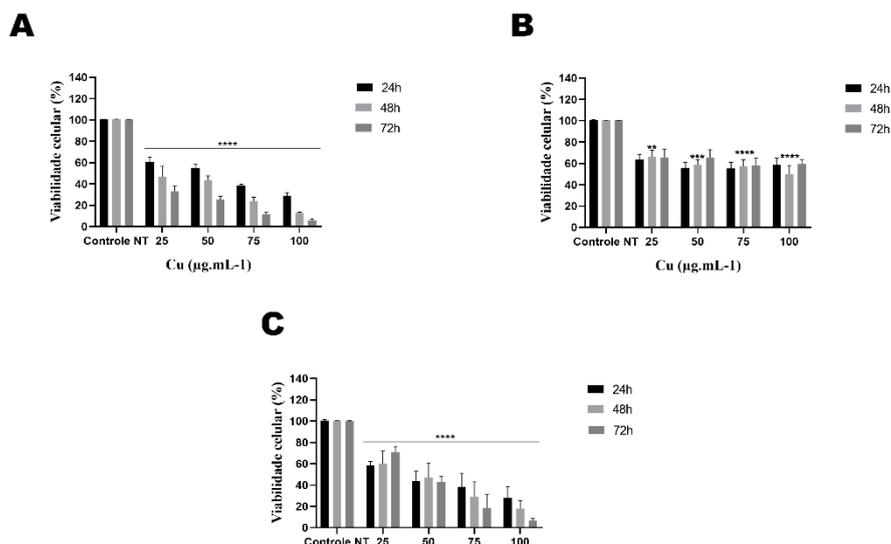


Figura 9. Avaliação da viabilidade celular por alamarBlue™ das linhagens MCF7, MDA-MB-231, MCF 10A após 24, 48 e 72 horas de tratamento com Cu livre em diferentes concentrações. Gráfico de viabilidade da linhagem MCF-7 (A), MDA-MB-231 (B) e MCF10A (C). As barras representam a viabilidade celular em porcentagem para cada linhagem nas concentrações indicadas. Os dados representam a média \pm SEM de três experimentos independentes em quadruplicatas **** $P < 0,0001$. Tratamento comparado ao controle não tratado.

5.3. Cálculo da concentração Inibitória de 50% de Cu e de CuO-nr cit (IC_{50})

Após as análises de viabilidade celular, foram calculados os IC_{50} de CuO-nr cit e Cobre (Cu), para todos os tempos, nas três linhagens estudadas. Para a linhagem tumoral MCF-7 observa-se que, o valor de IC_{50} diminui com o tempo corroborando com a análise tempo dependente observado com o ensaio de viabilidade celular (Tabela 2). Na linhagem não tumoral MCF10A, em contrapartida o valor decresceu no tempo de 24 horas e 48 horas e aumentou expressivamente nos tempos de 72 horas. Para a célula tumoral MDA-MB-231 não foi possível corroborar os gráficos de viabilidade celular em nenhum dos tempos tratados, pois as concentrações utilizadas não reduziram a viabilidade celular em 50%.

Tabela 2. Concentração inibitória de 50% de CuO-nr cit das linhagens MCF-7 e MCF 10A em 24, 48 e 72 horas.

Tempo	24 horas	48 horas	72 horas
MCF-7	35.97 $\mu\text{g. mL}^{-1}$	33.85 $\mu\text{g. mL}^{-1}$	16.63 $\mu\text{g. mL}^{-1}$
MCF10A	10.20 $\mu\text{g. mL}^{-1}$	12.46 $\mu\text{g. mL}^{-1}$	26.52 $\mu\text{g. mL}^{-1}$

Os valores obtidos pelo cálculo do IC₅₀ após tratamento com Cobre (Cu) revelam que para a linhagem MCF-7 a concentração inibitória é superior quando comparada aos resultados analisados para CuO-nr cit (Tabela 3), em contrapartida, para MCF10A exibem valores aumentados de IC₅₀ para o Cu livre quando comparados aos valores obtidos com a nanoestrutura. Esses resultados indicam a importância da formulação da nanopartícula.

Tabela 3. Concentração inibitória de 50% de Cu livre das linhagens MCF-7 e MCF 10A em 24, 48 e 72 horas

Tempo	24 horas	48 horas	72 horas
MCF7	44.10 $\mu\text{g. mL}^{-1}$	42.97 $\mu\text{g. mL}^{-1}$	27.81 $\mu\text{g. mL}^{-1}$
MCF 10A	28.82 $\mu\text{g. mL}^{-1}$	35.3 $\mu\text{g. mL}^{-1}$	38.31 $\mu\text{g. mL}^{-1}$

5.4. Alterações no perfil do ciclo celular de células MCF-7, MDA-MB-231 decorrentes do tratamento com CuO-nr cit

Para avaliar se CuO-nr influencia na progressão do ciclo celular, as células foram tratadas por 48 horas com a dose de IC₅₀ e, passado esse período receberam marcação com iodeto de propídio (PI) para análise em citômetro de fluxo. O conteúdo de DNA da população foi observado por meio da marcação com Iodeto de Propídeo (PI). Esse marcador é um intercalante de DNA, e com isso a quantidade de marcação presente na célula está relacionada à quantidade de DNA que essa célula possui. Assim com a análise por citometria de fluxo, é possível quantificar as populações em G₀/G₁; com 4N de DNA, populações em G₂/M; e as intermediárias, que estão

na fase S. Ainda, aquelas células cujo DNA está fragmenado apresentam uma quantificação de fluorescência abaixo do pico G0/G1, sendo então chamadas de pico sub-G1.

Os resultados obtidos através desta análise revelam que, para a linhagem tumoral da MCF-7 o tratamento com CuO-nr cit altera de forma significativa para a fase S, que teve sua porcentagem aumentada em relação ao controle não tratado. A linhagem MDA-MB-231 não apresentou alterações no perfil do ciclo celular quando comparadas ao controle.

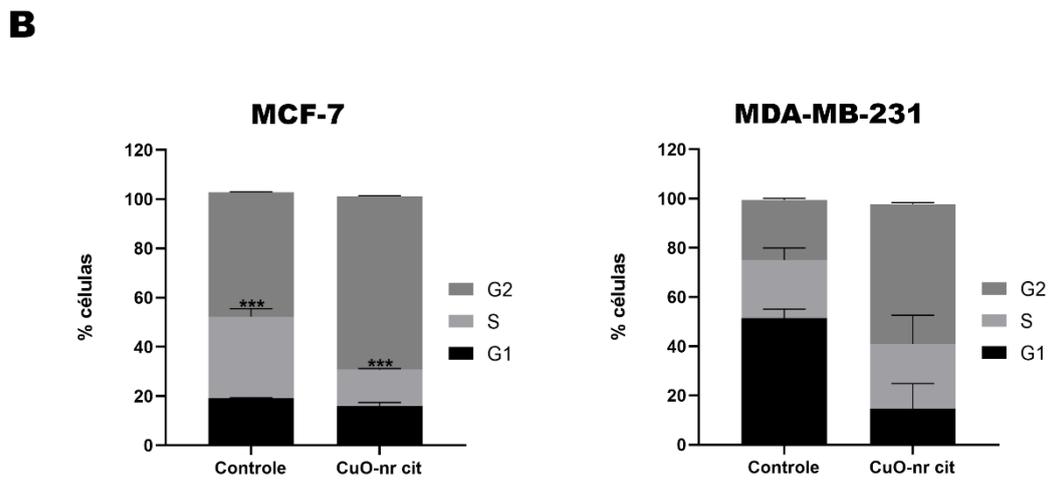
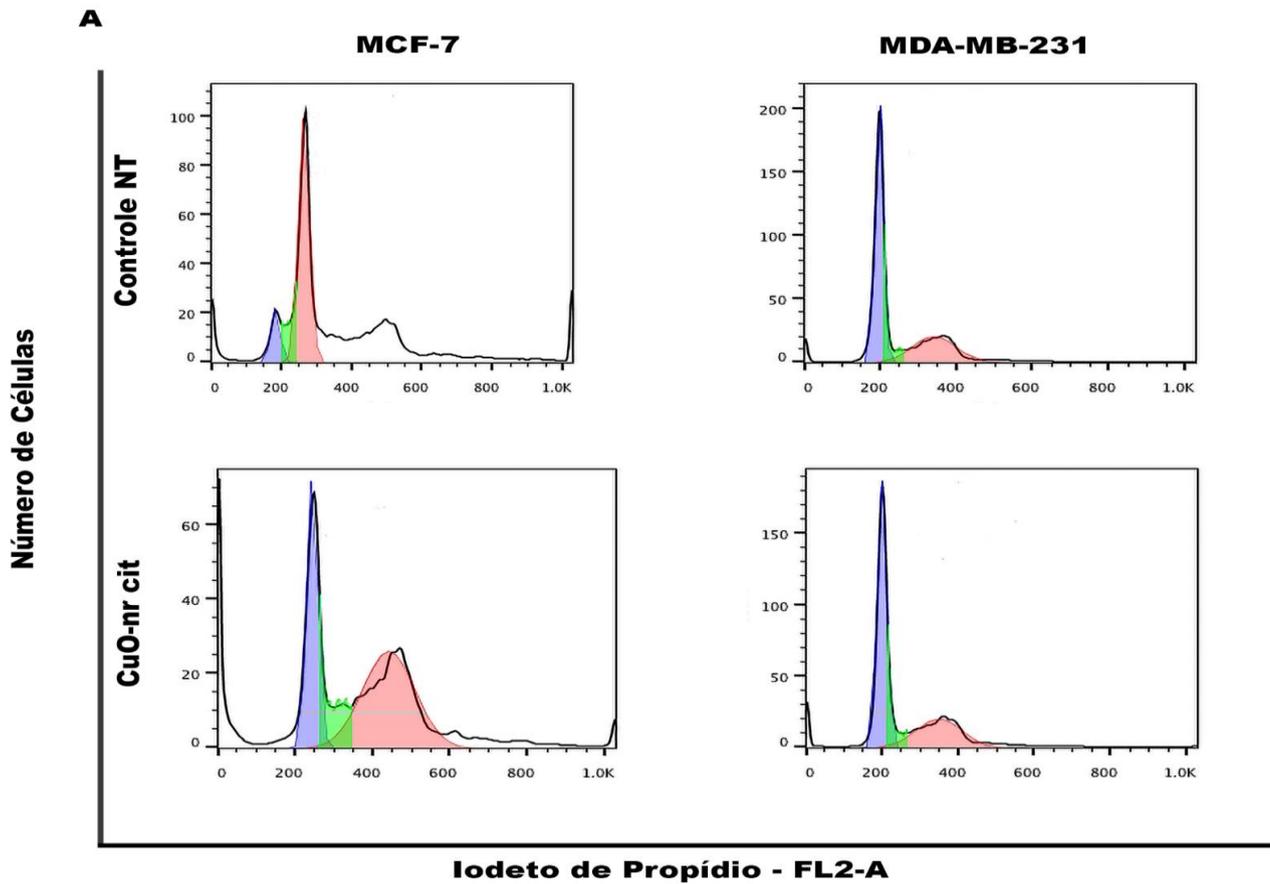


Figura 10. Avaliação do ciclo celular em células MCF-7 e MDA-MB-231 tratadas com CuO-nr cit (IC₅₀, 48 horas). (A) Histograma representativo das fases do ciclo celular pré e pós tratamento com a nanoestrutura. As cores do histograma representam as fases do ciclo celular, sendo azul para a fase G1, verde fase S e vermelho fase G2. (B) Quantificação percentual de células em cada fase do ciclo celular. Os dados representam três experimentos independentes, n=1, expressos como porcentagem média de células em cada fase do ciclo celular \pm SEM. ***P<0,001.

5.5. Análise do tipo de morte celular causada pelo tratamento com CuO-nr cit

Para o estudo do tipo de morte celular causada por CuO-nr cit, utilizou-se a concentração de 50 µg/mL. Após o tempo de incubação, 48 horas de tratamento, as células foram marcadas com Anexina-V e PI, marcadores que permitem avaliar subpopulações de células viáveis, apoptose e necrose.

Os resultados obtidos revelam que o tratamento induz prioritariamente, morte celular lítica em uma grande porcentagem de célula da MCF-7 (aproximadamente 55,2%) e uma porcentagem considerável (30,8%) de morte induzida por necrose. A linhagem MDA-MB-231 demonstrou ser resistente ao tratamento exibindo uma pequena porcentagem de células mortas (aproximadamente 14,5%) de morte celular lítica e 3,43% de morte por necrose.

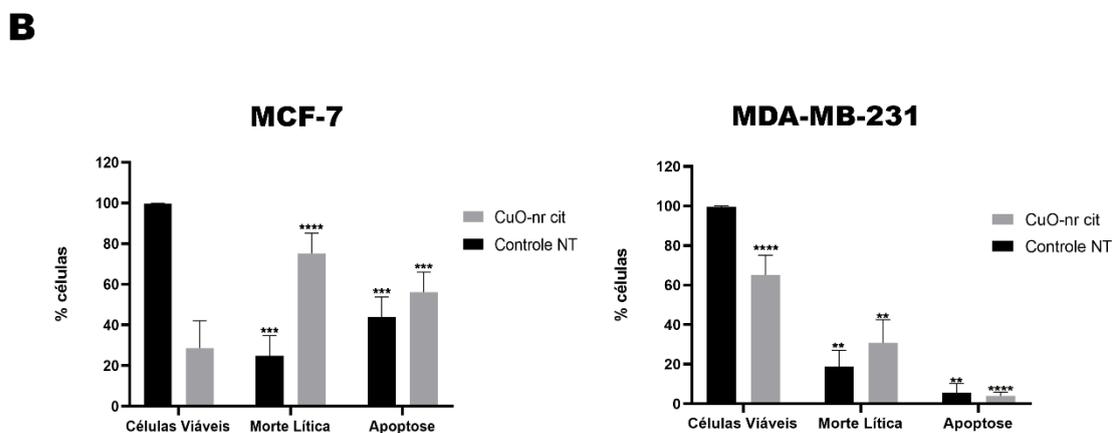
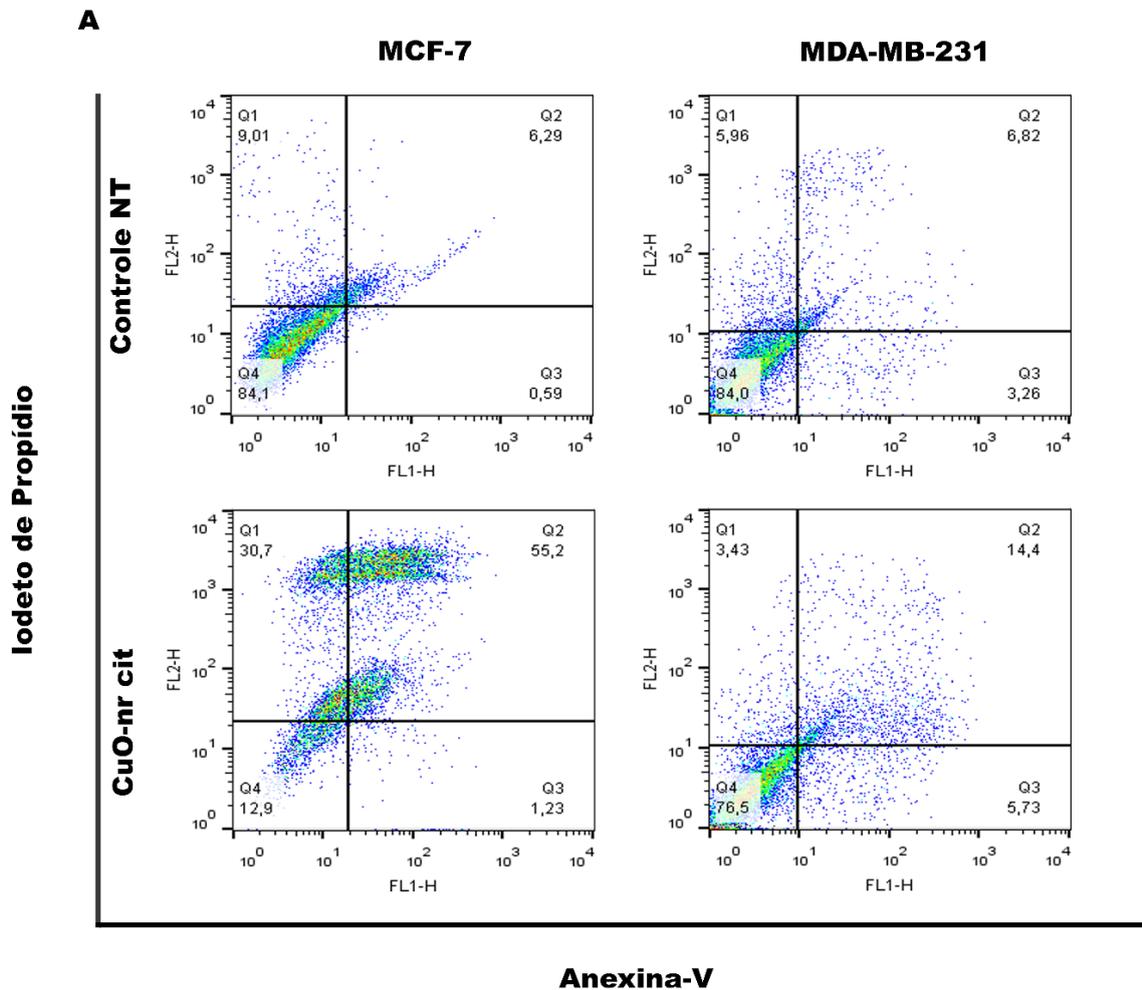


Figura 11. Avaliação do perfil de morte celular induzido por CuO-nr cit (50 µg/mL, 48 horas), em células MCF-7 e MDA-MB-231. (A) Distribuição das populações celulares de acordo com o perfil das marcações. Quadrante inferior esquerdo corresponde às células viáveis, inferior direito às células em apoptose, superior esquerdo às células necróticas e superior direito às mortes celulares líticas. (B) Representação gráfica dos perfil de morte celular com análise estatística. **P<0,01; ***P<0,001 e ****P<0,0001. Comparado ao controle não tratado.

6. Análises morfológicas

6.1. *Microscopia Luz e Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)*

A nanoestrutura CuO-nr foi capaz de induzir alterações morfológicas nas linhagens tumorais (MCF-7 e MDA-MB-231) estudadas. É possível observar nas imagens obtidas por microscopia de luz mostradas na Figura 12 uma diminuição do número de células aderidas quando comparadas à linhagem não tumoral (MCF10A). Além disso, a linhagem tumoral sofreu alterações morfológicas mais significativas, incluindo redução do tamanho celular, perda de pontos focais de adesão e projeções citoplasmáticas características, principalmente após 48 horas, sugerindo morte e/ou interrupção do ciclo celular em decorrência do tratamento. A linhagem não tumoral (MCF10A) sofreu pouca perda da quantidade e dos pontos de adesão e as alterações não foram tão significativas quanto na linhagem tumoral (Fig. 12). Pela microscopia eletrônica de varredura (Fig. 13) foi possível evidenciar, no grupo tratado, a perda da quantidade dos pontos de adesão das células tumorais. As imagens permitem observar alterações morfológicas nas superfícies celular que após o tratamento, adquiriu um aspecto mais arredondado e rugoso quando comparado ao controle. Na figura 13 é possível observar que as células tumorais MCF-7 e MDA-MB-231 reduzem de tamanho. A linhagem não tumoral MCF10A sofreu modificação em sua morfologia celular apresentando rugosidade em sua superfície quando observada em controles não tratados, entretanto, foi possível observar células com tamanhos e superfícies não foram alteradas em comparação com as células tumorais.

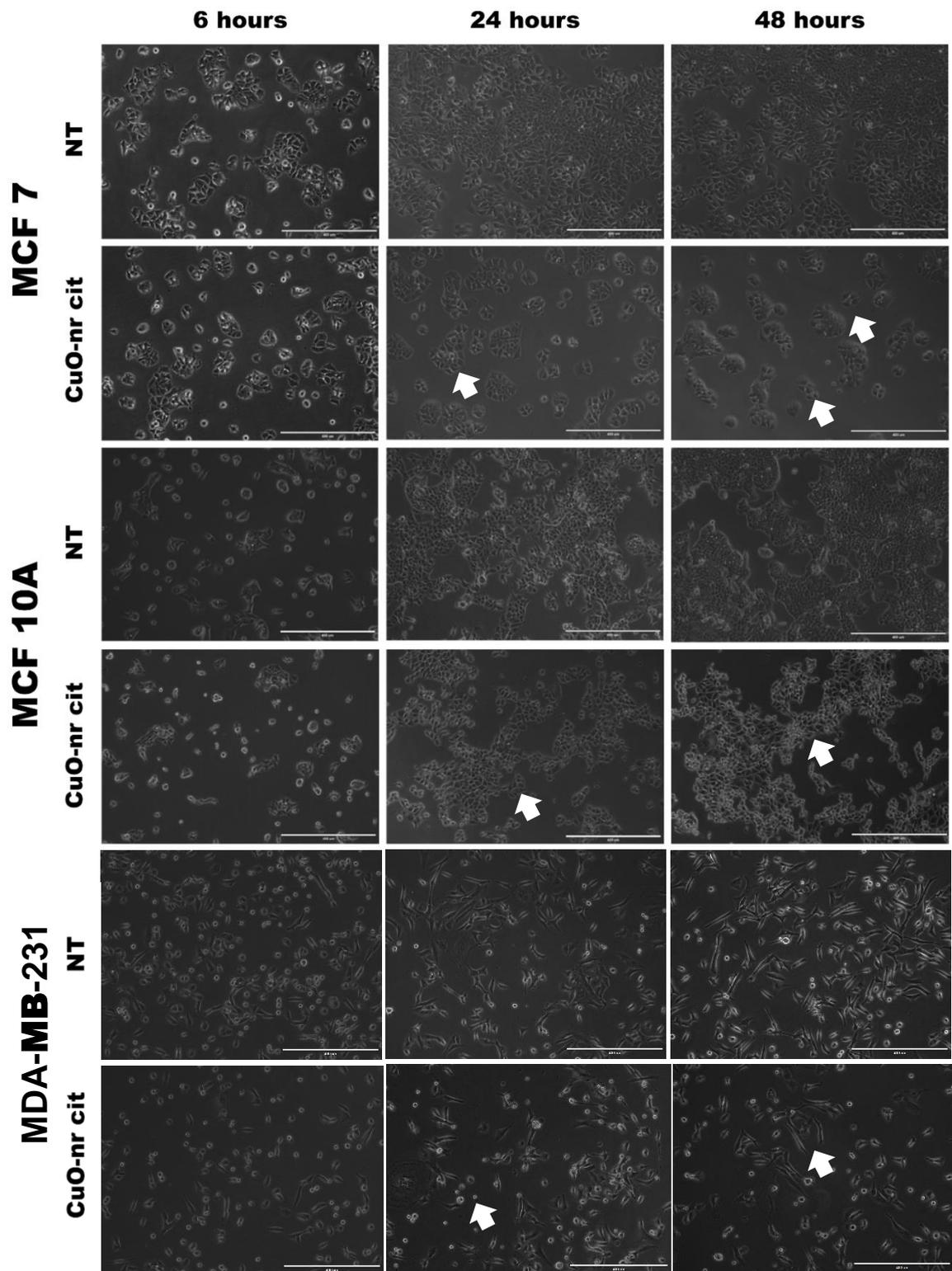


Figura 12. Avaliação da morfologia celular das linhagem tumoral (MCF-7, MDA-MB-231) e não tumoral (MCF10A) após 6, 24 e 48h de exposição ao tratamento de CuO-nr cit ($50 \mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$). Imagens de Microscopia de Luz (contraste de fase). NT (células sem tratamento) e células tratadas com CuO-nr cit após 48h ($50 \mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$).As setas indicam diminuição das células aderidas e tamanho celular Barra de Escala= $20 \mu\text{m}$

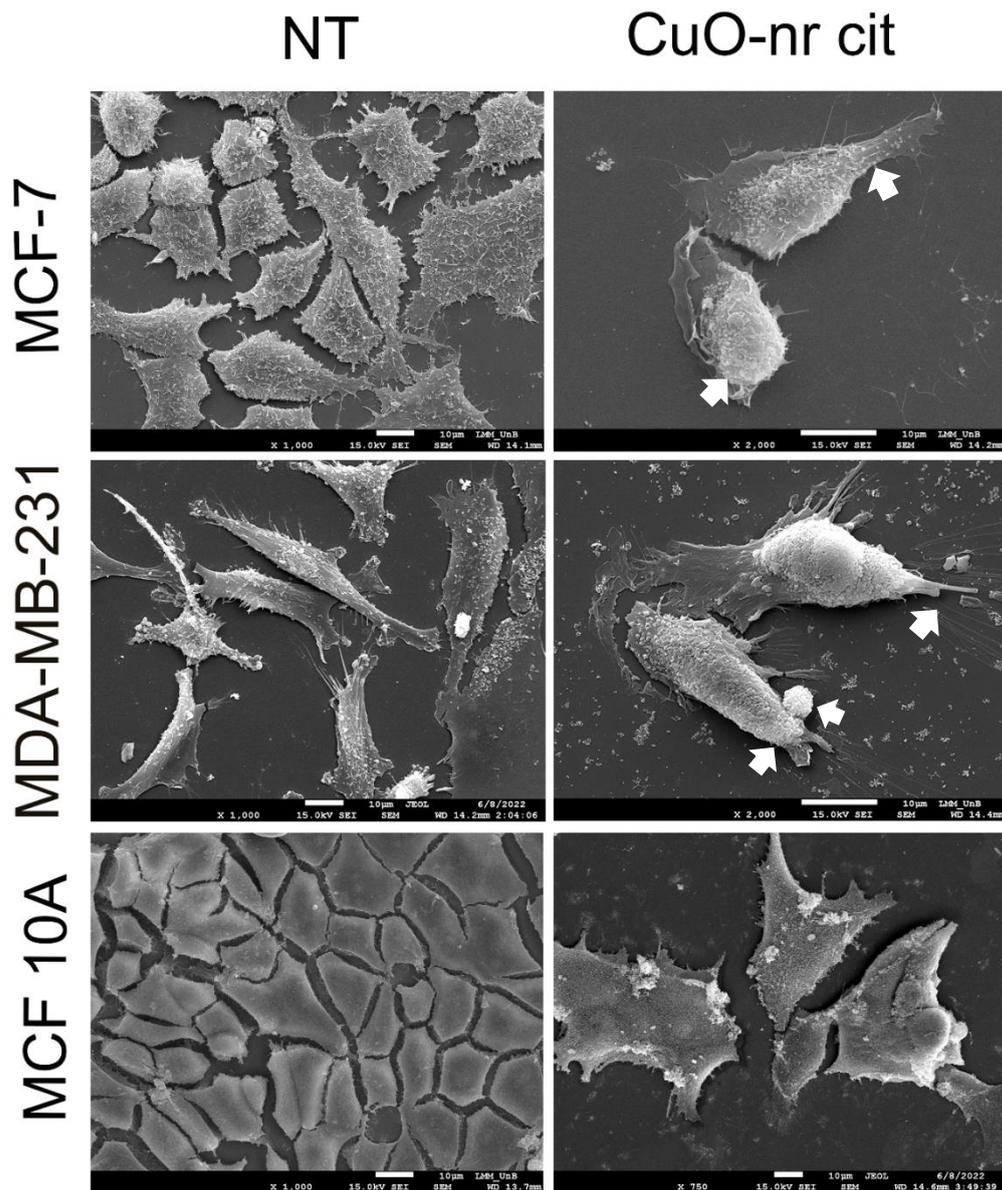


Figura 13. Alteração da morfologia das linhagens tumorais e não tumorais após exposição ao tratamento com CuO-nr cit. Microscopia Eletrônica de Varredura (SEM). NT (células sem tratamento) e células tratadas com CuO-nr cit após 48h ($50 \mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$). As setas brancas indicam prolongamentos citoplasmáticos. Barra de escala=10 μm

6.2. Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

Pela microscopia eletrônica de transmissão foi possível observar no tratamento de 3 horas e 48 horas a internalização da nanopartícula no citoplasma de ambas as linhagens. Na MCF-7 observa-se no interior dos lisossomos estruturas mais eletrodensas nas regiões periféricas que podem indicar a presença da nanoestrutura do tratamento após 48 horas. Destaca-se também a presença de material eletrodenso no interior dos vacúolos autofágicos de ambas as linhagens, o que também pode indicar a degradação dessas nanopartículas.

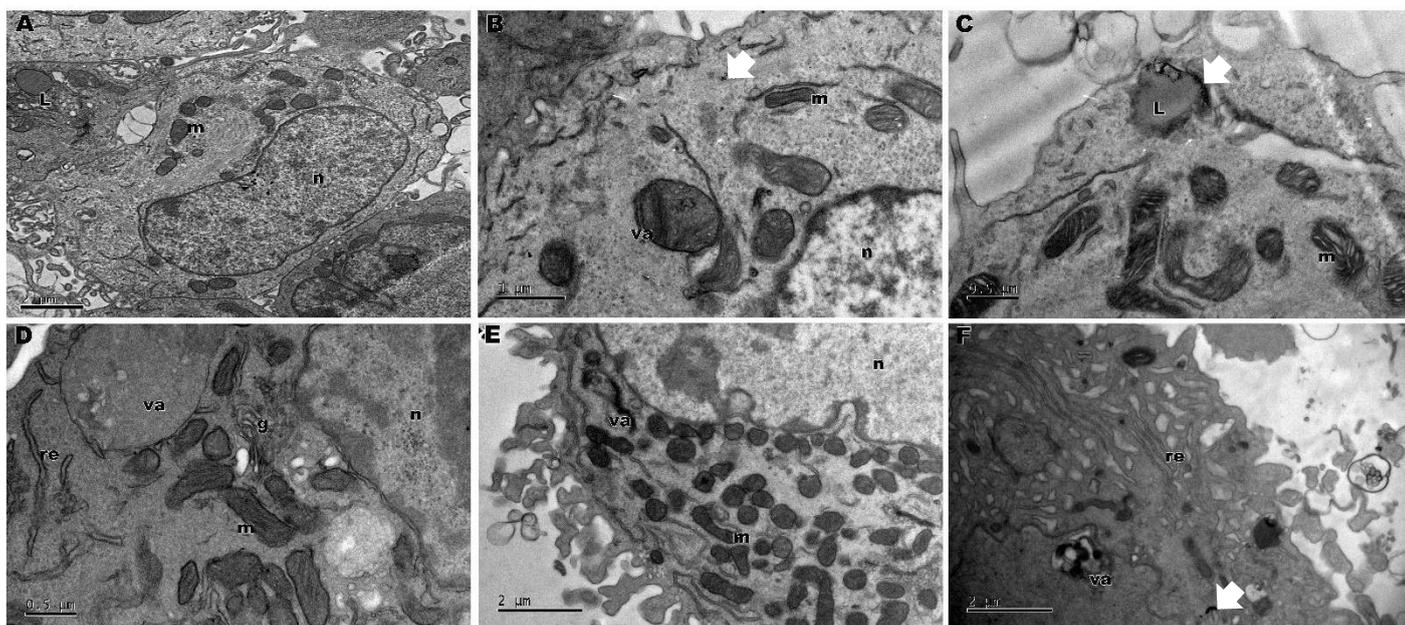


Figura 14. Avaliação da internalização das nanopartículas de CuO-nr cit nas linhagens tumorais MCF-7 e MDA-MB-231. Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM). (A) Controle MCF-7, (B) MCF-7 após três horas de tratamento, (C) MCF-7 após 48 horas de tratamento, (D) Controle MDA-MB-231, (E) MDA-MB-231 após 3 horas de tratamento e (F) MDA-MB-231 após 48 horas de tratamento. N= núcleo, L= lisossomos, re= retículo endoplasmático, g= complexo de golgi, va= vacúolos autofágicos e as setas brancas indicam as nanopartículas internalizadas.

7. Discussão

O câncer como uma das principais causas das taxas de mortalidade no mundo, requer uma intervenção imediata. A eliminação de células tumorais sem que ocorra danos às células normais vem sendo o principal desafio no tratamento do câncer [1-3]. O câncer consiste em uma enfermidade crônica, caracterizada pelo crescimento desordenado de células neoplásicas, o qual é resultante de alterações no material genético. Entre 5-10% dos cânceres são resultados diretos da herança de genes relacionados à neoplasia, mas a maior parte envolve danos ao material genético que se acumulam ao longo do tempo [4-7].

Estes danos podem ser de origem física, química ou biológica. O câncer de mama é o câncer mais comum em mulheres em todo mundo e a principal causa de morte relacionada ao gênero [8-10]. O uso de drogas quimioterápicas existentes tem suas desvantagens, como alto custo, efeitos colaterais graves podendo levar as células malignas a resistência. Portanto, há uma necessidade de tratamentos eficazes, baratos e com biocompatibilidade e efeitos colaterais mínimos [9,10].

A nanotecnologia, na forma de nanopartículas, pode melhorar as propriedades farmacológicas de drogas comumente utilizadas no tratamento e diagnóstico do câncer. Portanto, tornou-se uma forma inovadora de intervir no tratamento do câncer e direcionar drogas [11]. Isso geralmente pode ser obtido por várias vias de administração, como oral, nasal, intravenosa e outras. Para o tratamento, as nanopartículas podem não apenas aumentar a disponibilidade de medicamentos, mas também ter efeitos direcionados e seguros. O aumento da biodisponibilidade, promovendo a dispersão de drogas hidrofóbicas em meio aquoso, propriedades únicas (superparamagnetismo, plasmônica de superfície, etc.) [12-18].

Dentre os vários nanomateriais utilizados para esses fins, as nanopartículas de metais e óxidos metálicos desempenham um papel benéfico no tratamento do câncer por possibilitar melhor direcionamento, silenciamento de genes e entrega de drogas funcionalizadas com ligantes

que reduzem a entrega de energia ao tumor. Eles também são usados como uma ferramenta de diagnóstico para imagens de células cancerígenas, permitindo não apenas diagnóstico e terapia simultâneos, mas também administração controlada e direcionada de medicamentos [19,20]. As nanopartículas de óxido de cobre (NPs de CuO) têm sido utilizadas em diversos campos devido às suas excelentes propriedades termofísicas, catalíticas e antibacterianas. Além disso, eles têm um interesse crescente em aplicações biomédicas porque são biocompatíveis e se acumulam nos tecidos tumorais após administração sistêmica, induzindo a morte celular por apoptose, aumentando o estresse oxidativo, esgotando os antioxidantes celulares e causando disfunção mitocondrial [21, 22].

As aplicações de CuO NPs também se estendem à eletrônica, catálise, sensores, células solares, administração de medicamentos, agricultura, preservação de alimentos, têxteis, tintas, revestimentos e tratamento de água [21-24]. Em particular, o CuO em forma de nanobastão (Nr-CuO) mostrou propriedades melhoradas devido à sua maior relação superfície-volume em comparação com o CuO esférico [22]. Especificamente, no campo da medicina, biologia e ciências da vida, CuO NPs foram investigados para o desenvolvimento de drogas, transportadores de drogas e marcadores biológicos [25, 26].

Estudos recentes demonstraram a toxicidade mediada pelo estresse oxidativo de CuO NPs em várias linhagens de células humanas quando são capazes de induzir apoptose em células tumorais [27-29].

Após a síntese e caracterização das nanopartículas, foi realizada a avaliação da possível citotoxicidade de CuO-nr cit em células tumorais de mama (MCF-7 e MDA-MB-231) e em células normais (MCF10A) tendo em vista que esse tipo de estudo é quesito indispensável para o desenvolvimento de novos materiais com aplicações biomédicas.

O ensaio de viabilidade celular demonstrou que a linhagem tumoral MCF-7 foi mais sensível ao tratamento quando comparada com as linhagens MDA-MB-231 e MCF10A, além de elucidar sua toxicidade dose e tempo dependente. A linhagem não tumoral sofreu redução nos

seus parâmetros de viabilidade (~50%) e a sensibilidade foi mais significativa quando expostas a maiores concentrações por um tempo mais prolongado, sugerindo uma biocompatibilidade seletiva para as células tumorais [30-32]

Na literatura científica, tem se observado que as nanopartículas a base de óxido metálicos podem ser consideradas biocompatíveis e não provocarem alta toxicidade em células cultivadas com uma concentração abaixo de 50 µg/mL, fato que corrobora com os resultados encontrados após os testes com CuO-nr cit realizado no presente trabalho [33-34].

Os valores obtidos pelo cálculo do IC₅₀ após tratamento com Cobre (Cu) revelam que para a linhagem MCF-7 a concentração inibitória é superior quando comparada aos resultados analisados para CuO-nr cit, em contrapartida, para MCF10A exibem valores aumentados de IC₅₀ para o Cu livre quando comparados aos valores obtidos com a nanoestrutura. Esse aspecto é considerado favorável tendo em vista que diversos agentes utilizados para o combate ao câncer apresentam alta citotoxicidade para as células normais [35-38].

Por citometria de fluxo foi possível concluir que a morte celular por necrose foi o principal tipo de morte causada pela nanoestrutura, fato interessante a ser estudado com o objetivo de ativação do sistema imunológico para o tratamento do câncer [39-44]. Estudos atuais demonstram a importância da atuação do sistema imune para a terapia do câncer, tendo em vista que o melhor tratamento para essa doença não consiste apenas na erradicação do tumor primário, mas também na ativação do sistema imunológico para reconhecer, rastrear e destruir todas as células tumorais remanescentes que estejam localizadas próximas ao local do tumor primário ou nas micrometástases em diferentes órgãos do corpo do paciente [44,45]. A destruição de células tumorais por meio da indução de apoptose e necrose é um aspecto importante quando se aborda a utilização das células imunológicas em terapias antitumorais [46-47].

No caso da necrose, os constituintes citosólicos que extravasam para o ambiente extracelular através do dano à membrana plasmática provocam um processo inflamatório mais robusto do que a morte celular programada, em que esses produtos são isolados com segurança pela membrana intacta que persistem em células apoptóticas [48-52].

Um fato a ser considerado no desenvolvimento do trabalho é a atividade de CuO-nr cit na linhagem MDA-MB-231 onde foi possível observar a internalização e a mudança na sua morfologia pelas microscopias, nessa linhagem foi observada uma redução significativa da sua viabilidade celular nos tempos e nas concentrações estudadas. Os resultados obtidos nos demais ensaios para MDA-MB-231 sugerem a necessidade de um estudo mais aprofundado acerca dos possíveis mecanismos envolvidos em sua resistência pela CuO-nr cit [53-55].

Em resumo, os resultados obtidos neste estudo disponibilizam evidências sobre a utilização de nanopartículas à base de óxidos metálicos no tratamento do câncer de mama. O nanossistema desenvolvido (CuO-nr cit) foi capaz de ocasionar em morte celular necrótica em uma das duas linhagens tumorais estudadas (MCF-7). CuO-nr cit apresentou uma importante atividade oxidativa na linhagem MCF-7, com uma baixa toxicidade para células normais, revelando uma grande vantagem sobre os fármacos atualmente desenvolvidos no combate dessa doença. Desse modo, a composição do nanossistema desenvolvido além de apresentar resultados promissores na citotoxicidade de células tumorais, pode também se tornar um grande agente de diagnóstico precoce e de ativação do sistema imunológico para o reconhecimento e combate de células tumorais localizadas próximas ao tumor primário.

8. Conclusão

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

- A nanopartícula desenvolvida apresentou diâmetro hidrodinâmico de 107.1 nm e potencial zeta de -23.8, valores que contribuem com sua internalização celular e estabilidade ao longo do tempo observado;
- A linhagem MCF-7 mostrou-se mais sensíveis ao nanossistema com o IC₅₀ de 33,85 µg/mL, apresentando uma redução expressiva da viabilidade celular (~60%);
- A linhagem não tumoral apresentou uma sensibilidade à nanoestrutura (~60%), mas uma recuperação celular após 72h de exposição ao tratamento.
- Por microscopia de luz e de varredura foi possível observar que CuO-nr cit induz alterações morfológicas nas linhagens tumorais estudadas, como perda dos prolongamentos citoplasmáticos e aumento da rugosidade na superfície celular;
- A nanoestrutura foi capaz de alterar significativamente o perfil do ciclo celular na linhagem MCF-7;
- A linhagem MDA-MB-231 foi sensível (~50%) aos ensaios propostos mesmo após a internalização da nanopartícula.

9. Perspectivas

As perspectivas propostas para a continuidade deste trabalho são:

- Aperfeiçoar a síntese da nanoestrutura afim da diminuição dos efeitos citotóxicos em células normais;
- Investigar a atividade de CuO-nr cit na ativação do sistema imunológico *in vivo*;
- Avaliar os mecanismos envolvidos na resistência da célula MDA-MB-231;
- Investigar outros possíveis mecanismos de morte celular que envolve a nanoestrutura;
- Avaliar *in vivo* os efeitos da terapia mediada por CuO-nr cit por meio de análises clínicas, bioquímicas, hematológicas assim como a regressão tumoral e sobrevida de ratos;

10. Referências bibliográficas

1. INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (Brasil). **Estimativa/2021. Incidência de Câncer no Brasil**, Rio de Janeiro: INCA; 2021. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files//media/document//estimativa-incidencia-de-cancer-no-brasil-2018.pdf>>. Data de acesso: 12 de junho de 2021.
2. SIEGEL, R. L.; MILLER, K. D.; JEMAL, A. **Cancer statistics, 2020**. CA: A Cancer Journal for Clinicians, v. 70, n. 1, p. 7-30, 2020.
3. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Cancer**. Disponível em: < https://www.who.int/health-topics/cancer#tab=tab_1>. Data de acesso: 10 de janeiro de 2020.
4. CARNEIRO, L. B. M *et al.* **Antitumor effect and toxicity of free rhodium (II) citrate and rhodium (II) citrate-loaded maghemite nanoparticles in mice bearing breast cancer**. Journal of Nanobiotechnology, v. 11, n. 1, p. 1-13, 2013.
5. SILVA, L. G. A *et al.* **Methylene blue associated with maghemite nanoparticles has antitumor activity in breast and ovarian carcinoma cell lines**. Cancer Nanotechnology, v. 12, n. 1, p. 1-21, 2021.
6. WAKS, Adrienne G.; WINER, Eric P. **Breast cancer treatment: a review**. Jama, v. 321, n. 3, p. 288-300, 2019.
7. BRITT, Kara L.; CUZICK, Jack; PHILLIPS, Kelly-Anne. **Key steps for effective breast cancer prevention**. Nature Reviews Cancer, v. 20, n. 8, p. 417-436, 2020.
8. SEMMLER, L.; R. B, C.; KLEIN, A. **BRCA1 and Breast Cancer: a Review of the Underlying Mechanisms Resulting in the Tissue-Specific Tumorigenesis in Mutation Carriers**. Journal of Breast Cancer, v. 22, n. 1, p. 1-14, 2019.
9. ELLISON, L. M.; MAN, Y.; STOJADINOVIC, A.; XIN, H.; AVITAL, I. **Cytoreductive surgery and hyperthermic intraperitoneal chemotherapy in**

- treatment of gastric cancer with peritoneal carcinomatosis.** Chinese Journal of Cancer Research, v. 29, n. 1, p. 86, 2017.
10. LATTANZIO, Rossano *et al.* **PLC-gamma-1 phosphorylation status is prognostic of metastatic risk in patients with early-stage Luminal-A and-B breast cancer subtypes.** BMC cancer, v. 19, n. 1, p. 1-10, 2019.
 11. PAN, Xiaoyong *et al.* **Identification of the copy number variant biomarkers for breast cancer subtypes.** Molecular Genetics and Genomics, v. 294, n. 1, p. 95-110, 2019.
 12. FOUGNER, Christian *et al.* **Re-definition of claudin-low as a breast cancer phenotype.** Nature communications, v. 11, n. 1, p. 1-11, 2020.
 13. HEITZ, A. E.; BAUMGATNER, R. N.; BAUMGARTNER, K. B.; BOONE, S. D. **Healthy lifestyle impact on breast cancer-specific and all-cause mortality.** Breast cancer research and treatment, v. 167, n. 1, p. 171-181, 2017.
 14. DENSHAM, M. R.; MORRIS, R. J. **The BRCA1 Ubiquitin ligase function sets a new trend for remodelling in DNA repair.** Nucleus, v. 8, n. 2, p. 116-125, 2017.
 15. NELSON, D. J. *et al.* **A comparative study of pain experienced during successive mammography examinations in patients with a family history of breast cancer and those who have had breast cancer surgery.** Radiography, v. 26, n. 1, p. 76-81, 2020.
 16. BEIK, J. *et al.* **Nanotechnology in hyperthermia cancer therapy: From fundamental principles to advanced applications.** Journal of Controlled Release, v. 235, p. 205-221, 2016.
 17. BENKO, Heather. ISO technical committee 229 nanotechnologies. **Metrology and standardization of nanotechnology: protocols and industrial innovations,** p. 259-268, 2017.

18. YAO, L.V. *et al.* **Targeted delivery and controlled release of doxorubicin into cancer cells using a multifunctional graphene oxide.** *Materials Science and Engineering: C*, v. 59, p. 652-660, 2016.
19. WERNER, M. E.; FOOTE, M. B.; WANG, A. Z. **Chemoradiotherapy of Human Tumors: Novel Approaches from Nanomedicine.** *Curr. Pharm. Des.*, v. 18, n. 19, p. 2830-2837, 2012.
20. MISHRA, P. K.; MISHRA, H.; EKIELSKI, A.; TALEGAONKAR, S.; VAIDYA, B. **Zinc oxide nanoparticles: a promising nanomaterial for biomedical applications.** *Drug discovery today*, v. 22, n. 12, p. 1825-1834, 2017.
21. GOLDBERG, M. S. **Improving cancer immunotherapy through nanotechnology.** *Nature Reviews Cancer*, v. 19, n. 10, p. 587-602, 2019.
22. NIE, S. *et al.* **Nanotechnology applications in cancer.** *Annu. Rev. Biomed. Eng.*, v. 9, p. 257-288, 2007.
23. RANA, K. L. *et al.* **Endophytic microbes in nanotechnology: current development, and potential biotechnology applications.** In: *Microbial Endophytes*. Woodhead Publishing, 2020. p. 231-262.
24. MIRZAEI, M. **Nanotechnology for science and engineering.** *Advanced Journal of Science and Engineering*, v. 1, p. 67-68, 2020.
25. RAJITHA, B. *et al.* **Horizons of nanotechnology applications in female specific cancers.** In: *Seminars in cancer biology*. Academic Press, 2021. p. 376-390.
26. CHERUKURI, P.; GLAZER, E. S.; CURLEY, S. A. **Targeted hyperthermia using metal nanoparticles.** *Advanced delivery: delivery reviews*, v. 62, n. 3, p. 339-345, 2010.
27. SHARMA, A.; GOYAL, A.K.; RAT, G. **Recent advances in metal nanoparticles in cancer therapy.** *Journal of drug targeting*, v. 26, n. 8, p. 617-632, 2018.
28. THOUNAOJAM, M. C. *et al.* **Oxidative stress induced apoptosis of human lung**

- carcinoma (A549) cells by a novel copper nanorod formulation.** Food and chemical toxicology, v. 49, n. 11, p. 2990-2996, 2011.
29. KIM, K. *et al.* **Electrochemically derived CuO nanorod from copper-based metal-organic framework for non-enzymatic detection of glucose.** Applied Surface Science, v. 479, p. 720-726, 2019.
30. WU, C. W. *et al.* **Self-templated formation of aptamer-functionalized copper oxide nanorods with intrinsic peroxidase catalytic activity for protein and tumor cell detection.** Sensors and Actuators B: Chemical, v. 227, p. 100-107, 2016.
31. LYU, J. *et al.* **Copper oxide nanoparticles promote α -synuclein oligomerization and underlying neurotoxicity as a model of Parkinson's disease.** Journal of Molecular Liquids, v. 323, p. 115051, 2021.
32. VERMA, N; KUMAR, N. **Synthesis and biomedical applications of copper oxide nanoparticles: an expanding horizon.** ACS Biomaterials Science & Engineering, v. 5, n. 3, p. 1170-1188, 2019.
33. MISRA, S. K. *et al.* **Comparative study using spheres, rods and spindle-shaped nanoplatelets on dispersion stability, dissolution and toxicity of CuO nanomaterials.** Nanotoxicology, v. 8(4), p. 422–432, 2014.
34. VINARDELL, M. P; MITJANS, M. **Antitumor activities of metal oxide nanoparticles.** Nanomaterials, v. 5, n. 2, p. 1004-1021, 2015.
35. JERONSIA, J. E. *et al.* **In vitro antibacterial and anticancer activity of copper oxide nanostructures in human breast cancer Michigan Cancer Foundation-7 cells.** Journal of Medical Sciences, v. 36, n. 4, p. 145, 2016.
36. FAHMY, H. M; EBRAHIM, N. M; GABER, M. H. **In-vitro evaluation of copper/copper oxide nanoparticles cytotoxicity and genotoxicity in normal and cancer lung cell lines.** Journal of Trace Elements in Medicine and Biology, v. 60, p. 126481, 2020.

37. SIDDIQUI, M. A. *et al.* **Copper oxide nanoparticles induced mitochondria mediated apoptosis in human hepatocarcinoma cells.** PloS one, v. 8, n. 8, p. e69534, 2013.
38. DU, G. H.; VAN TENDELOO, G. **Cu (OH) 2 nanowires, CuO nanowires and CuO nanobelts.** Chemical Physics Letters, v. 393, n. 1-3, p. 64-69, 2004.
39. HAJRA, K. M.; LIU, J. R. **Apoptosome dysfunction in human cancer.** Apoptosis, v. 9, n. 6, p. 691-704, 2004.
40. ZHANG, Q. *et al.* **CuO nanostructures: synthesis, characterization, growth mechanisms, fundamental properties, and applications.** Progress in Materials Science, v. 60, p. 208-337, 2014.
41. DEBBICHI, L. *et al.* **Vibrational properties of CuO and Cu₄O₃ from first-principles calculations, and Raman and infrared spectroscopy.** The Journal of Physical Chemistry C, v. 116, n. 18, p. 10232-10237, 2012.
42. DHINESHBABU, N. R.; RAJENDRAN, V.; NITHYAVATHY, N.; VETUMPERUMAL, R. **Study of Structural and Optical Properties of Cupric Oxide Nanoparticles.** Appl. Nanosci. 2016, 6 (6), 933–939
43. PANDURANGAN, M. *et al.* **Anti-proliferative effect of copper oxide nanorods against human cervical carcinoma cells.** Biological trace element research, v. 173, n. 1, p. 62-70, 2016.
44. KHAN, S. *et al.* **In vitro evaluation of cytotoxicity, possible alteration of apoptotic regulatory proteins, and antibacterial activity of synthesized copper oxide nanoparticles.** Colloids and surfaces B: biointerfaces, v. 153, p. 320-326, 2017.
45. WANG, W. *et al.* **Synthesis of CuO nano-and micro-structures and their Raman spectroscopic studies.** CrystEngComm, v. 12, n. 7, p. 2232-2237, 2010.
46. DHINESHBABU, N. R. *et al.* **Study of structural and optical properties of cupric**

- oxide nanoparticles.** Applied Nanoscience, v. 6, n. 6, p. 933-939, 2016.
47. AHAMED, M. *et al.* **Selective killing of cancer cells by iron oxide nanoparticles mediated through reactive oxygen species via p53 pathway.** Journal of nanoparticle research, v. 15, n. 1, p. 1-11, 2013.
48. LAHA, D. *et al.* **Interplay between autophagy and apoptosis mediated by copper oxide nanoparticles in human breast cancer cells MCF7.** Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects, v. 1840, n. 1, p. 1-9, 2014.
49. AKHTAR, M. J. *et al.* **Selective cancer-killing ability of metal-based nanoparticles: implications for cancer therapy.** Archives of toxicology, v. 89, n. 11, p. 1895-1907, 2015.
50. FESTJENS, N; BERGHE, V. T; VANDENABEELE, P. **Necrosis, a well-orchestrated form of cell demise: signalling cascades, important mediators and concomitant immune response.** Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics, v. 1757, n. 9-10, p. 1371-1387, 2006.
51. GOLDBERG, M. S. **Improving cancer immunotherapy through nanotechnology.** Nature Reviews Cancer, v. 19, n. 10, p. 587-602, 2019.
52. GOLSTEIN, P; KROEMER, G. **Cell death by necrosis: towards a molecular definition.** Trends in biochemical sciences, v. 32, n. 1, p. 37-43, 2007.
53. HUNAKOVA, L. *et al.* **In vitro antiproliferative and cytotoxic activities of novel triphenyltin isoselenocyanate in human breast carcinoma cell lines MCF 7 and MDA-MB-231.** Medical Oncology, v. 39, n. 5, p. 1-9, 2022.
54. BANERJEE, P. P. *et al.* **Mentha arvensis (Linn.)-mediated green silver nanoparticles trigger caspase 9-dependent cell death in MCF7 and MDA-MB-231 cells.** Breast Cancer: Targets and Therapy, v. 9, p. 265, 2017.
55. BASS, R. *et al.* **Synthesis and Biological Evaluation of Amidinourea and Triazine Congeners as Inhibitors of MDA-MB-231 Human Breast Cancer Cell**

Proliferation. ChemMedChem, v. 12, n. 4, p. 288-291, 2017.

