

# RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)  
autor(a), o texto completo desta  
tese será disponibilizado somente a  
partir de 24/11/2017.



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**  
**“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

**CHARLENE PRISCILA KIILL**

**NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANA CONTENDO INIBIDORES DE**  
**INTEGRINAS COMO POTENCIAIS SISTEMAS DE LIBERAÇÃO PARA TERAPIA**  
**E DIAGNÓSTICO POR IMAGEM EM CÂNCER**

Araraquara - SP

2016

**CHARLENE PRISCILA KIILL**

**NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANA CONTENDO INIBIDORES DE  
INTEGRINAS COMO POTENCIAIS SISTEMAS DE LIBERAÇÃO PARA TERAPIA  
E DIAGNÓSTICO POR IMAGEM EM CÂNCER**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Palmira Daflon Gremião

Araraquara - SP

2016

**Ficha Catalográfica**

Elaborada Por Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas  
UNESP – Campus de Araraquara

**K47n**

Kiill, Charlene Priscila

Nanopartículas de quitosana contendo inibidores de integrinas como potenciais sistemas de liberação para terapia e diagnóstico por imagem em câncer / Charlene Priscila Kiill. – Araraquara, 2016.  
214 f.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos.

Orientadora: Maria Palmira Daflon Gremião

1. Desintegrinas. 2. Diagnóstico por imagem. 3. Gadolínio. 4. Integrinas. 5. Nanopartículas. 6. Quitosana. I. Gremião, Maria Palmira Daflon, orient. I. Título.

**CAPES: 50700006**

## CHARLENE PRISCILA KIILL

### “NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANA CONTENDO INIBIDORES DE INTEGRINAS COMO POTENCIAIS SISTEMAS DE LIBERAÇÃO PARA TERAPIA E DIAGNÓSTICO POR IMAGEM EM CÂNCER”

---

A Comissão Julgadora dos trabalhos de defesa de Tese de  
Doutorado, em sessão pública realizada em 24/05/2016, considerou a candidata

**Charlene Priscila Kiill:**

( ) REPROVADA

( X ) APROVADA

1) Examinadora (*Profa. Dra. Elenara Maria Teixeira Lemos Senna*) \_\_\_\_\_

2) Examinador (*Prof. Dr. Marcelo Bispo de Jesus*) \_\_\_\_\_

3) Examinadora (*Profa. Dra. Heloisa Sobreiro Selistre de Araujo*) \_\_\_\_\_

3) Examinadora (*Profa. Dra. Beatriz Stringhetti Ferreira Cury*) \_\_\_\_\_

3) Presidente (*Profa. Dra. Maria Palmira Daflon Gremião*) \_\_\_\_\_

---

*Charlene Priscila Kiill*

*Dedico este trabalho aos meus pais  
Maria Isabel e Carlos Kiill e minha irmã Chaielen.*

***"Para realizar grandes conquistas, devemos não apenas agir, mas  
também sonhar; não apenas planejar, mas também acreditar."***

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus, que me permitiu superar todos os obstáculos e alcançar tantas conquistas.

À minha mãe e meu pai, que me ensinaram que devemos sempre manter a humildade e que devemos sempre seguir pelo caminho do bem sem fazer mal a ninguém. Agradeço também por todo amor, carinho, dedicação e cuidado que tens por mim.

À minha família, em especial a minha irmã, aos meus avós Maria Geni e Osvaldo, minha madrinha e avó Celestrina (*in memoriam*) por sempre acreditarem em mim.

À minha querida orientadora Profa. Dra. Maria Palmira Daflon Gremião, por toda a paciência e dedicação, por ter me recebido de braços abertos e ter confiado que eu seria capaz. Sou inteiramente grata por sua orientação e acima de tudo amizade, meu respeito e admiração ultrapassam esta tese.

À Profa. Dra. Cristina Helena Bruno, minha amiga, pela sabedoria transmitida e pela amizade, além da colaboração em muitas discussões. Meu muitíssimo obrigado.

À Profa. Dra. Heloísa Sobreiro Selistre de Araújo, por ter me dado a oportunidade de trabalhar com a DisBa-01, por toda a orientação prestada e pela contribuição para a realização deste trabalho.

À Profa. Dra. Ana Marisa Fusco, do núcleo de Proteômica da Unesp de Araraquara, por ter cedido as células para cultura celular e por ter aberto as portas do seu laboratório para a realização destes ensaios.

À técnica do laboratório de Proteômica da Unesp de Araraquara, a Claudinha, por toda ajuda na cultura de células, análise nos citometro de fluxo e nos experimentos de morte celular, muito obrigada, sem sua ajuda não seria possível.

## *Agradecimentos*

---

À Profa. Amélia da Universidade de Trás os Montes e Alto Douro (UTAD), Portugal, pela colaboração nos estudos de cultura celular.

À Profa. Dra. Ana Maria Battastini e seu aluno de doutorado Fabrício do Departamento de Bioquímica da UFRGS – Porto Alegre, pela colaboração nos experimentos de cultura de células.

Ao Departamento de Físico-Química pelas nas análises de infravermelho realizadas no Instituto de Química da UNESP – Araraquara.

Ao Laboratório de Multiusuários no Instituto de Química da UNESP – Araraquara pelas análises de dicroísmo circular.

Ao Prof. Dr. Marcelo Ornaghi Orlandi do Laboratório de Microscopia por Varredura de Alta Resolução do Instituto de Química da UNESP – Araraquara pela utilização do Microscópio Eletrônico de Varredura.

Ao Prof. Dr. Hernane Barud que além de ser um grande pesquisador é um grande amigo, obrigada pelas imensas discussões e aprendizado. Obrigada pela colaboração em toda a tese e em muitos projetos que ainda temos por realizar.

À Pesquisadora Silvia Santagneli do Instituto de Química da UNESP- Araraquara, pela imensa colaboração com as análises de RMN.

À University of Southern California, Los Angeles, Profa. Florence Hofman, Radu Minea, Thomas Chen, Francis Markland, Steve Swenson, Niyati, Pooja, Mickey, Rachel, Shayane, Tuan, Camelia. Obrigada pelo aprendizado, paciência e amizade.

À Ana Luiza, meu porto seguro, amiga e companheira em todas as horas de alegrias e dificuldades. Obrigada pelas discussões, correções, pela paciência e carinho e por me ouvir, me ensinar e me guiar. Com certeza, sem essa sua cumplicidade e carinho tudo seria



## *Agradecimentos*

---

impossível. Sou muito grata por tudo! Obrigada por ter contribuído para meu crescimento como pesquisadora, sem sua visão e conhecimento eu não teria evoluído.

Ao meu amigo Leonardo Miziara pela amizade e oportunas manifestações de companheirismo, além de muitas discussões sobre este trabalho.

Aos meus amigos do Laboratório de Farmacotécnica pela alegre convivência, longas conversas, sugestões e, sobretudo, amizade. A vocês, muito obrigada!

Às minhas amigas Camila, Luzinete, Michele, que apesar de não terem dividido o mesmo laboratório, e mesmo estando longe, sempre me apoiaram e participaram de cada conquista, me encorajando e torcendo. Obrigada pela amizade sincera de vocês.

Aos meus amigos que conheci no doutorado sanduíche, Paulo e Dayson, pela amizade e inúmeras discussões sobre ciência.

Aos técnicos e funcionários do Departamento de Fármacos e Medicamentos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP – Araraquara, pelo auxílio e amizade, em especial à Natália, Margareth e à Fátima.

Às funcionárias da Secretaria da Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP pelo apoio e dedicação.

À FAPESP pelo suporte financeiro.

A todos que eventualmente eu tenha esquecido de citar os nomes e que foram de extrema importância para a realização deste projeto.

"Deus não falou que seria fácil, mas sim que valeria a pena"

Dom Bosco

## RESUMO

Os glioblastomas multiformes (GBMs) são os tumores mais invasivos do sistema nervoso central (SNC) e sua invasividade está relacionada com a interação entre glicoproteínas da matriz extracelular com integrinas presentes nas células tumorais. As integrinas  $\alpha_5\beta_1$ ,  $\alpha_v\beta_5$ , e  $\alpha_v\beta_3$  são fortemente expressas em GBMs, e podem ser utilizadas como moléculas alvo na terapia e no diagnóstico por imagem dos tumores do SNC. Os inibidores de integrinas cRGDfV, cRGDfK e vicrostatin têm sido estudadas no tratamento de GBMs pois inibem as integrinas  $\alpha_v\beta_3$ ,  $\alpha_v\beta_5$  e  $\alpha_5\beta_1$ , e, assim, exibem potentes propriedades antitumorais. Entretanto, a aplicação de proteínas terapêuticas é limitada frequentemente pela baixa estabilidade em fluídos fisiológicos e a baixa penetração através das membranas biológicas. Para contornar estes problemas, tem-se buscado novos sistemas de liberação de fármacos e rotas alternativas de administração, como por exemplo, a via nasal. Assim, este trabalho teve como objetivo a encapsulação dos peptídeos cRGDfV e cRGDfK em nanopartículas de quitosana, pelo método de gelificação ionotrópica, empregando o planejamento fatorial  $2^3$ . Este sistema baseado em quitosana promoveu um aumento da mucoadesão e podem auxiliar o acesso dos peptídeos cRGDfV e cRGDfK ao SNC pela via nasal. Outra estratégia utilizada nesse trabalho foi a utilização das nanopartículas de quitosana escolhidas no planejamento fatorial para serem modificadas com PEG por meio de interações supramoleculares e também por interações covalentes com metoxil polietilenoglicol e maleimida polietilenoglicol hidroxissucimida. As nanopartículas modificadas por interações covalentes foram funcionalizadas através do acoplamento do peptídeo cRGDfK na superfície das nanopartículas, a fim de promover um aumento do direcionamento das nanopartículas para o ambiente tumoral por meio de interações específicas com as integrinas superexpressas nos GBMs. Também foram desenvolvidas nanopartículas teranósticas de carboximetilquitosana com agente de contraste gadolínio-dietilenotriamina pentaacetato meglumina por interações eletrostáticas, as quais foram modificadas por interações covalentes para o acoplamento da desintegrina vicrostatin na superfície das nanopartículas. Todas as formulações obtidas foram caracterizadas por estudos de distribuição granulométrica, potencial zeta, microscopia eletrônica de varredura e de força atômica, ressonância magnética nuclear, calorimetria exploratória diferencial, espectroscopia de dicroísmo circular e infravermelho por

transformada de Fourier. Nos ensaios de citotoxicidade *in vitro* com células de GBMs foi possível observar que ao encapsular os peptídeos cRGDfV e cRGDfK nas nanopartículas elas são menos citotóxicas comparadas nanopartículas com o peptídeo cRGDfK está na sua superfície. As nanopartículas com cRGDfK na superfície levaram a uma diminuição significativa da viabilidade celular em comparação às nanopartículas em que os peptídeos estão encapsuladas. Nos ensaios de captação e internalização por citometria de fluxo e microscopia confocal, as nanopartículas de quitosana acopladas com cRGDfK e as nanopartículas teranósticas de carboximetilquitosana acopladas com vicrostatin apresentaram interação com as integrinas, levando a uma maior internalização das nanopartículas pelas células de GBMs. No caso das nanopartículas teranósticas, pode ocorrer um aumento de gadolínio nos GBMs facilitando o diagnóstico por imagem. Portanto, todas as nanopartículas desenvolvidas podem ser futuramente exploradas como uma plataforma a fim de auxiliar no tratamento e no diagnóstico por imagem dos GBMs.

**Palavras-chave:** desintegrinas, diagnóstico por imagem, gadolínio, integrinas, nanopartículas, quitosana.

## **ABSTRACT**

Glioblastoma multiforme (GBMs) is the most invasive tumor from central nervous system (CNS) and its invasiveness is related to interaction between glycoproteins of extracellular matrix and integrins present in tumor cells. Integrins  $\alpha_5\beta_1$ ,  $\alpha_v\beta_5$ , e  $\alpha_v\beta_3$  are overexpressed in GBMs and they could be used as target molecules in the treatment and diagnostic imaging of the tumors from CNS. The disintegrins cRGDfV, cRGDfK and vicrostatin have been studied for the treatment of GBMs because they inhibit the integrins  $\alpha_v\beta_3$ ,  $\alpha_v\beta_5$ , and  $\alpha_5\beta_1$ , and, therefore, they show potent anti-tumor properties. However, the administration of therapeutic proteins is limited by their low stability in physiological fluids and low penetration in biological membranes. To overcome these problems, drug delivery systems have been developed and alternative route of administration, such as nasal administration, has been used. Thus, the aim of this study was the development of chitosan nanoparticles, employing factorial design, by the means of ionotropic gelification and the encapsulation of disintegrins cRGDfV e cRGDfK. The chitosan-based drug delivery system increased the mucoadhesion, which could promote the blood-brain barrier permeation of disintegrins cRGDfV and cRGDfK. Another strategy aimed in this work was the use of chitosan nanoparticles selected by factorial design to be modified with PEG by supramolecular interactions and also by covalent interactions with methoxy-polyethylene glycol and maleimide-polyethylene glycol-hydroxysuccinimide. The modified nanoparticles by covalent interactions were functionalized through linkage of disintegrin cRGDfK on nanoparticles' surface in order to improve the targeting of nanoparticles to tumor environment by specific interactions with the integrins overexpressed in the GBMs. Theranostic carboxymethylchitosan nanoparticles containing the contrast agent gadolinium-diethylenetriamine-pentaacetate-meglumine were also developed; these nanoparticles was developed by eletrostatic interactions, and then they were modified by covalent interactions to attach the desintegrin vicrostatin on the surface of these nanoparticles. All formulations obtained were characterized by size distribution, zeta potential, scanning eletron microscopy, atomic force microscopy, nuclear magnetic resonance, differential scanning calorimetry, circular dichroism and Fourier transform infrared spectroscopy. In *in vitro* cytotoxicity assays using GBMS cells, it was possible to observe the differences in the cell viability when the desintegrins cRGDfV and cRGDfK

were encapsulated into nanoparticles and when the desintegrin cRGDfK is on the surface of nanoparticles. The nanoparticles with cRGDfK on the surface presented a significant decrease in cell viability as compared to nanoparticles which the disintegrins are encapsulated. In the uptake and internalization assays by flow cytometry and confocal microscopy, the cRGDfK attached to chitosan nanoparticles and vicrostatin attached to the theranostic carboxymethylchitosan nanoparticles showed a specific interaction with the integrins, leading to higher uptake of nanoparticles by GBMs cells, and, thus, promoting an anti-tumor effect due to integrins inhibition. In the case of theranostic nanoparticles, an increase in uptake of gadolinium could happen and it could facilitate the diagnosis by image. The nanoparticles developed can be exploited as a platform in order to assist in the treatment and diagnosis by image of the GBMs.

**Keywords:** desintegrins, diagnostic imaging, gadolinium, integrins, nanoparticles, chitosan.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Distribuição linear de cadeias de polifosfato de sódio.....	32
Figura 2 -	Progressão maligna de astrocitoma humano (do grau I ao grau IV) segundo classificação da OMS.....	36
Figura 3 -	Estrutura das subunidades das integrinas.....	39
Figura 4 -	Ativação e sinalização bidirecional das integrinas.....	42
Figura 5 -	Integrinas expressas no sistema nervoso central.....	43
Figura 6 -	Esquema de inibição de integrinas pelo cRGDfV em células endoteliais e células tumorais.....	50
Figura 7 -	Representação esquemática das principais interações entre o peptídeo cRGDfV e a integrina $\alpha_v\beta_3$ .....	51
Figura 8 -	Estrutura química do cRGDfK.....	52
Figura 9 -	Alinhamento de sequências de contortrostatin (CN), vicrostatin (VCN) e equistatina.....	54
Figura 10 -	Mecanismos de internalização das nanopartículas e respectivas limitações relacionadas ao tamanho.....	59
Figura 11 -	Reações de acoplamento entre biomoléculas (ex. desintegrinas) e as nanopartículas peguiladas usando EDC e NHS.....	63
Figura 12 -	Sistemas multifuncionais com superfície modificada.....	65
Figura 13 -	Imagens de RMI do cérebro.....	67
Figura 14 -	Agentes de contraste de baixo peso molecular utilizados na clínica.....	69
Figura 15 -	Esquema de preparo das amostras para análise em microscopia confocal..	87
Figura 16 -	Gráfico de superfície de resposta do efeito do pH e da concentração de TPP e polifosfato em função do diâmetro médio das nanopartículas.....	90
Figura 17 -	Gráfico de superfície de resposta do efeito do ácido acético e da concentração de TPP e polifosfato em função do diâmetro médio das nanopartículas.....	91
Figura 18 -	Gráfico de superfície de resposta do efeito do pH e da concentração de TPP ou polifosfato em função do índice de polidispersão das	

	nanopartículas.....	92
Figura 19 -	Gráfico de superfície de resposta do efeito da concentração de ácido acético e de TPP ou polifosfato em função do índice de polidispersão das nanopartículas.....	92
Figura 20 -	Gráfico de superfície de resposta do efeito do pH e da concentração de TPP ou polifosfato em função do potencial zeta das nanopartículas.....	94
Figura 21 -	Gráfico de superfície de resposta do efeito da concentração de ácido acético e TPP ou polifosfato em função do potencial zeta das nanopartículas.....	95
Figura 22 -	Espectro de RMN de <sup>13</sup> C da quitosana, NPQS/P e NPQS/TPP .....	97
Figura 23 -	Diferentes espécies de fosfatos conforme a notação Q <sup>n</sup> .....	97
Figura 24 -	Espectros de Ressonância Magnética Nuclear do <sup>31</sup> P das amostras de polifosfato de sódio no estado sólido, nanopartículas de QS/PP liofilizadas, tripolifosfato de sódio sólido, nanopartículas de QS/TPP liofilizadas .....	99
Figura 25 -	Esquema da interação entre quitosana e PEG.....	101
Figura 26 -	Fotomicrografias das nanopartículas NPQS/TPP, NPQS/P, NPQS/TPP-PEG e NPQS/P-PEG.....	103
Figura 27 -	Espectros de absorção na região do infravermelho da quitosana, TPP e polifosfato.....	105
Figura 28 -	Espectro de absorção na região do infravermelho do PEG.....	106
Figura 29 -	Espectro de absorção na região do infravermelho da NPQS/TPP e NPQS/TPP-PEG.....	107
Figura 30 -	Espectro de absorção na região do infravermelho da NPQS/P e NPQS/P-PEG.....	109
Figura 31 -	Curva DSC da quitosana, TPP e polifosfato.....	111
Figura 32 -	Curva DSC da NPQS/TPP.....	112
Figura 33 -	Curva DSC da NPQS/TPP-MF.....	113
Figura 34 -	Curva DSC da NPQS/P.....	114
Figura 35 -	Curva DSC da NPQS/P-MF.....	114
Figura 36 -	Curva DSC do PEG.....	116



Figura 37 -	Curvas DSC da NPQS/TPP-PEG e NPQS/TPP-PEG-MF.....	117
Figura 38 -	Curvas DSC da NPQS/P-PEG e NPQS/P-PEG-MF.....	118
Figura 39 -	Espectro de dicroísmo circular de cRGDfV em solução de quitosana, TPP, polifosfato e PEG.....	121
Figura 40 -	Modelo estrutural da cRGDfV.....	121
Figura 41 -	Espectro de dicroísmo circular de cRGDfK em solução de quitosana, TPP, polifosfato e PEG.....	123
Figura 42 -	Espectro de absorção infravermelho do cRGDfV.....	125
Figura 43 -	Espectro de absorção na região do infravermelho do cRGDfK.....	126
Figura 44 -	Espectro de absorção na região do infravermelho de segunda derivada do cRGDfV e cRGDfK.....	127
Figura 45 -	Curva padrão de BSA, obtida por espectroscopia do UV-visível a 562 nm.....	130
Figura 46 -	Fotomicrografias das NPQS/TPP-cRGDfV, NPQS/TPP-cRGDfV-PEG, NPQSP-cRGDfV e NPQS/P-cRGDfV-PEG.....	131
Figura 47 -	Fotomicrografias das NPQS/TPP-cRGDfK, NPQS/TPP-cRGDfK-PEG, NPQS/P-cRGDfK e NPQS/P-cRGDfK-PEG.....	132
Figura 48 -	Espectros de absorção na região do infravermelho da NPQS/TPP-cRGDfV e NPQS/TPP-cRGDfV-PEG e NPQS/P-cRGDfV e NPQS/P-cRGDfV-PEG.....	133
Figura 49 -	Espectros de absorção na região do infravermelho da NPQS/TPP-cRGDfK e NPQS/TPP-cRGDfK-PEG e NPQS/P-cRGDfK e NPQS/P-cRGDfK-PEG.....	134
Figura 50 -	Coloração para os anticorpos $\alpha_v\beta_3$ and $\alpha_v\beta_5$ em células de glioma.....	138
Figura 51 -	Viabilidade celular das células U87 após 24 horas de exposição ao MTT..	141
Figura 52 -	Viabilidade celular das células U87 após 24 horas de exposição ao MTT..	143
Figura 53 -	Captação das nanopartículas NPQS/TPP e NPQS/P encapsuladas com cRGDfV e cRGDfK pelas células U87 (incubação por 1 hora).....	144
Figura 54 -	Captação das nanopartículas NPQS/TPP-PEG e NPQS/P-PEG encapsuladas com cRGDfV e cRGDfK pelas células U87 (incubação por 1 hora).....	146

Figura 55 -	Estudo de competição de NPQS/TPP e NPQS/TPP-PEG encapsuladas com cRGDfV e cRGDfK em células U87.....	148
Figura 56 -	Estudo de competição de NPQS/P e NPQS/P-PEG encapsuladas com cRGDfV e cRGDfK em células U87.....	149
Figura 57 -	Nanopartículas de quitosana covalentemente modificadas com PEG e funcionalizadas com cRGDfK.....	152
Figura 58 -	Morfologia das nanopartículas NPQS/P não funcionalizada, NPQS/P funcionalizada com cRGDfK, NPQS/TPP não funcionalizada e NPQS/P funcionalizada com cRGDfK.....	154
Figura 59 -	Espectros de absorção na região do infravermelho da NPQS/P não funcionalizada (NF), NPQS/P funcionalizada com cRGDfK e NPQS/TPP não funcionalizada (NF) e NPQS/TPP funcionalizada com cRGDfK.....	155
Figura 60 -	Avaliação da citotoxicidade do cRGDfK em solução e acoplado à superfície das nanopartículas de QS em células de U87 de glioma. 24 horas de tratamento.....	157
Figura 61 -	Avaliação da captação do cRGDfK pelas células U87 em função do aumento da concentração.....	158
Figura 62 -	Captação das nanopartículas NPQS/TPP-NF, NPQS/P-NF e NPQS/TPP-F, NPQS/P-F com cRGDfK pelas células U87 (incubação por 1 hora).....	160
Figura 63 -	Estudo de competição de NPQS/TPP e NPQS/P funcionalizadas com cRGDfK em células U87.....	161
Figura 64 -	Avaliação da captação das NPQS/P-NF por microscopia confocal.....	162
Figura 65 -	Avaliação da captação das NPQS/P-F com cRGDfK por microscopia confocal.....	163
Figura 66 -	Avaliação da captação das NPQS/TPP-NF por microscopia confocal.....	164
Figura 67 -	Avaliação da captação das NPQS/TPP-F com cRGDfK por microscopia confocal.....	165
Figura 68 -	Comparação da internalização das nanopartículas não funcionalizadas e funcionalizadas com cRGDfK através da média de intensidade de fluorescência (rodamina) com auxílio do software ImageJ®.....	166

Figura 69 -	Esquema da formação das nanopartículas e interação eletrostáticas entre CMQS e Gd-DTPA.....	168
Figura 70 -	Morfologia das nanopartículas de CMQS e nanopartículas de CMQS encapsuladas com Gd-DTPA por MEV.....	170
Figura 71 -	Espectro de EDS das nanopartículas de CMQS mostrando a presença de Gd.....	170
Figura 72 -	Desenvolvimento de nanopartículas de CMQS encapsuladas com Gd-DTPA não funcionalizadas com vicrostatin.....	171
Figura 73 -	Funcionalização da superfície das nanopartículas de CMQS-Gd-DTPA com Mal-PEG-NHs para a ligação do vicrostatin.....	172
Figura 74 -	Modificação do vicrostatin com SATA e funcionalização das nanopartículas com vicrostatin conjugado na superfície.....	173
Figura 75 -	Marcação por Cy5 nas nanopartículas de CMC-Gd-DTPA funcionalizadas com VCN.....	174
Figura 76 -	Estudo de captação por citometria de fluxo em células U87 e U251 GFP/Luc.....	177
Figura 77 -	Estudo de captação em células U87 das nanopartículas não funcionalizadas e funcionalizadas com VCN em função da temperatura.....	179
Figura 78 -	Estudo de captação em células U251 das nanopartículas não funcionalizadas e funcionalizadas com VCN em função da temperatura.....	180
Figura 79 -	Comparação da captação das nanopartículas não funcionalizadas e funcionalizadas com VCN através da média de intensidade de fluorescência (vermelho) com auxílio do software ImageJ®.....	181
Figura 80 -	Avaliação da captação das nanopartículas não funcionalizadas e funcionalizadas com VCN em células U87 e U251.....	183

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Subunidades de integrinas e seus ligantes.....	40
Tabela 2 -	Tipos de desintegrinas e atividade sobre as células tumorais.....	46
Tabela 3 -	Características das nanopartículas e o impacto sobre e seu direcionamento nos tumores.....	58
Tabela 4 -	Níveis e parâmetros avaliados no planejamento fatorial.....	75
Tabela 5 -	Nanopartículas de quitosana peguizadas não funcionalizadas e funcionalizadas com cRGDfK.....	77
Tabela 6 -	Nanopartículas de carboximetilquitosana encapsuladas com gadolínio-DTPA não funcionalizadas e funcionalizadas com vicrostatin..	78
Tabela 7 -	Diâmetro médio e índice de polidispersão das nanopartículas com TPP...	89
Tabela 8 -	Diâmetro médio e índice de polidispersão das nanopartículas com polifosfato.....	89
Tabela 9 -	Potencial zeta das nanopartículas com TPP.....	93
Tabela 10 -	Potencial zeta das nanopartículas com polifosfato.....	94
Tabela 11 -	Valores dos desvios químicos de <sup>13</sup> C (ppm) da QS, NPQS/P e NPQS/TPP.....	99
Tabela 12 -	Diâmetro médio e índice de polidispersão das nanopartículas modificadas com PEG.....	100
Tabela 13 -	Potencial zeta das nanopartículas modificadas com PEG.....	101
Tabela 14 -	Principais grupos químicos e bandas das NPQS/TPP e NPQS/TPP-PEG.....	107
Tabela 15 -	Principais grupos químicos e bandas das NPQS/P e NPQS/P-PEG.....	109
Tabela 16 -	Valores de T <sub>onset</sub> (°C), T <sub>pico</sub> (°C) e Entalpia (ΔH) (J.g <sup>-1</sup> ) de DSC da quitosana, TPP e polifosfato.....	111
Tabela 17 -	Valores de T <sub>onset</sub> (°C), T <sub>pico</sub> (°C) e Entalpia (ΔH) (J.g <sup>-1</sup> ) de DSC da NPQS/TPP, NPQS/P e misturas físicas.....	115
Tabela 18 -	Valores de T <sub>onset</sub> (°C), T <sub>pico</sub> (°C) e Entalpia (ΔH) (J.g <sup>-1</sup> ) de DSC do PEG, NPQS/TPP-PEG e NPQS/TPP-PEG-MF.....	117

## *Lista de Tabelas*

---

Tabela 19 - Resultados de DSC da NPQS/P-PEG e NPQS/P-PEG-MF.....	119
Tabela 20 - Deconvolução dos espectros da cRGDfV em TPP, polifosfato, PEG e quitosana.....	122
Tabela 21 - Deconvolução dos espectros da cRGDfK em TPP, polifosfato, PEG e quitosana.....	123
Tabela 22- Posição das bandas e picos de amida do cRGDfV.....	125
Tabela 23- Posição das bandas e picos de amida do cRGDfK.....	126
Tabela 24- Diâmetro médio, índice de polidispersão e potencial zeta das nanopartículas com cRGDfV e cRGDfK.....	128
Tabela 25- Determinação do diâmetro médio, índice de polidispersão e potencial zeta das nanopartículas com PEG.....	129
Tabela 26 - Avaliação da eficiência de associação (EA) do cRGDfV e cRGDfK nas nanopartículas.....	130
Tabela 27 - Eficiência de ligação das nanopartículas com a mucina.....	135
Tabela 28 - Avaliação da eficiência de ligação das nanopartículas com cRGDfV e cRGDfK com a mucina.....	136
Tabela 29 - Intensidade de expressão de integrinas em células de gliomas.....	140
Tabela 30 - Diâmetro médio, índice de polidispersão e potencial zeta das nanopartículas não funcionalizadas e funcionalizadas com cRGDfK.....	153
Tabela 31 - Determinação do diâmetro médio das nanopartículas não-funcionalizadas e funcionalizadas com VCN.....	175

## LISTA DE ABREVIATURAS

- BCA** - Ácido bicinchônico
- BHE** - Barreira hematoencefálica
- CD** - Dicroísmo celular
- CMQS** - Carboximetilquitosana
- Cy5** - Cianina-5
- cRGDFV** - Sequência de aminoácidos do peptídeo cíclico (arginina-glicina-ácido aspartático-D-fenilalanina-valina)
- cRGDFK** - Sequência de aminoácidos da peptídeo cíclico (arginina-glicina-ácido aspartático-D-fenilalanina-lisina)
- DAPI** - 4',6-diamidino-2-fenilindol
- DisBa-01** - Desintegrina recombinante *Bothrops alternatus*
- DLS** - Espalhamento dinâmico de luz
- DTPA** - Ácido dietilenotriamina pentaacético
- EDC** - Cloridrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodimina
- EDS** - Espectroscopia de Energia Dispersiva
- FITC** - Fluoresceína
- FTIR** - Infravermelho por transformada de Fourier
- Gd** - Gadolínio
- Gd-DTPA** - Gadolínio-ácido linear dietilenotriaminopentacético
- GBM** - Glioblastoma multiforme
- GFP** - Proteína verde fluorescente
- Mal-PEG-NHS** - Maleimida polietilenoglicol N-hidrosuccinamida
- MEC** - Matriz extracelular
- MEV** - Microscopia eletrônica de varredura
- mPEG-NHS** - Metoxi polietilenoglicol N-hidrosuccinamida
- NHS** - N-hidrosuccinamida
- NPQ/STPP** - Nanopartícula de quitosana com tripolifosfato de sódio
- NPQS/P** - Nanopartícula de quitosana com polifosfato de sódio
- PP** - Polifosfato

*Lista de Abreviaturas*

---

**OMS** - Organização Mundial da Saúde

**QS** - Quitosana

**RGD** - Sequência de aminoácidos arginina, glicina, ácido aspartático

**RMI** - Ressonância magnética de imagem

**SATA** - N-succinimidil-S-acetiltio-acetato de etilo

**SNC** - Sistema nervoso central

**TPP** - Tripolifosfato de sódio

**VCN** - Desintegrina vicrostatin

**VEGF** - fator de crescimento endotelial de vasos

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>27</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>35</b>
<b>2.1. Câncer.....</b>	<b>35</b>
<b>2.2. Quimioterapia em glioblastomas.....</b>	<b>37</b>
<b>2.3. O papel das integrinas no câncer.....</b>	<b>37</b>
2.3.1. Matriz extracelular e integrinas.....	38
2.3.2. Desintegrinas e câncer.....	43
2.3.2.1. Efeitos das desintegrinas sobre as células de GBMs.....	48
<b>2.4. O papel dos peptídeos cRGDfV, cRGDfK e vicrostatin em GBMs.....</b>	<b>49</b>
2.4.1. cRGDfV.....	49
2.4.2. cRGDfK.....	52
2.4.3. Vicrostatin.....	53
<b>2.5. Nanopartículas para liberação de biomoléculas e via nasal como estratégia para aumentar o direcionamento para as integrinas nos GBMs.....</b>	<b>55</b>
<b>2.6. Delineamento racional de nanopartículas poliméricas para aplicação terapêutica em GBMs.....</b>	<b>58</b>
2.6.1. Nanopartículas poliméricas e mecanismo de internalização pelas células tumorais.....	60
<b>2.7. Sistemas multifuncionais teranósticos como estratégia para terapia e diagnóstico por imagem em GBMs.....</b>	<b>64</b>
<b>3. OBJETIVOS.....</b>	<b>71</b>
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>72</b>
<b>4.1. MATERIAIS.....</b>	<b>72</b>
4.1.1. Substâncias e Reagentes.....	72
4.1.2. Células.....	73
4.1.3. Equipamentos e Acessórios.....	73
<b>4.2. MÉTODOS.....</b>	<b>74</b>
4.2.1. Desenvolvimento das nanopartículas de quitosana.....	74



4.2.1.1. Preparação das soluções de quitosana.....	74
4.2.1.2. Preparação da solução de TPP, polifosfato de sódio e polietilenoglicol...	74
4.2.1.3. Desenvolvimento das nanopartículas de quitosana vazias empregando planejamento fatorial.....	75
4.2.1.4. Preparação de nanopartículas modificadas por interações supramoleculares com PEG.....	76
4.2.1.5. Incorporação dos peptídeos cRGDfV e cRGDfK nas nanopartículas de QS e QS modificadas com PEG.....	76
4.2.1.6. Desenvolvimento das nanopartículas de QS funcionalizadas com o peptideo cRGDfK na superfície.....	76
4.2.2. Desenvolvimento de nanopartículas de carboximetilquitosana encapsuladas com gadolínio-DTPA e funcionalizadas com a desintegrina vicrostatin.....	77
4.2.3. Caracterização físico-química das nanopartículas.....	79
4.2.3.1. Determinação do diâmetro médio, índice de polidispersidade (Pdl) e potencial zeta das nanopartículas.....	79
4.2.3.2. Morfologia das nanopartículas por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Microscopia de força atômica (AFM).....	79
4.2.3.3. Caracterização das nanopartículas por espectroscopia de absorção na região do infravermelho por transformada de Fourier.....	80
4.2.3.4. Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC).....	80
4.2.3.5. Ressonância Magnética Nuclear de <sup>31</sup> P e <sup>13</sup> C (RMN).....	81
4.2.4. Caracterização estrutural dos peptídeos cRGDfV e cRGDfK.....	81
4.2.4.1. Espectroscopia de Dicroísmo Circular.....	81
4.2.4.2. Caracterização do cRGDfV e cRGDfK por espectroscopia de absorção na região do infravermelho por transformada de Fourier.....	82
4.2.5. Avaliação da eficiência de associação do cRGDfV e cRGDfK nas nanopartículas.....	82
4.2.6. Avaliação da eficiência de ligação das nanopartículas com a mucina.....	83
4.2.7. Avaliação da expressão de integrinas em células de glioma.....	84
4.2.7.1. Avaliação da citotoxicidade <i>in vitro</i> de nanopartículas encapsuladas	

com cRGDfV e cRGDfK em células de glioma utilizando método do MTT.....	84
4.2.7.2. Avaliação da captação das nanopartículas em células U87 e U251 e estudos de competição por citometria de fluxo.....	85
4.2.7.3. Avaliação da captação das nanopartículas em células U87 e U251 por microscopia confocal.....	86
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>88</b>
<b>5.1. Planejamento fatorial como estratégia para o desenvolvimento racional de nanopartículas baseadas em quitosana e avaliação da modificação das nanopartículas de QS com PEG por meio de interação supramolecular para encapsulação dos inibidores de integrinas cRGDfV e cRGDfK.....</b>	<b>88</b>
<b>5.2. Aplicação da Ressonância Magnética Nuclear de <sup>31</sup>P e <sup>13</sup>C para avaliar as nanopartículas obtidas com os diferentes agentes reticulantes.....</b>	<b>96</b>
<b>5.3. Avaliação da influência da modificação da superfície das nanopartículas de quitosana com PEG.....</b>	<b>100</b>
5.3.1. Morfologia das nanopartículas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) e Microscopia de força atômica (AFM).....	102
5.3.2. Caracterização das nanopartículas por espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier.....	104
5.3.3. Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC).....	110
<b>5.4. Avaliação da encapsulação dos peptídeos cRGDfV e cRGDfK nas nanopartículas de quitosana sem e com modificações com PEG.....</b>	<b>119</b>
5.4.1. Caracterização estrutural dos peptídeos cRGDfV e cRGDfK.....	119
5.4.1.1. Espectroscopia de dicroísmo circular.....	119
5.4.1.2. Caracterização do cRGDfV e cRGDfK por espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier.....	124
<b>5.5. Caracterização físico-química das nanopartículas de quitosana sem e com modificações com PEG após a encapsulação com os peptídeos cRGDfV e cRGDfK.....</b>	<b>128</b>
5.5.1. Determinação do diâmetro médio, índice de polidispersidade e potencial zeta das nanopartículas.....	128
5.5.2. Avaliação da eficiência de associação do cRGDfV e cRGDfK nas	

nanopartículas.....	129
5.5.3. Morfologia das nanopartículas de quitosana sem e com modificação de PEG encapsuladas com cRGDfV e cRGDfK por MEV.....	131
5.5.4. Caracterização por espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier das nanopartículas de quitosana sem e com modificações com PEG encapsuladas com cRGDfV e cRGDfK.....	132
5.5.5. Avaliação da interação das nanopartículas de quitosana com a mucina...	134
<b>5.6. Avaliação do efeito citotóxico, <i>in vitro</i>, das nanopartículas de quitosana com e sem modificação de PEG encapsuladas com os peptídeos cRGDfV e cRGDfK sobre células de GBMs.....</b>	<b>136</b>
5.6.1. Avaliação das integrinas $\alpha_v\beta_3$ e $\alpha_v\beta_5$ expressas em células de glioma.....	137
5.6.2. Avaliação da citotoxicidade, <i>in vitro</i> , das nanopartículas de quitosana sem e com modificação com PEG encapsuladas com cRGDfV em linhagens de células U87 utilizando método do MTT.....	140
5.6.3. Avaliação da citotoxicidade, <i>in vitro</i> , das nanopartículas de quitosana sem e com modificação de PEG encapsuladas com cRGDfK em linhagem de célula U87 utilizando método do MTT.....	142
5.6.4. Avaliação da captação das nanopartículas de quitosana sem e com modificação com PEG pelas células U87 por citometria de fluxo.....	143
5.6.5. Estudos de competição dos peptídeos cRGDfV e cRGDfK encapsuladas em nanopartículas de quitosana (sem e com modificação de PEG) em células U87 por citometria de fluxo.....	147
<b>5.7. Avaliação das nanopartículas de quitosana funcionalizadas com o peptídeo cRGDfK acoplado na superfície como estratégia para aumentar a interação com as integrinas expressas nos GBMs.....</b>	<b>149</b>
5.7.1. Desenvolvimento e caracterização físico-química das nanopartículas de quitosana funcionalizadas com cRGDfK.....	150
5.7.2. Morfologia das nanopartículas de quitosana funcionalizadas com cRGDfK.....	153
5.7.3. Caracterização das nanopartículas funcionalizadas com cRGDfK por espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier.....	154

5.7.4.	Avaliação da citotoxicidade, <i>in vitro</i> , das nanopartículas de quitosana funcionalizadas com cRGDfK em linhagem de célula U87 utilizando método do MTT.....	156
5.7.4.1.	Avaliação da captação das nanopartículas funcionalizadas com cRGDfK pelas células U87 por citometria de fluxo.....	157
5.7.4.2.	Estudo de competição das nanopartículas funcionalizadas com cRGDfK em células U87 por citometria de fluxo.....	160
5.7.5.	Avaliação da captação das nanopartículas de quitosana funcionalizadas com cRGDfK por microscopia confocal.....	161
<b>5.8.</b>	<b>Desenvolvimento de nanopartículas de carboximetilquitosana encapsuladas com Gd-DTPA como estratégia para a terapia e diagnóstico por imagem utilizando ressonância magnética de imagem.....</b>	<b>166</b>
5.8.1.	Desenvolvimento das nanopartículas de carboximetilquitosana encapsuladas com gadolínio-DTPA.....	167
5.8.2.	Análise morfológica das nanopartículas de CMQS por microscopia eletrônica de varredura e determinação da presença de Gd-DTPA nas nanopartículas por espectroscopia de energia dispersiva (EDS).....	169
5.8.3.	Desenvolvimento das nanopartículas de CMQS encapsuladas com Gd-DTPA não funcionalizadas e funcionalizadas com vicrostatin e análise do diâmetro médio das nanopartículas.....	171
5.8.4.	Avaliação da captação das nanopartículas de carboximetilquitosana funcionalizadas com vicrostatin em células U87 e U251 por citometria de fluxo.....	175
5.8.5.	Avaliação da captação das nanopartículas de carboximetilquitosana funcionalizadas com vicrostatin em células U87 e U251 por microscopia confocal.....	181
<b>6.</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>187</b>
<b>7.</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>197</b>
<b>8.</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>199</b>

## 1. INTRODUÇÃO

O câncer ainda é um grande desafio para a ciência e para a medicina porque a cura de muitos tipos de tumores bem como muitos mecanismos ainda não foram elucidados. Dentre os diferentes tipos de tumores existentes, os tumores do SNC são responsáveis por 2% das mortes relacionadas ao câncer. Os tipos mais estudados de tumores cerebrais são os meduloblastomas do cerebelo e os gliomas (LOUIS; POMEROY; CAIRNCROSS, 2002).

Os gliomas se desenvolvem a partir de células precursoras da glia e podem ter origem astrocítica (astrocitomas), oligodendrocítica (oligodendrocitomas) ou oligoastrocítica (oligoastrocitomas) (LOUIS; POMEROY; CAIRNCROSS, 2002).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), os astrocitomas podem ser divididos em astrocitomas de baixo grau anaplásico, astrocitomas anaplásicos e glioblastomas (GBMs), que podem ser classificados quanto ao seu grau de malignidade. O GBM de grau IV é o mais maligno e o mais frequente dos gliomas astrocíticos, apresentando uma maior incidência em adultos (LOUIS, HOLLAND, CAIRNCROSS, 2001; LOUIS, POMEROY, CAIRNCROSS, 2002).

Os principais tratamentos dos gliomas consistem na retirada do tumor por meio de cirurgia, radioterapia e quimioterapia. Entretanto, os GBMs são fortemente resistentes a quimioterapias convencionais assim como à radioterapia devido à infiltração difusa dos GBMs no cérebro, mas esse tipo de tumor raramente realiza metástases fora do SNC (LOUIS, POMEROY, CAIRNCROSS, 2002). Portanto, o estudo de novas formas de terapia e de vias alternativas de administração, além do desenvolvimento de novos sistemas de liberação, são muito importantes como estratégias para o tratamento destes tipos de tumores.

Os principais tratamentos dos gliomas consistem na retirada do tumor por meio de cirurgia, radioterapia e quimioterapia. Entretanto, os GBMs são fortemente resistentes a quimioterapias convencionais assim como à radioterapia devido à infiltração difusa dos GBMs no cérebro, mas esse tipo de tumor raramente realiza metástases fora do SNC (LOUIS, POMEROY, CAIRNCROSS, 2002). Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) apenas 10% dos GBMs apresentam alguma responsividade às terapias convencionais, por isso é muito importante pesquisas que estudem novas formas de terapia e o

desenvolvimento de novos sistemas de liberação e vias alternativas de administração, como alternativas para o desenvolvimento de novas terapias destes tipos de tumores.

A invasividade celular dos GBMs no cérebro está relacionada com sua interação com os componentes específicos da matriz extracelular (MEC), além das células de gliomas também produzirem os seus próprios componentes da MEC, tais como laminina, colágeno tipo I, III, IV e vitronectina, os quais são glicoproteínas que atuam como receptores de superfície celular interagindo com as integrinas expressas em linhagens de GBMs humanos, sendo esta interação a chave para a adesão das células tumorais no tecido cerebral. As integrinas são moléculas que desempenham um papel chave na mediação e interação celulares entre as células tumorais e os componentes da MEC, além de estar envolvidas com a adesão, migração, proliferação, diferenciação e apoptose das células tumorais (GLUKHOVA, KOTELIANSKY, 1995; GUO, GIANCOTTI, 2004; UHM, GLADSON, RAO, 1999b).

No cérebro adulto, a laminina, a fibronectina e o colágeno IV são os principais componentes das membranas basais associadas à glia, às células do plexo coróide e às células endoteliais vasculares, favorecendo a migração das células tumorais do GBMs através da interação com os elementos da MEC das membranas basais ou com os elementos da MEC produzidos por elas próprias via ligação com as integrinas (KNOTT et al., 1998; MORINI, BECCHETTI, 2010; PAULUS, TONN, 1994).

A partir da década de 90, diversos trabalhos buscaram caracterizar o padrão de expressão das integrinas em GBMs, em comparação com o cérebro normal e/ou astrócitos. Estudos evidenciaram que as integrinas  $\alpha_2\beta_1$ ,  $\alpha_3\beta_1$ ,  $\alpha_5\beta_1$ ,  $\alpha_v\beta_5$ ,  $\alpha_8\beta_1$  e  $\alpha_v\beta_3$  foram mais fortemente expressas nos GBMs do que nos tecidos endoteliais normais. Este fato faz das integrinas moléculas alvo na terapia anti-tumoral (GINGRAS et al., 1995; PAULUS, TONN, 1994; PIJUAN-THOMPSON, GLADSON, 1997).

Assim, as desintegrinas têm sido estudadas como alternativa terapêutica no tratamento e no diagnóstico do câncer com o objetivo de inibir a ação das integrinas na adesão, migração e proliferação das células tumorais (DESGROSELLIER; CHERESH, 2010; KONSTANTOPOULOS; THOMAS, 2009). Os efeitos biológicos das desintegrinas relacionam-se com suas ligações a receptores celulares, sendo consideradas potentes inibidores da adesão celular, podendo ser utilizadas no combate de diversas patologias como,

por exemplo, o câncer (NIEWIAROWSKI et al., 1994; SHEU et al., 1995; SOUZA et al., 2000). O termo desintegrina foi usado pela primeira vez em 1989 para descrever um grupo de moléculas de baixo peso molecular, ricas em cisteína, derivadas de venenos de serpentes, as quais interagem com receptores da superfície celular (GOULD et al., 1990).

Algumas desintegrinas possuem a sequência adesiva RGD (arginina, glicina, ácido aspártico) através da qual se ligam especificamente ao colágeno, fibronectina e vitronectina, além de se ligar a outras integrinas RGD-dependentes como as integrinas  $\alpha_v\beta_3$  e  $\alpha_5\beta_1$ , presentes nas células do GBMs (AVRAAMIDES et al., 2008; KONSTANTOPOULOS; THOMAS, 2009; DESGROSELLIER; CHERESH, 2010).

Derivados de desintegrinas, tais como o pentapeptídeo cíclico RGDfV (arginina, glicina, ácido aspártico, D-fenilalanina, valina), o cRGDfK (arginina, glicina, ácido aspártico, D-fenilalanina, lisina) e o vicrostatin, estão sendo estudados para combater o câncer por serem inibidores das integrinas  $\alpha_v\beta_3$ ,  $\alpha_v\beta_5$  e  $\alpha_5\beta_1$  e já apresentaram resultados satisfatórios contra os GBMs (STUPP et al., 2007). Os mecanismos de ação destes inibidores de integrinas são baseados na inibição da integrina  $\alpha_v\beta_5$ , um importante componente da resposta mediada por VEGF (fator de crescimento endotelial vascular) o qual é um dos principais fatores de crescimento relacionado ao processo de angiogênese. O outro mecanismo está relacionado com a inibição da expressão da integrina  $\alpha_v\beta_3$ , a qual pode levar à apoptose das células tumorais (NABORS, MIKKELSEN, ROSENFELD, 2007; REARDON, FINK, MIKKELSEN, 2008; REARDON et al., 2008; STUPP et al., 2007).

Um dos grandes desafios para o uso de macromoléculas terapêuticas é que sua administração oral é limitada, principalmente, pela intensa degradação enzimática nos fluidos biológicos, baixa permeabilidade através das biomembranas e da barreira hematoencefálica (BHE). Para contornar os problemas relacionados com a estabilidade das proteínas e a consequente perda de atividade, pesquisadores começaram a explorar vias alternativas de administração, como por exemplo, a via nasal, e sistemas de liberação de fármacos, tais como lipossomas, cristais líquidos, microemulsões e nanopartículas. Os sistemas de liberação nanoestruturados representam uma estratégia interessante para administração de fármacos protéicos, pois estes podem protegê-los contra degradação e possibilitar liberação no local específico de ação com uma taxa controlada (KANG; CHO; YOO, 2009).

As nanopartículas são sistemas carreadores que apresentam diâmetro inferior a 1000 nm e podem ser formadas por uma matriz polimérica, onde o fármaco encontra-se homogeneamente disperso e desta forma obtém-se um sistema monolítico, em que não é possível identificar um núcleo diferenciado, como é o caso das nanopartículas de quitosana e carboximetilquitosana preparadas pela técnica de gelificação ionotrópica empregadas neste estudo (AMIDI et al., 2006; CHEN; ZHANG; HUANG, 2007; DYER et al., 2002; GUIMARÃES, 2005; LAUS et al., 2006; SADEGHI et al., 2008; SCHAFFAZICK et al., 2003).

As nanopartículas podem ser administradas por diferentes vias, tais como a parenteral, oral, oftálmica e nasal (ILLUM, 1998; QUAN et al., 2008; SADEGHI et al., 2008; SCHAFFAZICK et al., 2003). Apesar da via oral ser muito utilizada, a via nasal tem gerado grande interesse como rota alternativa para administração de fármacos e biomoléculas que são suscetíveis à degradação ácida e enzimática ou que sofrem metabolismo pré-sistêmico (GAVINI et al., 2008).

No caso de nanopartículas de quitosana, a administração nasal apresenta grandes vantagens na absorção sistêmica de proteínas, pois a mucosa nasal apresenta epitélio com microvilosidades e uma grande área superficial, além de características como camada subepitelial altamente vascularizada e membrana basal com endotélio poroso que facilitam a permeação da proteína na cavidade nasal (BARBI, 2011; BARBI et al., 2015; ILLUM, 2003; MAINARDES et al., 2006).

O mecanismo de transporte das nanopartículas através da mucosa nasal a fim de permear a BHE não está totalmente elucidado até o momento. O mecanismo mais aceito é a endocitose das nanopartículas de quitosana pelas células endoteliais dos capilares do cérebro, que compõem a maior interface entre o cérebro e o sangue; além disso, a superfície catiônica da quitosana pode promover a abertura entre as células epiteliais facilitando a passagem de proteínas através da BHE (KREUTER, 2001). Outros estudos demonstram que as nanopartículas com superfície catiônica, como a quitosana, podem atravessar a BHE por uma rota de transporte vesicular de substâncias catiônicas que envolve interação eletrostática entre as cargas positivas da quitosana e as cargas negativas da superfície endotelial (HERVÉ; GHINEA; SCHERMANN, 2008).



Outra hipótese para os fármacos administrados por via nasal atingirem o SNC é por meio de transporte ao longo das vias nervosas olfativas que se localizam na porção superior da cavidade nasal, na região olfativa (DHURIA; HANSON; FREY, 2009). Os feixes de axônios do bulbo olfatório atravessam a placa crivosa do osso etmóide próximos aos lobos frontais e se prolongam até a mucosa olfatória, constituindo um caminho pelo qual os fármacos administrados por via nasal podem alcançar o SNC. Os mecanismos de transporte da região olfatória para o SNC envolvem duas vias de transporte, a via intraneuronal onde o fármaco passa da cavidade nasal ao SNC por meio do transporte axonal no nervo olfatório, o que ocorre no prazo de horas a dias após a administração do medicamento. Na via extraneuronal o fármaco é transportado com fluidos dos canais perineurais e atinge o SNC em questão de minutos (RAPOPORT; WINNER, 2006; TALEGAONKAR; MISHRA, 2004).

Apesar do potencial da via nasal, os mecanismos de depuração mucociliar, o qual remove rapidamente a formulação da cavidade nasal, é uma das barreiras que limitam a absorção nasal de fármacos protéicos (MAINARDES et al., 2006). Uma estratégia utilizada para retardar a remoção da formulação pela depuração mucociliar é a utilização de sistemas mucoadesivos, que aumentam o tempo de retenção da formulação na cavidade nasal (ILLUM et al., 2003).

Moléculas catiônicas têm propriedades mucoadesivas pois podem interagir com a superfície de absorção da mucosa nasal, a qual é carregada negativamente em pH fisiológico devido à natureza química das membranas celulares e das moléculas de mucina (WOODLEY, 2001). Essa observação é base do mecanismo proposto para polímeros catiônicos, como a quitosana, cuja mucoadesão é estabelecida pelas interações eletrostáticas com os grupos siálicos da mucina presente no muco, além de promover a absorção de moléculas hidrofílicas pela promoção da reorganização estrutural das proteínas associadas às junções intercelulares tanto na cavidade nasal quanto na BHE (BRAVO-OSUNA et al., 2007; WOODLEY, 2001).

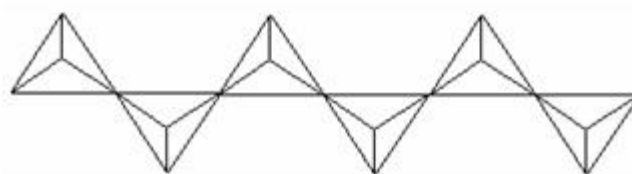
Nanopartículas de quitosana para incorporação de desintegrinas foram desenvolvidas por Kiill, 2012. As nanopartículas de quitosana reticuladas com tripolifosfato de sódio e incorporadas com a desintegrina DisBa-01 mostraram alta eficiência de encapsulação e aumento significativo da mucoadesão em mucosa nasal suína quando comparado com outros polímeros com propriedades mucoadesivas. Em ensaios de inibição da adesão com células

tumorais, a DisBa-01 incorporada em nanopartículas promoveu maior inibição quando comparada somente com a DisBa-01, o que pode indicar que as nanopartículas de quitosana apresentaram efeito sinérgico e podem ser uma alternativa para administração nasal de desintegrinas (KIILL, 2012). Partindo destes estudos iniciais é que buscamos entender como ocorre a internalização dos inibidores de integrinas encapsulados ou não na superfície das nanopartículas pelas células de GBMs.

Paralelamente, a fim de ampliar os estudos sobre o desenvolvimento das nanopartículas de quitosana por gelificação ionotrópica, nosso grupo de pesquisa em colaboração com o Instituto de Química – UNESP, propôs o uso de polifosfato como um novo poliânion reticulante. O polifosfato de sódio é constituído por cadeias lineares e cíclicas de fosfatos maiores que o tripolifosfato de sódio (CORBRIDGE, 2013; DIAS FILHO, 2003; RASHCHI; FINCH, 2000). O  $\text{NaPO}_3$ , conhecido comercialmente como sal de Graham, é o único polifosfato solúvel em água e é talvez o polifosfato de cadeia mais longa conhecida. Industrialmente ele é produzido pelo choque térmico de  $\text{NaPO}_3$  fundido, processo que leva à obtenção do vidro (RASHCHI; FINCH, 2000).

A Figura 1 ilustra a forma como os tetraedros de fosfato se ligam para formar a estrutura linear.

**Figura 1** - Distribuição linear de cadeias de polifosfato de sódio. Cada tetraedro refere-se a um grupamento fosfato  $\text{PO}_4^{3-}$ .



Fonte: DIAS FILHO, 2003.

Outro polímero bastante utilizado no desenvolvimento de nanopartículas é a carboximetilquitosana (CMQS) devido à vantagem de ser um derivado solúvel da QS e por conter grupos amino e carboxil, os quais podem ser explorados para a biofuncionalização das nanopartículas com ligantes.

O PEG e seus derivados têm sido muito empregados nas formulações como componentes da matriz ou como revestimento. Também são utilizados como agentes de

modificação de superfície das nanopartículas para o acoplamento de macromoléculas como os inibidores de integrinas. A peguilação das nanopartículas contribui para prolongar o tempo de meia-vida devido à diminuição da opsonização das nanopartículas, devido ao impedimento estérico causado pelas cadeias hidrófilas. Além disso, o PEG pode contribuir para um aumento da mucopenetração das nanopartículas após administração nasal (KATAOKA et al., 2003; TOBIO et al., 1998).

Portanto, a associação de polímeros (como a CMCS) que apresentam grupos que facilitam a peguilação e posterior acoplamento de ligantes em sua superfície, como os inibidores de integrinas, podem ser utilizadas como nanopartículas multifuncionais teranósticas, pois também podem encapsular tanto fármacos quanto agentes de contraste, como por exemplo, o gadolínio-DTPA (ácido dietilenotriamina pentaacético) (Gd-DTPA).

O agente de contraste paramagnético Gd-DTPA tem sido utilizado em imagiologia por ressonância magnética de imagem (RMI). No entanto, este agente tem algumas limitações que fazem dele um candidato para ser usado em sistemas de liberação de fármacos. O gadolínio-DTPA sofre rápida difusão para o interstício dos vasos e tem meia-vida curta devido a rápida depuração renal. Além disso, o gadolínio-DTPA tem um problema que é o contraste insuficiente entre os tecidos saudáveis e tumorais, o que resulta em uma correspondentemente baixa sensibilidade de diagnóstico em RMI. Para ultrapassar tais limitações, as nanopartículas de CMCS funcionalizadas com inibidores de integrinas e encapsuladas com Gd-DTPA estão sendo estudadas como carreadores para a terapia e diagnóstico por imagem de GBMs. As nanopartículas de CMCS carregadas com um agente paramagnético de contraste (gadolínio) e acopladas com um inibidor de integrina em sua superfície é uma interessante estratégia para atingir os alvos que são as integrinas  $\alpha_v\beta_3$ ,  $\alpha_v\beta_5$  e  $\alpha_5\beta_1$  altamente expressas em GBMs. A interação dessas nanopartículas com as integrinas pode promover um aumento da captação das nanopartículas encapsuladas com o agente de contraste pelas células de GBMs e, conseqüentemente, proporcionar um aumento na quantidade de gadolínio no tumor, contribuindo, assim, para aumentar a sensibilidade da RMI permitindo um diagnóstico, prognóstico e tratamento precoce muito mais preciso (CHEN et al., 2011; BRUCKMAN, YU, STEINMETZ, 2013; DARRAS et al., 2010).

Portanto, estas pesquisas são muito importantes, uma vez que apenas 10% dos tumores cerebrais, como os glioblastomas, apresentam alguma responsividade às terapias

convencionais. O desenvolvimento de novos sistemas de liberação contendo agentes de contraste para o diagnóstico e fármacos e macromoléculas para a terapêutica, pode ser uma alternativa para o tratamento deste tipo de tumor, pois estas nanopartículas poderiam facilitar a entrega destes agentes por meio das interações entre inibidores de integrinas e integrinas promovendo um tratamento e diagnóstico direcionado e mais efetivo.

## 7. CONCLUSÕES

- As nanopartículas de QS desenvolvidas pelo planejamento fatorial para a encapsulação do cRGDfV e cRGDfK se mostraram promissoras para a administração pela via nasal, pois apresentaram elevadas propriedades mucoadesivas. Essa elevada mucoadesividade das nanopartículas de QS podem favorecer a permanência na mucosa nasal o que poderia levar a um aumento da absorção do cRGDfV e cRGDfK e facilitar a passagem por meio das vias olfativas que se localizam na porção superior da cavidade nasal. Estudos de citotoxicidade e captação em células de GBMs, demonstraram que as nanopartículas de quitosana encapsuladas com os inibidores de integrinas foram não foram internalizadas por endocitose, além de não apresentarem interações com as integrinas expressas na superfície das células de GBMs. Observamos que os peptídeos encapsulados apresentaram-se menos citotóxicos que os peptídeos em solução, ou seja, a encapsulação dos peptídeos diminuiu a citotoxicidade sobre as células de GBMs.
- As nanopartículas de QS modificadas com PEG de forma supramolecular, não sofreram redução nas propriedades mucoadesivas das nanopartículas. A peguilação, além de promover um aumento da mucopenetração também podem aumentar o tempo de permanência na corrente circulatória após administração nasal. Os resultados de citotoxicidade e captação foram semelhantes aos observados pelas nanopartículas de QS sem modificação com PEG. As nanopartículas com os peptídeos encapsulados se mostraram menos citotóxicos em células de GBMs e foram internalizadas por mecanismos passivos. A modificação da nanopartícula com PEG pode promover um aumento da meia-vida na corrente sanguínea após a administração nasal das nanopartículas encapsuladas com cRGDfV e cRGDfK para atingirem o cérebro.
- As nanopartículas funcionalizadas com cRGDfK na superfície apresentaram um efeito citotóxico semelhante ao cRGDfK em solução. Nos experimentos de internalização por citometria de fluxo e microscopia confocal foi possível observar que a presença do cRGDfK na superfície das nanopartículas favorece uma interação específica com as integrinas  $\alpha\beta3$  e

$\alpha\beta 5$  superexpressas nas células de GBMs. Esta interação entre nanopartículas e integrinas pode facilitar a passagem das nanopartículas através da BHE. Através dos estudos de competição, onde um competidor foi adicionado as células de GBMs observamos que houve uma diminuição da internalização das nanopartículas funcionalizadas com cRGDfK. Este resultado confirma que o cRGDfK na superfície das nanopartículas compete com o inibidor de integrina pela interação com a integrinas. Essas nanopartículas funcionalizadas podem ser exploradas como plataforma para a encapsulação de novos fármacos antitumorais e agentes de contraste e podem ser utilizadas como sistemas teranósticos.

- Ambos os sistemas desenvolvidos com o cRGDfK encapsulado ou funcionalizado na superfície das nanopartículas podem ser promissoras. O cRGDfK encapsulado por ser protegido da degradação ácida e enzimática, e mesmo encapsulado apresentou um efeito citotóxico em células de GBMs. As vantagens em funcionalizar as nanopartículas com o cRGDfK na superfície é o direcionamento desses sistemas diretamente para o ambiente tumoral que apresenta elevada expressão de integrinas. Esse direcionamento pode promover um efeito antitumoral localizado nas células de GBMs.
- As nanopartículas de CMQS encapsuladas com Gd-DTPA e funcionalizadas com vicrostatin na superfície apresentaram um aumento da encapsulação de gadolínio comparado com o Magnevist® que é usado na clínica. Nos estudos de internalização em células de GBMs, observou-se um aumento expressivo da captação e internalização dessas nanopartículas. Além de funcionar como um sistema teranóstico as nanopartículas de CMQS funcionalizada com vicrostatin. podem ser futuramente exploradas como plataforma para a encapsulação de novos fármacos antitumorais unindo a terapia e diagnóstico em uma única plataforma a fim de auxiliar no tratamento dos GBMs.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDOLLAHI, A., GRIGGS, D.W., ZIEHER, H., ROTH, A., LIPSON, K.E., SAFFRICH, R., GRÖNE, H.J., HALLAHAN, D.E., REISFELD, R.A., DEBUS, J., NIETHAMMER, A.G., HUBER, P.E. Inhibition of alpha(v)beta3 integrin survival signaling enhances antiangiogenic and antitumor effects of radiotherapy. **Clin Cancer Res.**, v.11, n.17, p.6270-9, 2005.

ACCARDO, A., MORISCO, A., GIANOLIO, E., TESAURO, D., MANGIPIA, G., RADULESCU, A., BRANDT, A., MORELLI G. Nanoparticles containing octreotide peptides and gadolinium complexes for MRI applications. **J. Pept. Sci.**, v.17, n.2, p.154-162, 2011.

ADOCHITEI, A. DROCHIOIU, G. Rapid characterization of peptide Secondary structure by FT-IR spectroscopy. **Rev. Roum. Chim.**, v.56, n. 8, p.783-791, 2011.

AIKATERINI, L., LEITE, D., PILKINGTON, G. J. Nanomedicines and the Future of Glioma. **Neuro-Oncology**, v.10, n.2, 2015.

AINA, O. H. From combinatorial chemistry to cancer-targeting peptides. **Mol. Pharm.**, v.4, p.631-651, 2007.

ALBELDA, S.M.; METTE, S.A.; ELDER, D.E.; STEWART, R.; DAMJANOVICH, L.; HERLYN, M.; BUCK, C.A. Integrin distribution in malignant melanoma: association of the  $\beta 3$  subunit with tumor progression. **Cancer Res.**, v.50, p.6757- 6764, 1990.

ALEXIS, F., PRIDGEN, E., MOLNAR, L. K., FAROKHZAD, O. C. Factors affecting the clearance and biodistribution of polymeric nanoparticles. **Mol. Pharm.**, v.5, p.505-515, 2008.

ALONSO, M. J., LOSA, C., CALVO, P., VILA-JATO, J. L. Improvement of ocular penetration of amikacin sulphate by association to poly(butylcyanoacrylate) nanoparticles. **J. Pharm. Pharmacol.** v. 43, p. 548:552, 1991.

AMIDI, M.; ROMEIJN, S. G.; BORCHARD, G.; JUNGINGER, H. E.; HENNINK, W. E.; JISKOOT, W. Preparation and characterization of protein-loaded *N*-trimethyl chitosan nanoparticles as nasal delivery system. **J. Control. Release**, v. 111, p. 107-116, 2006.

ANDREWS, G. P.; LAVERTY, T. P.; JONES, D. S. Mucoadhesive polymeric platforms for controlled drug delivery. **Eur. J. Pharmac. Biopharmac.**, v.71, p.505-518, 2009.

AVERBUCH-POUCHOT, M.-T., DURIF, A. "Topics in Phosphate Chemistry." **Wold Scientific Pub Co Inc**: p.404, 1996.

AVRAAMIDES, C. J.; GARMY-SUSINI, B.; VARNER, J. A. Integrins in angiogenesis and lymphangiogenesis. **Nat. Rev. Cancer**, v. 8, n.8, p. 604-617, 2008.

BARAR, J., OMIDI, Y. Surface modified multifunctional nanomedicines for simultaneous imaging and therapy of cancer. **Bioimpacts.**, v.4, n.1, p.3-14, 2014.

BARBI, M. S. **Desenvolvimento de nanopartículas de quitosana para administração nasal de zidovudina**. 112f. Trabalho de conclusão de curso – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2011.

BARBI M.S.; CARVALHO, F.C.; KIILL, C.P.; BARUD, H.S.; SANTAGNELI, S.H.; RIBEIRO, S.J.; GREMIÃO, M,P. Preparation and Characterization of Chitosan Nanoparticles for Zidovudine Nasal Delivery. **J. Nanosci. Nanotechnol.**; v.15, n.1, p.865-874, 2015.

BASTARDO, L.; CLAEISSON, P.; BROWN, W. Interactions between Mucin and Alkyl Sodium Sulfates in Solution. A Light Scattering Study. *Langmuir*, p. 3848-3853, 2002.

BARRETT, T., BRECHBIEL, M., BERNARDO, M., CHOYKE, P. L. MRI of tumor angiogenesis. **J. Magn. Reson. Imaging.**, v.26, n.2,p.235-49, 2007.

BARSKY, D., PUTZ, B., SCHULTEN, K. MAGIN, R.L. Theory of paramagnetic contrast agents in liposome systems. **MRM**, v.21, p.1-13, 1992.

BARUA, S., MITRAGORI, S. Challenges associated with Penetration of Nanoparticles across Cell and Tissue Barriers: A Review of Current Status and Future Prospects. **Nano Today**, v.9, n.1, p.223-243, 2014.

BARUD, H.S.; **Preparo e caracterização de novos compósitos de celulose bacteriana**. 2006. 114f. Tese (Mestrado em Química) Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2006.

BARTH, A. Infrared spectroscopy of proteins. **Biochimica Biophysica Acta.**; 1767:1073-101, 2007.

BEVIGLIA, L.; STEWART, G. J.; NIEWIAROWSKI, S. Effect of four disintegrins on the adhesive and metastatic properties of B16F10 melanoma cells in a murine model. **Oncol. Res.**, v. 7, n. 1, p. 7-20, 1995.

BHATTARAI, N.; EDMONDSON, D.; VEISEH, O.; MATSEN, F. A., ZHANG, M. Electrospun chitosan-based nanofibers and their cellular compatibility. **Biomaterials**, v.26, p.6176- 6184, 2005.



- BHUMKAR, D. R., POKHARKAR, V. B. Studies on effect of pH on cross-linking of chitosan with sodium tripolyphosphate: **A technical note. AAPS PharmSciTech**, v.7, 2006  
Doi: 10.1208/pt070250.
- BJARNASON, J. B.N.; FOX, J. W. Haemorrhagic metalloproteinases from snake venoms. **Pharmac. Ther.**, v.62, p. 325-372, 1994.
- BORNSTEIN, P.; SAGE, E.H. Matricellular proteins: extracellular modulators of cell function. **Current. Opin. Cell Biol.**, v.14, p.608–616, 2002.
- BRAVO-OSUNA, I.; VAUTHIER, C.; FARABOLLINI, A.; PALMIERI, G. F.; PONCHEL, G. Mucoadhesion mechanism of chitosan and thiolated chitosan-poly(isobutyl cyanoacrylate) core-shell nanoparticles. **Biomaterials**, v.28, p. 2233-2243, 2007.
- BROOKS, P.C., MONTGOMERY, A.M.P., ROSENFELD, M., REISFELD, R.A., HU, T., KLIER, G., CHERESH, D.A. Integrin alpha V beta 3 antagonists promote tumor regression by inducing apoptosis of angiogenic blood vessels. **Cell**, v.79, p.1157–1164, 1994.
- BRUCKMAN, M. A., YU, X., STEINMETZ, N. F. Engineering Gd-loaded nanoparticles to enhance MRI sensitivity via T(1) shortening. **Nanotechnology**, v. 22, n. 46, p. 462001, 2013.
- BYLER, D.M, SUSI, H. Examination of the secondary structure of proteins by deconvolved FTIR spectra. **Biopolymers**. 25:469-87, 1986.
- CAI, L. L.; LIU, P.; LI, X.; HUANG, YE, Y-Q.; CHEN, F-Y.; YUAN, H.; HU, F-Q.; DU, Y-Z. RGD peptide-mediated chitosan-based polymeric micelles targeting delivery for integrin-overexpressing tumor cells. **Int. J. Nanomedicine**. v.6, p.3499-3508, 2011.
- CALVETE, J. J.; MARCINKIEWICZ, C.; MONLEÓN, D.; ESTEVE, V.; CELDA, B.; JUÁREZ, P.; SANZ, L. Snake venom disintegrins: evolution of structure and function. **Toxicon**, v. 45, n. 8, p. 1063-1074, 2005.
- CALVO, P., REMUÑAN-LÓPEZ, C., VILA-JATO, J.L., ALONSO, M.J. Chitosan and chitosan/ethylene oxide-propylene oxide block copolymer nanoparticles as novel carriers for proteins and vaccines. **Pharm Res.**, v.14, n.10, p.1431-6, 1997.
- CARAVAN, P. Strategies for increasing the sensitivity of gadolinium based MRI contrast agents. **Chem. Soc. Rev.**, v.35, p.512–523, 2006.
- CHAMPION, J. A., KATARE, Y. K., MITRAGOTRI, S. Particle shape: a new design parameter for micro- and nanoscale drug delivery carriers. **J. Control. Release**, v.121, p.3–9, 2007.

- CHATTERJEE, S.; MATSUMURA, A.; SCHRADERMEIER, J.; GILLESPIE, G. Y. Human malignant glioma therapy using anti- $\alpha_v\beta_3$  integrin agents. **J. Neuro-Oncology**, v.46, p.135–144, 2000.
- CHEN, F.; ZHANG, Z.-R.; HUANG, Y. Evaluation and modification of *N*-trimethyl chitosan chloride nanoparticles as protein carriers. **Int. J. Pharm.**, v. 336, p.166–173, 2007.
- CHEN, Z.; YU, D.; LIU, C.; YANG, X.; ZHANG, N.; MA, C.; SONG, J.; LU, Z. Gadolinium-conjugated PLA-PEG nanoparticles as liver targeted molecular MRI contrast agent. **J. Drug Target.**, v. 19, n.8, p. 657–665, 2011.
- CLEMENTE-CASARES, X., SANTAMARIA, P. Nanomedicine in autoimmunity. **Immunology Letters**, v.158, n.1-2, p. 167–74, 2014.
- COHEN, Y., SHOUSHAN, S.Y. Magnetic nanoparticles-based diagnostics and theranostics. **Curr. Opin. Biotechnol.**, v.24, n.4, 672–81, 2013.
- COMINETTI, M. R. **Estudo dos efeitos de metaloproteases/desintegrinas isoladas do veneno da serpente *Bothrops alternatus* sobre a adesão celular e expressão gênica**. 2004. 199f. Tese (Doutorado em Ciências Fisiológicas) – Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2004.
- CONDE, J., DIAS, J. T., GRAZÚ, V., MOROS, M., BAPTISTA, P. V., DE LA FUENTE, J. M. Revisiting 30 years of biofunctionalization and surface chemistry of inorganic nanoparticles for nanomedicine. **Front. Chem.**, v. 2, n. 48, 2014.
- CORBRIDGE, D. E. C., Phosphorus, Chemistry, Biochemistry and Technology: Oxyphosphorus Compounds, p.177-325, 2013.
- COULTHUP, N.B. Spectra structure correlations in the infrared region. **J. Opt. Soc. Am.**, v.40, n.6, p.397-400, 1950.
- CSABA, N.; KÖPING-HÖGGÅRD, M.; ALONSO, M. J. Ionically crosslinked chitosan/tripolyphosphate nanoparticles for oligonucleotide and plasmid DNA delivery. **Int. J. Pharm.**, v.382, n.1-2, p.205-214, 2009.
- DANEN, E. H.; MARCINKIEWICZ, C.; CORNELISSEN, I. M.; VAN KRAATS, A. A.; PACHTER, J. A.; RUITER, D. J.; NIEWIAROWSKI, S.; VAN MUIJEN, G. N. The disintegrin eristostatin interferes with integrin alpha 4 beta 1 function and with experimental metastasis of human melanoma cells. **Exp. Cell Res.**, v. 238, p. 188- 196, 1998.
- DANIELS, T.R., BERNABEU, E., RODRÍGUEZ, J.A., PATEL, S., KOZMAN, M., CHIAPPETTA, D.A., HOLLER, E., LJUBIMOVA, J.Y., HELGUERA, G., PENICHER, M.L. The transferrin receptor and the targeted delivery of therapeutic agents against cancer. **Biochim. Biophys. Acta**, v.1820, n.3, p. 291-317, 2012.

DARRAS, V., NELEA, M., WINNIK, F. M., BUSCHMANN, M. D., Chitosan modified with gadolinium diethylenetriaminepentaacetic acid for magnetic resonance imaging of DNA/chitosan nanoparticles. **Carbohydr. Polym.** v. 80, n. 4, p. 1137-1146, 2010.

DELAMARRE, E., TABOUBI, S., MATHIEU, S., BÉRENGUER, C., RIGOT, V., LISSITZKY, J-C., FIGARELLA-BRANGER, D., OUAFIK, L'H., LUIS, J. Expression of Integrin  $\alpha\beta 1$  Enhances Tumorigenesis in Glioma Cells. **Am. J. Pathol.**, v.175, n.2, p. 844–855, 2009. doi: 10.2353/ajpath.2009.080920

DENNIS, M. S.; HENZE, L. W. J.; PITTI, R. M. Platelet glycoprotein Iib-IIIa protein antagonists from snake venom: evidence for a family of platelet-aggregation inhibitors. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 87, p. 2471-2475, 1990.

DESGROSELLIER, J. S; CHERESH, D. A Integrins in cancer: biological implications and therapeutic opportunities. **Nat. Rev. Cancer.**, v. 10, p. 9-22, 2010.

DIAS FILHO, F. A. **Preparação e caracterização de coacervatos e vidros a base de fosfato, dopados com európio.** 2003. 110 f. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2003.

DINAUER, N., BALTHASAR, S., WEBER, C., KREUTER, J., LANGER, K., VON BRIESEN, H. Selective targeting of antibody-conjugated nanoparticles to leukemic cells and primary T-lymphocytes. **Biomaterials**, v. 26, n. 29, p.5898-906, 2005.

DHANALAKSHMI, C. P.; VIJAYALAKSHMI L.; NARAYANAN, V. Synthesis and preliminary characterization of polyethylene glycol (PEG)/hydroxyapatite (HAp) nanocomposite for biomedical applications. **Int. J. Physical Sciences**, v.7, n.13, p. 2093-2101, 2012.

DHAWAN, S.; SINGLA, A.; SINHA, V. Evaluation of mucoadhesive properties of chitosan microspheres prepared by different methods. **AAPS PharmSciTech**, v. 5, n. 4, p. 122-128, 2004.

DHURIA, S.V.; HANSON, L.R.; FREY, W.H. Intranasal delivery to the central nervous system: mechanisms and experimental considerations. **J. Pharm. Sci.**, v.99, n.4, p.1654-73, 2010.

DRAKE, A. F. **Protein-Ligand Interactions: structure and spectroscopy**; HARDING, S. E.; CHOWDHRY, B. Z.; Eds.; Oxford University Press Inc., New York, 2001.

DREHER, M.R., LIU, W., MICHELICH, C.R., DEWHIRST, M.W., YUAN, F., CHILKOTI, A. Tumor Vascular Permeability, Accumulation, and Penetration of Macromolecular Drug Carriers. **J. Natl. Cancer Inst.**, v.98, p.335–344, 2006.

DRUMMOND, D. C., MEYER, O., HONG, K. L., KIRPOTIN, D. B.; PAPAHDADJOPOULOS, D. Optimizing liposomes for delivery of chemotherapeutic agents to solid tumors. **Pharmacol. Rev.**, v.51, p.691–743,1999.

DUDHANI, A. R., KOSARAJU, S. L. Bioadhesive chitosan nanoparticles: Preparation and characterization. **Carbohydr. Pol.**, v.81, p.243–251, 2010.

DYER, A. M.; HINCHCLIFFE, M.; WATTS, P.; CASTILE, J.; JABBAL-GILL, I.; NANKERVIS, R.; SMITH, A.; ILLUM, L. Nasal delivery of insulin using novel chitosan based formulations: a comparative study in two animal models between simple chitosan formulations and chitosan nanoparticles. **Pharm. Res.**, v.19, p. 998–1008, 2002.

FALCIONI, R.; CIMINO, L.; GENTILESCHI, M.P.; CIMINO, L.; GENTILESCHI, M.P.; D'AGNANO, I.; ZUPI, G.; KENNEL, S.J.; SACCHI, A. Expression of  $\beta 1$ ,  $\beta 3$ ,  $\beta 4$ , and  $\beta 5$  integrins by human lung carcinoma cells of different histotypes. **Exp. Cell Res.**, v.210, p.113-122, 1994.

FOX, J. W.; SERRANO, S. M. Insights into and speculations about snake venom metalloproteinase (SVMP) synthesis, folding and disulfide bond formation and their contribution to venom complexity. **FEBS. J.**, v. 275, p. 3016–3030, 2008.

FUNDUEANU, G.; CONSTANTIN, M.; DALPIAZ, A.; BORTOLOTTI, F.; CORTESI, R.; ASCENZIC, P.; MENEGATTI, E. Preparation and characterization of starch cyclodextrin bioadhesive microspheres as platform for nasal administration of Gabexate Mesylate (Foy<sup>s</sup>) in allergic rhinitis treatment. **Biomaterials**, v. 25, p. 159-170, 2004.

FYFE, C. A., MEYER, H., ALTENSCHILDESCHE, Z.U., SKIBSTED, J. "Characterization of Na<sub>5</sub>P<sub>3</sub>O<sub>10</sub> Polymorphs by <sup>23</sup>Na MAS, <sup>23</sup>Na MQMAS, and <sup>31</sup>P MAS NMR Spectroscopy." **Inorganic Chemistry**, v.38, n.1, p. 84-92, 1998.

GAN, Z. R., GOULD, R.J., JACOBS, J. W., FRIEDMAN, P. A., POLOKOFF, M.A. Echistatin. A potent platelet aggregation inhibitor from the venom of the viper, *Echis carinatus*. **J. Biol. Chem.**, v. 263, p.19827–19832, 1988.

GASPARINI, G.; BROOKS, P.C.; BIGANZOLI, E.; VERMEULEN, P.B.; BONOLDI, E.; DIRIX, L.Y.; RANIERI, G.; MICELI, R.; CHERESH, D.A. Vascular integrin  $\alpha v\beta 3$ : a new prognostic indicator in breast cancer. **Clin. Cancer Res.**, v.4, n.11, p.2625- 2634, 1998.

GAVINI, E.; RASSU, G.; MUZZARELLI, C.; COSSU, M.; GIUNCHEDI, P. Spray-dried microspheres based on methylpyrrolidinone chitosan as new carrier for nasal administration of metoclopramide. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, v.68, p. 245–252, 2008.

GAYNOR, D. GRIFFITH, D. M. The prevalence of metal-based drugs as therapeutic or diagnostic agents: beyond platinum. **Dalton Trans.**, v. 41, p.13239-13257, 2012.

GENTILUCCI L; CARDILLO G; SPAMPINATO S; TOLOMELLI A; SQUASSABIA F; MARCO R; BEDINI A; BAIULA M; BELVISI L; CIVERA M. Antiangiogenic Effect of Dual/Selective  $\alpha_5\beta_1/\alpha_v\beta_3$  Integrin Antagonists Designed on Partially Modified Retro-Inverso Cyclotetrapeptide Mimetics. **J. Med. Chem.**, v.53, p.106-118, 2010.

GIANCOTTI, F. G.; RUOSLAHTI, E. Integrin signaling. **Science**, v.285, n. 5430, p.1028-1032, 1999.

GILBERT, M.R., KUHN, J., LAMBORN, K. R., LIEBERMAN, F., WEN, P. Y., MEHTA, M., CLOUGHESY, T., LASSMAN, A. B. DEANGELIS, L. M., CHANG, S., PRADOS, M. Cilengitide in patients with recurrent glioblastoma: the results of NABTC 03-02, a phase II trial with measures of treatment delivery. **J. Neurooncol.**, v.106, n.1, p.147-53, 2012.

GINÉS, J. M.; ARIAS, M. J.; RABASCO, A. M.; NOVÁK, C.; RUIZ-CONDE, A.; SÁNCHEZ SOTO, P. J. Thermal characterization of polyethylene glycols applied in the pharmaceutical technology using differential scanning calorimetry and hot stage microscopy. **J. Therm. Anal.**, v.46, n.1, p.291-304, 1996.

GINGRAS, M. C.; ROUSSEL, E.; BRUNER, J. M.; BRANCH, C.D.; MOSER, R. P. Comparison of cell adhesion molecule expression between glioblastoma multiforme and autologous normal brain tissue. **J. Neuroimmunol.**, v. 57, n.1-2, p. 143-153, 1995.

GLUKHOVA, M.; KOTELIANSKY, V. Integrins, cytoskeletal and extracellular matrix proteins in developing smooth muscle cells of human aorta. In: Schwartz, S.; Mecham, R., editors. **The Vascular Smooth Muscle Cell: Molecular and Biological Responses to the Extracellular Matrix**. San Diego, CA: Academic Press; p. 37-79, 1995.

GOULD, R. J.; POLOKOFF, M. A.; FRIEDMAN, P. A.; HUANG, T. F.; HOLT, J. C.; COOK, J. J.; NIEWIAROWSKI, S. Disintegrin: a family of integrin inhibitory proteins from viper venoms. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, v. 195, n.2, p. 168-171, 1990.

GRABAREK, Z., GERGELY, J. Zero-length crosslinking procedure with the use of active esters. **Anal. Biochem.**; v.185, n.1, p.131-5, 1990.

GREF, R., DOMB, A., QUELLEC, P., BLUNK, T., MULLER, R.H., VERBAVATZ, J.M., LANGER, R. The controlled intravenous delivery of drugs using PEG-coated sterically stabilized nanospheres. **Adv. Drug Deliv. Rev.** v.16, p.215-233, 1995.

GREF, R., LUCK, M., QUELLEC, P., MARCHAND, M., DELLACHERIE, E., HARNISCH, S., BLUNK, T., MULLER, R.H. 'Stealth' corona-core nanoparticles surface modified by polyethylene glycol (PEG): influences of the corona (PEG chain length and surface density) and of the core composition on phagocytic uptake and plasma protein adsorption. **Colloid Surf. B Biointerfaces**, v.18, p.301-313, 2000.

- GUIMARÃES, T. F. **Nanopartículas de quitosana como carreadoras de etoposide**. 101f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2005.
- GUO, W.; GIANCOTTI, F.G. Integrin signaling during tumor progression. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.**, v.5, n.10, p. 816-826, 2004.
- HAGE, M. C. F. N. S.; IWASAKI, M. Imagem por ressonância magnética: princípios básicos. **Ciência Rural**, v. 39, n. 4, p. 1287-1295, 2009.
- HAN, D.H.; MANGALA, L. S.; LEE, J. W.; SHAHZAD, M. M. K.; KIM, H. S.; SHEN, D.; NAM, E.J.; MORA, E. M.; STONE, R. L.; LU, C.; LEE, S.J.; ROH, J. W.; NICK, A. M.; LOPES-BERESTEIN, G.; SOOD, A. K. Targeted Gene Silencing Using RGD-Labeled Chitosan Nanoparticles **Clin. Cancer Res.**, v.16, n.15, p. 3910–3922, 2010.
- HALEY, B., FRENKEL, E. Nanoparticles for Drug Delivery in Cancer Treatment. **Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations**, v. 26, p. 57-64, 2008.
- HAUBNER, R., GRATIAS, R., DIEFENBACH, B., GOODMAN, S.L., JONCZYK, A., KESSLER, H. Structural and Functional Aspects of RGD-Containing Cyclic Pentapeptides as Highly Potent and Selective Integrin  $\alpha_v\beta_3$  Antagonists. **J. Am. Chem. Soc.**, v.118, n.32, p. 7461–7472, 1996.
- HE, L-H.; XUE, R.; YANG, D-B.; LIU, Y.; SONG, R. Effects of blending chitosan with PEG on surface morphology, crystallization and thermal properties. **Chin. J. Pol. Sci.**, n. 4 , p. 501-510 , 2009.
- HERVÉ, F.; GHINEA, N.; SCHERMANN, J. M. CNS delivery via adsorptive transcytosis. **AAPS J.**, v.10, p.455–472, 2008.
- HIROHASHI, S., HIROHASHI, R., UCHIDA, H. Optimal dose of hepatobiliary contrast agent for MR cholangiography: experimental study in rats. **J. MRI**, v.8, p. 847-852, 1998.
- HOLLAND, J.P., EVANS, M.J., RICE, S.L., WONGVIPA, T J., SAWYERS, C.L., LEWIS, J.S. Annotating MYC status with  $^{89}\text{Zr}$ -transferrin imaging. **Nat. Med.**, v.18, n.10, p.1586-1591, 2012.
- HOWE, A.; APLIN, A.E.; ALAHARI, S. K.; JULIANO, R. L. Integrin signaling and cell growth control. **Curr. Opin. Cell Biol.**, v.10, p.220-231, 1998.
- HUANG, T. F. What have snakes taught us about integrins? **Cell Mol. Life Sci.**, v. 54, p. 527-540, 1998.

- HUMPHRIES, J. D., WANG, P., STREULI, C., GEIGER, B., HUMPHRIES, M. J., BALLESTREM, C. Vinculin controls focal adhesion formation by direct interactions with talin and actin. **J. Cell Biol.**, v. 179, n.5, p. 1043-1057, 2007.
- HUSE, J. T., HOLLAND, E. C. Targeting brain cancer: advances in the molecular pathology of malignant glioma and medulloblastoma. **Nat. Rev. Cancer**, v.10, p.319-331, 2010.
- HYNES, R. O. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. **Cell**, v. 110, p. 673–687, 2002.
- ILLUM, L. Chitosan and its use as pharmaceutical expicent. **Pharm. Res.**, v.15, p. 1326-1331, 1998.
- ILLUM, E. Nasal drug delivery – possibilities, problems and solutions. **J. Control. Release**, v. 87, p.187-198, 2003.
- INOUE, K., OHTO, K., YOSHIZUKA, K., YAMAGUCHI, T., TANAKA, T. Adsorption of lead(II) ion on complexane types of chemically modified chitosan. **Bull. Chem. Soc. Jpn.**, v.70, n.10, p.2443–2447, 1997.
- INOUE, K., YOSHIZUKA, K., OHTO, K. Adsorptive separation of some metal ions by complexing agent types of chemically modified chitosan. **Anal. Chim. Acta.**, v.388, p.1–2, p.209–218, 1999.
- JACINTO, F. V.; ESTELLER, M. MGMT hypermethylation: a prognostic foe, a predictive friend. **DNA Repair**, v. 6, p. 1155-1160, 2007.
- JANG, L. S., KENG, H. K. Modified fabrication process of protein chips using a short-chain self-assembled monolayer. **Biomed. Microdevices**. v.10, p.203–211, 2008.
- JANIB, S. M.; LI, Z.; LIU, S.; MINEA, R. SWENSON, S.; MARKLAND, F.; CONTI, P.; MACKAY, J. Disintegrin-targeted elastin-loke polypeptide (ELPs) as a therapeutic and PET diagnostic imaging agent. **J. Nucl. Med.** v. 53, p.1733.
- JIANG, W. H.; HAN, S. J. Study of interaction between poly(ethylene glycol) and chitosan by viscosity method. **J. Polym. Sci., Part B:Polym. Phys.**, v.36, p.1275-1281, 1998.
- JIANG, W., KIM, B.Y.S., RUTKA, J.T., CHAN, W.C.W. Nanoparticle-mediated cellular response is size-dependent. **Nat. Nanotechnol.**, v.3, n.3, p.145-50, 2008.
- JIN, H.; VARNER, J. Integrins: roles in cancer development and as treatment targets. **Br. J. Cancer**, v.90, p.561-565, 2004.

- JUNG, G., KRAHE, T., KUGEL, H. Effects of superparamagnetic iron oxide (AMI-25) on magnetic resonance imaging of the liver using T2-weighted fast spin-echo sequences and gradient-and-spin-echo sequences at 1.0 tesla. **Invest. Radiol.**, v.33, n.2, p.61-67, 1998.
- KANG, I. C.; LEE, Y. D.; KIM, D. S. A novel disintegrin salmosin inhibits tumor angiogenesis. **Cancer Res.**, v. 59, p. 3754-3760, 1999.
- KANG, M. L.; CHO., C. S.; YOO., H. S. Application of chitosan microspheres for nasal delivery of vaccines. **Biotechnol. Adv.**, v.27, p. 857-86, 2009.
- KAUSKOT, A.; COMINETTI, M. R.; RAMOS, O.H.; BECHYNE, I.; RENARD, J.-M.; HOYLAERTS, M. F.; CREPIN, M.; LEGRAND, C.; SELISTRE-DE-ARAUJO, H. S.; BONNEFOY, A. Hemostatic effects of recombinant DisBa-01, a disintegrin from *Bothrops alternatus*. **Front. Biosci.**, v.13, p. 6604-6616, 2008.
- KATAOKA, K., NAGASAKI, Y., OTSUKA, H. PEGylated nanoparticles for biological and pharmaceutical applications. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, v.55, p. 403-419, 2003.
- KELLY, S. M.; PRICE, N. C. **Current Protein and Peptide Science**, v. 1, p.349-386, 2000.
- KESSLER, H, DIEFENBACK, B, FINSINGER, D, GEYER, A, GURRATH, M, GOODMAN, S.L, et al. Design of superactive and selective integrin receptor antagonists containing the RGD sequence. **Lett. Pept. Sci.**, v.2, p.155-60, 1995.
- KIJKOWSKA, R., KOWALSKI, Z., PAWLOWSKA-KOZINSKA, D., WZAREK, Z. Effect of Aluminum on Na<sub>5</sub>P<sub>3</sub>O<sub>10</sub> (Form-II → Form-I) Thermal Transformation. **Ind. Eng. Chem. Res.**, v. 43, n. 17, p 5221-5224, 2004.
- KIILL, C. P. Desenvolvimento de nanopartículas de quitosana para potencial administração nasal da DisBa-01, uma desintegrina recombinante do veneno da serpente *Rhinocerophis alternatus*. 106f. Dissertação de mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2012.
- KIM, J. H., KIM, Y. S., PARK, K., KANG, E., LEE, S., NAM, H. Y., KIM, K., PARK, J. H., CHI, D. Y., PARK, R. W., KIM, I. S., CHOI, K. KWON, I. C. Self-assembled glycol chitosan nanoparticles for the sustained and prolonged delivery of antiangiogenic small peptide drugs in cancer therapy. **Biomaterials**, v.29, p.1920-1930, 2008.
- KITTUR, F. S, HARISH-PRASHANTH, K. V, UDAYA-SANKAR, K, THARANATHAN, R. N. Characterization of chitin, chitosan and their carboxymethyl derivatives by differential scanning calorimetry. **Carbohydr. Polym.**, v.49, p.185-193, 2002.
- KLEIHUES, P., SOYLEMEZOGLU, F., SCHAUBLE, B., SCHEITHAUER, B.W., BURGER, P.C. Histopathology, classification and grading of gliomas. **Glia** 15: p.211-221, 1995.



- KNOTT, J. C.; MAHESPARAN, R.; GARCIA-CABRERA, I.; BOLGE, T. B.; EDVARDBSEN, K.; NESS, G. O.; MORK, S.; LUND-JOHANSEN, M.; BJERKVIG, R.; Stimulation of extracellular matrix components in the normal brain by invading glioma cells. **Int. J. Cancer**, v.75, n.6, p. 864-872, 1998.
- KOH, C. Y., KINI, M. R., From snake venom toxins to therapeutics – Cardiovascular examples. **Toxicon**, v. 59, n.4, p. 497-506, 2012.
- KONG, J., SHAONING, Y. U. Fourier Transform Infrared Spectroscopic Analysis of Protein Secondary Structures. **Acta Biochem. Cell Biol.**, v. 39, n. 8, p. 549-559, 2007.
- KONSTANTOPOULOS, K.; THOMAS, S. N. Cancer Cells in Transit: The Vascular Interactions of Tumor Cells. **Annu. Rev. Biomed. Eng.**, p.11, v.177- 202, 2009.
- KOPP, W.; BARUD, H. S., PAZ, M. F.; BUENO, L. A.; GIORDANO, R. L. C.; RIBEIRO, S. J. L. Calcium polyphosphate coacervates: effects of thermal treatment. **J Sol-Gel Sci Technol.**, v.39, n.1, 2006.
- KORKUSUZ, H., ULBRICH, K., WELZEL, K., KOEBERLE, V., WATCHARIN, W., BAHR, U., CHERNIKOV, V., KNOBLOCH, T., PETERSEN, S., HUEBNER, F., ACKERMANN, H., GELPERINA, S., KROMEN, W., HAMMERSTINGL, R., HAUPENTHAL, J., GRUENWALD, F., FIEHLER, J., ZEUZEM, S., KREUTER, J., VOGL, T.J. PIIPER, A. Transferrin-coated gadolinium nanoparticles as MRI contrast agent. **Mol. Imaging Biol.**, v.15, n.2, p.148-154, 2013.
- KREUTER, J. Nanoparticulate systems for brain delivery of drugs. **Adv. Drug Del. Rev.**, v.47, p.65-81, 2001.
- KROFT, L.J.M., DOORNBOS, J., VAN DER GEEST, R.J. Ultrasmall superparamagnetic particles of iron oxide (USPIO) MR imaging of infarcted myocardium in pigs. **MRI**, v.16, n.7, p.755-763, 1998.
- LAI, S. K.; WANG, Y. Y.; HANES, J. Mucus-penetrating nanoparticles for drug and gene delivery to mucosal tissues. **Adv Drug Deliv Rev.**, v.61, n.2, p.158-71, 2009.
- LAMEIRO, M. H.; LOPES, A.; MARTINS, L. O.; ALVES, P. M. Incorporation of a model protein into chitosan–bile salt microparticles. **Int. J. Pharm.**, v. 312, p. 119-130, 2006.
- LAUS, R.; LARANJEIRA, M. C. M.; MARTINS, A. O.; FÁVERE, V. T.; PEDROSA, R. C.; BENASSI, J. C.; GEREMIAS, R. Microesferas de quitosana reticuladas com tripolifosfato utilizadas para remoção da acidez, ferro (iii) e manganês (ii) de águas contaminadas pela mineração de carvão. **Quim. Nova**, v. 29, n. 1, p.34-39, 2006.
- LEE, S-T.; MI, F-L.; SHEN, Y-J.; SHYU, S-S. Nome paper. **Polymer.**, v.42, p.1879, 2001.

- LI, M.; DENG, H.; PENG, H.; WANG, Q. Functional nanoparticles in targeting glioma diagnosis and therapies. **J. Nanosci. Nanotechnol.** v.14, p.415-432, 2014.
- LIM, E.K., KIM, B., CHOI, Y., RO, Y., CHO, E.J., LEE, J.H., RYU, S.H., SUH, J.S., HAAM, S., HUH, Y.M. Aptamer-conjugated magnetic nanoparticles enable efficient targeted detection of integrin  $\alpha\beta3$  via magnetic resonance imaging. **J. Biomed. Mater. Res. A**, v.102, n.1, p.49-59, 2014.
- LIU, X.; MO, W.; DAI, L.; YAN, X.,SONG, H. Structure study of recombinant RGD-hirudin by vibrational and circular dichroism spectroscopy. **Protein Pept. Lett.** v.13,n.1, p.47-51, 2006.
- LOPEZ, D. R. L., LALATSA, A. *Active Targeting*. In: UCHEGBU, I., SCHÄTZLEIN, A., CHENG, W., LALATSA, A., Editors. **Fundamentals of Pharmaceutical Nanoscience**. Springer; New York, p. 337–374, 2013.
- LOUIS, D. N. Molecular pathology of malignant gliomas. **Annu. Rev. Pathol.** , p. 97-117, 2006.
- LOUIS, D. N.; HOLLAND, E. C.; CAIRNCROSS, J. G. Glioma classification: a molecular reappraisal. **Am. J. Pathol.**, v. 153, n.3, p. 779-786, 2001.
- LOUIS, D. N.; POMEROY, S. L.; CAIRNCROSS, J. G. Focus on central nervous system neoplasia. **Cancer Cell.**, v.1, n.2, p. 125-128, 2002.
- MAINARDES, R. M.; URBAN, M. C. C.; CINTO, P. O.; CHAUD, M. V.; EVANGELISTA, R. C.; GREMIÃO, M. P. D. Liposomes and micro/nanoparticles as colloidal carriers for nasal drug delivery. **Curr. Drug Targets**, v. 3, n. 3, p. 275-285, 2006.
- MAINARDES, R., KHALIL, N. M., GREMIÃO, M. P. D. Intranasal delivery of zidovudine by PLA and PLA-PEG blend nanoparticles. **Int. J. Pharm.**, v.395, p. 266-271, 2010.
- MAKINO, K.; NAKAMURA, H.; HIDE, T.; KURATSU, J. Salvage treatment with temozolomide in refractory or relapsed primary central nervous system lymphoma and assessment of the MGMT status. **J. Neurooncol.**, v. 106, p. 155-160, 2012.
- MALHOTRA, M.; TOMARO-DUCHESNEAU, C.; PRAKASH, S. Synthesis of TAT peptide-tagged PEGylated chitosan nanoparticles for siRNA delivery targeting neurodegenerative diseases. **Biomaterials**. v. 34, p.1270-1280, 2013.
- MALHOTRA, M., TOMARO-DUCHESNEAU,C., SAHA, S., PRAKASH, S. Intranasal, siRNA Delivery to the Brain by TAT/MGF Tagged PEGylated Chitosan Nanoparticles. **J. Pharmaceutics**, v. 2013, Article ID 812387, 10 pages, 2013.

- MALVERN, Malvern Instruments. Zetasizer nano series user manual. MAN0317, n. 11, 2004.
- MARINELLI, L.; LAVECCHIA, A.; GOTTSCHALKK, K.E.; NOVELLINO, E.; KESSLER, H. Docking studies on  $\alpha_v\beta_3$  integrin ligands: pharmacophore refinement and implications for drug design. **J. Med. Chem.**, v.46, n.21, p.4393-4404, 2003.
- MASSERINI, M. Nanoparticles for Brain Drug Delivery. **Biochemistry**, p. 2-17, 2013.
- MATSUMURA, Y., KIMURA, M., YAMAMOTO, T., MAEDA, H. Involvement of the Kinin-generating Cascade in Enhanced Vascular Permeability in Tumor Tissue. **Cancer Sci.**, v.79, p.1327-1334, 1988.
- MATTERN, R.H.; READ, S.B.; PIERSCHBACHER, M.D.; SZE, C.I.; ELICEIRI, B.P.; KRUSE, C. A. Glioma cell integrin expression and their interactions with integrin antagonists: Research Article. **Cancer Ther.**, v.3<sup>a</sup>, p.325-340, 2005.
- MAZZARINO, L. ; TRAVELET, C.; ORTEGA-MURILLO, S.; OTSUKA, I. ; PIGNOT-PAINTRAND, I. ; LEMOS-SENNA, E. ; BORSALI, R. . Elaboration of chitosan-coated nanoparticles loaded with curcumin for mucoadhesive applications. **J. Colloid Interface Sci.**, v. 370, p. 58-66, 2012.
- MAZZARINO, L., COCHE-GUERENTE, L., LEMOS-SENA, E., LABBLE, P., REDOUANE, B. On the Mucoadhesive Properties of Chitosan-Coated Polycaprolactone Nanoparticles Loaded with Curcumin Using Quartz Crystal Microbalance with Dissipation Monitoring. **J. Biom. Nanotechnol.**, v. 10, n.5, 2014
- McLANE, M. A.; MARCINKIEWICZ, C.; VIJAY-KUMAR, S.; WIERZBICKAPATYNOWSKI, I.; NIEWIAROWSKI, S. Viper venom disintegrins and related molecules. **Soc. Exp. Biol. Med.**, v. 219, p. 109-119, 1998.
- MEITAR, D.; CRAWFORD, S.E.; RADEMAKER, A.W.; COHN, S.L. Tumor angiogenesis correlates with metastatic disease, N-myc-amplification, and poor outcome in human neuroblastoma. **J. Clinical Oncol.**, v.14, p.405-414, 1996.
- MENTLEIN, R.; HELD-FEINDT, J. Angiogenesis factors in gliomas: a new key to tumour therapy. **Naturwissenschaften**, v.90, p.385-394, 2003.
- MIKKELSEN, T., BRODIE, C., FINNISS, S., BERENS, M.E., RENNERT, J.L., NELSON, K., LEMKE, N., BROWN, S.L., HAHN, D., NEUTEBOOM, B., GOODMAN, S.L. Radiation sensitization of glioblastoma by cilengitide has unanticipated schedule-dependency. **Int .J. Cancer.**, v.124, n.11, p.2719-27, 2009. doi: 10.1002/ijc.24240.
- MILOWSKY, M. I. Vascular targeted therapy with anti-prostate-specific membrane antigen monoclonal antibody J591 in advanced solid tumors. **J. Clin. Oncol.**, v.25, p.540-547, 2007.

- MINEA, R.O., HELCHOWSKI, C.M., ZIDOVETZKI, S.J., COSTA, F.K., SWENSON, S.D., MARKLAND, F.S. Vicrostatin - an anti-invasive multi-integrin targeting chimeric disintegrin with tumor anti-angiogenic and pro-apoptotic activities. **PLoS One**, v.5, n.6 , p.10929, 2010.
- MINEA, R., HELCHOWSKI, C., RUBINO, B., BRODMANN, K. SWENSON, S., MARKLAND, F. Development of a chimeric recombinant disintegrin as a cost-effective anti-cancer agent with promising translational potential. **Toxicol.**, v.59, n.4, p.472-482, 2012.
- MOKARRAN, A. R., ALONSO, M. J. Preparation and evaluation of chitosan nanoparticles containing Diphtheria toxoid as new carriers for nasal vaccine delivery in mice. **Arch. Razi Inst.**, v. 61, n.1, p.13-25, 2006.
- MONTENEGRO, C.F.; SALLA-PONTES, C.L.; RIBEIRO, J.U.; MACHADO, A. Z.; RAMOS, R. F.; FIGUEIREDO, C.C.; MORANDI, V.; SELISTRE-DE-ARAÚJO, H. S. Blocking  $\alpha_v\beta_3$  integrin by a recombinant RGD disintegrin impairs VEGF signaling in endothelial cells. **Biochimie**. v.94, n.8, p.1812-20, 2012.
- MORINI, R.; BECCHETTI, A. Integrin receptors and ligand-gated channels. **Adv. Exp. Med. Biol.**, v.674, p.95–105, 2010.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival. **J. Immunol. Methods**, v.65, p.55-63, 1983.
- MOUSTAFA, Y. M.; EL-EGILI, K. Infrared spectra of sodium phosphate glass. **J. Non-Cryst. Solids**, v. 240, p. 144-153, 1998.
- MRUGALLA, M. M. Advances and challenges in the treatment of glioblastoma: a clinical perspective. **Discov. Med.**, v. 15, n.83, p.221-230, 2013.
- MURA, S., COUVREUR, P. Nanotheranostics for personalized medicine. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, v. 64, n.13, p.1394–416, 2012.
- MUZZARELLI, R. A. A.; *Chitin*, 1 ed., **Pergamon Press**: Oxford, 1977.
- NABORS, L.B.; MIKKELSEN, T.; ROSENFELD, S. S. Phase I and correlative biology study of cilengitide in patients with recurrent malignant glioma. **J. Clin. Oncol.** v.25, p.1651–1657, 2007.
- NAKAJIMA, N., IKADA Y. Mechanism of amide formation by carbodiimide for bioconjugation in aqueous media. **Bioconjug. Chem.**, v.6, p.123–130, 1995.
- NIEWIAROWSKI, S.; MCLANE, M. A.; KLOCZEWIAK, M.; STEWART, G. J. Disintegrins and other naturally occurring antagonists of platelet fibrinogen receptors. **Sem. Hematol.**, v.31, p. 289-300, 1994.

- OLIVA, I. B.; COELHO, R. M.; BARCELLOS, G. G.; SALDANHA-GAMA, R.; WERMELINGER, L. S.; MARCINKIEWICZ, C.; BENEDETA ZINGALI, R.; BARJAFIDALGO, C. Effect of RGD-disintegrins on melanoma cell growth and metastasis: Involvement of the actin cytoskeleton, FAK and c-Fos. **Toxicol**, v. 50, p. 1053-1063, 2007.
- OLIVIER, J-C. Drug Transport to Brain with Targeted Nanoparticles. **The American Society for Experimental NeuroTherapeutics**, v. 2, 108–119, 2005.
- OWENS III, D. E., PEPPAS, N. A. Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles. **Int. J. Pharm.**, v. 307, p.93–102, 2006.
- PATI, F., ADHIKARI, B., DHARA,S. Development of chitosan-tripolyphosphate fibers through pH dependent ionotropic gelation. **Carbohydr. Res.**, v.346, n.16, p.2582-8, 2011.
- PATIL, M. P.; GAIKWAD, N. J. Characterization of gliclazide-polyethylene glycol solid dispersion and its effect on dissolution. **Braz. J. Pharm. Sci.**, v.47, n.1, p. 161-166, 2011.
- PAULUS, W.; TONN, J. C. Basement membrane invasion of glioma cells mediated by integrin receptors. **J. Neurosurg.**, v.80, n.3, p.515-519, 1994.
- PEDREIRO, L. N. **Desenvolvimento de dispersões sólidas e nanopartículas poliméricas mucoadesivas de zidovudina e avaliação da interação biológica com a mucosa intestinal**. 2015. 146 f Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Araraquara.
- PEERLINCK, K., GOLDBERG, L.I., FARRELL, D., BARRET, J., HAND, E., PANEBIANCO, D., DECKMYN, H., VERMYLEN, J., ARNOUT, J. MK-383 (L-700,462), a selective nonpeptide platelet glycoprotein Iib/IIIa antagonist, is active in man. **Circulation**, v. 88, p.1512-1517, 1993.
- PETERSON, G. L. A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. **Anal. Biochem.**, v. 83, n. 2, p. 346-356, 1977.
- PETROS, R. A., DeSimone, J. M. Strategies in the design of nanoparticles for therapeutic applications. **Nat. Rev. Drug Discovery**. v.9, p.615-627, 2010.
- PETRUZZELLI, L.; TAKAMI, M.; HUMES, H. D. Structure and function of cell adhesion molecules. **Am. J. Med.**, v. 106, n. 4, p. 467-476, 1999.
- PIELICHOWSKI, K.; FLEJTUCH, K.; Differential scanning calorimetric studies on poly(ethylene glycol) with different molecular weights for thermal energy storage materials. **Polym. Adv. Technol.**, v.13, p.690-696, 2002.

- PIJUAN-THOMPSON, V.; GLADSON, C. L. Ligation of integrin  $\alpha_5\beta_1$  is required of internalization of vitronectin by integrin  $\alpha_v\beta_3$ . **J. Biol. Chem.**, v.272, n.5, p. 2736-2743, 1997.
- PIKAL, M. J, RIGSBEE D. R. The stability of insulin in crystalline and amorphous solids: observation of greater stability for the amorphous form. **Pharm. Res.**, v. 14, p.1379–87, 1997.
- PLATE, K.H; RISAU, W. Angiogenesis in malignant gliomas. **Glia**, v.15, p.339-347,1995.
- PRADOS, M. Temozolomide in combination with other cytotoxic agents. **Semin. Oncol.**, v.28, p.88-95, 2001.
- QUAN, J.-S; JIANG, H.-L; KIM, E.-M.; JEONG, H.-J.; CHOI, Y.-J.; GUO, D.-D.; YOO, M.-K.; LEE, H.-G.; CHO, C.-S. pH-sensitive and mucoadhesive thiolated eudragit-coated chitosan microspheres. **Int. J. Pharm.**, v. 359, p. 205–210, 2008.
- RAMOS, O. H. P. Desintegrinas de *Bothrops alternatus*: Biologia molecular, estudos *in vitro*, *in vivo* e bioinformática estrutural. Tese de Doutorado apresentada à Universidade Federal de São Carlos. 2005.
- RAMOS, O. H.; KAUSKOT, A.; COMINETTI, M. R.; BECHYNE, I.; PONTES, C. L. S.; CHAREYRE, F. A novel  $\alpha_v\beta_3$ -blocking disintegrin containing RGD motive, DisBa-01, inhibits bFGF-induced angiogenesis and melanoma metastasis. **Clin. Exp. Metastasis**, v. 25, p. 53 – 64, 2008.
- RAPOPORT, A.; WINNER, P. Nasal delivery of antimigraine drugs: clinical rationale and evidence base. **Headache**. v. 46, n.4, p. S192-201, 2006.
- RASHCHI, F.; FINCH, J. A. **Polyphosphates: a review their chemistry and application with particular reference to mineral processing**. Minerals Engineering, v. 13, n. 10-11,p. 1019-1035, 2000.
- REARDON, D.A.; FINK, K.L.; MIKKELSEN, T., et al. Randomized phase II study of cilengitide, an integrin-targeting arginine-glycine-aspartic acid peptide, in recurrent glioblastoma multiforme. **J. Clin. Oncol.**, v.26, p.5610–5617, 2008.
- REARDON, D.A.; NABORS, L.B., STUPP, R. MIKKELSEN, T. Cilengitide: an integrin-targeting arginine-glycine-aspartic acid peptide with promising activity for glioblastoma multiforme. **Expert . Opin. Investig. Drugs**. v.17, p.1225–1235, 2008.
- RETZIOS, A.D., MARKLAND, F.S.JR. A direct-acting fibrinolytic enzyme from the venom of *Agkistrodon contortrix contortrix*: effects on various components of the human blood coagulation and fibrinolysis systems. **Thromb. Res.**; v.52, n.6, p.541-52, 1988.

- RUNGE, V.M., WELLS, J.W., WILLIAMS, N.M. Evaluation of gadolinium 2,5-BPA-DO3A, a new macrocyclic hepatobiliary chelate, in normal and metastatic disease on high field magnetic resonance imaging. **Invest. Radiol.**, v.31, n.1, p.11-16, 1996.
- SADEGHI, A. M. M.; DORKOOSH, F. A.; AVADI, M. R.; SAADAT, P.; RAFIEE-TEHRANI, M., JUNGINGER, H. E. Preparation, characterization and antibacterial activities of chitosan, N-trimethyl chitosan (TMC) and N-diethylmethyl chitosan (DEMC) nanoparticles loaded with insulin using both the ionotropic gelation and polyelectrolyte complexation methods. **Int. J. Pharm.**, v. 355, p. 299–306, 2008.
- SAM, S., TOUAHIR, L., SALVADOR ANDRESA, J., ALLONGUE, P., CHAZALVIEL, J. N., GOUGET-LAEMMEL, A. C. Semiquantitative study of the EDC/NHS activation of acid terminal groups at modified porous silicon surfaces. **Langmuir**, v.26, p.809–814, 2009.
- SANSON, M; THILLET, J; HOANG-XUAN, K. “Molecular changes in glioma”. **Curr. Opin. Oncol.**, v.16, p.607-613, 2004.
- SARMENTO, B., FERREIRA, D., VEIGA, F., RIBEIRO, A. Characterization of insulin-loaded alginate nanoparticles produced by ionotropic pre-gelation through DSC and FTIR studies. **Carbohydr. Polym.**, v. 66, p.1–7, 2006.
- SCHAFFAZICK, S. R., GUTERRES, S. S., FREITA, L. L., POHLMANN, A. R. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Quím. Nova**, v.26, p.726-737. 2003.
- SCHMITT-WILLICH, H., BREHM, M., EWERS, C.L.J. Synthesis and physicochemical characterization of a new gadolinium chelate: the liver-specific magnetic resonance imaging contrast agent Gd-EOB-DTPA. **Inorg. Chem.**, v.38, p.1134-1144, 1999.
- SCHNELL, O.; KREBS, B.; WAGNER, E.; ROMAGNA, A.; BEER, A.J.; GRAU, S.J.; THON, N.; GOETZ, C.; KRETZSCHMAR, H.A.; TONN, J.C.; GOLDBRUNNER, R.H. Expression of integrin  $\alpha v \beta 3$  in gliomas correlates with tumor grade and is not restricted to tumor vasculature. **Brain Pathol.**, v.18, p.378- 86, 2008.
- SCHWARTZ, M. A.; BARON, V. Interaction between mitogenic stimuli, or a thousand and one connections. **Curr. Opin. Cell Biol.**, v.11, p.197-202, 1999.
- SHATTIL, S. J.; KASHIWAGI, H.; PAMPORI, N. Integrin Signaling: The Platelet Paradigm. **Blood**, v. 91, p. 2645-2657, 1998.
- SHEN, H., JAWAID, A. M., SNEE, P. T. Poly(ethylene glycol) Carbodiimide coupling reagents for the biological and chemical functionalization of water-soluble nanoparticles. **ACS Nano**, v.3, p.915–923, 2009.

SHEU, J. R.; YEN, M. H.; PENG, H. C.; CHANG, M. C.; HUANG, T. F. Triflavin, an Arg-Gly-Asp-containing peptide, prevents platelet plug formation in in vivo experiments. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 294, n. 1, p. 231-238, 1995.

SHUTER, B., WANG, S.C., ROCHE, J. Relaxivity of Gd-EOB-DTPA in the normal and biliary obstructed guinea pig. **J. MRI**, v.8, p.853-861, 1998.

SKULI N., MONFERRAN, S., DELMAS, C., FAVRE, G., BONNET, J., TOULAS, C., COHEN-JONATHAN MOYAL, E. Alphavbeta3/alphavbeta5 integrins-FAK-RhoB: a novel pathway for hypoxia regulation in glioblastoma. **Cancer Res.**, v. 69, n.8, p.3308-16, 2009. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-2158.

SOUZA, D. H. F.; IEMMA, M. R. C.; FERREIRA, L. L.; FARIA, J. P.; OLIVA, M. L.; ZINGALI, V. R. B.; NIEWIAROWSKI, S.; SELISTRE-DE-ARAÚJO, H. S. The disintegrin-like domain of the snake venom metalloprotease alternagin inhibits  $\alpha_2\beta_1$  integrin-mediated cell adhesion. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 384, p.341-350, 2000.

STREULI, C. Extracellular matrix remodeling and cellular differentiation. **Curr. Opin. Cell Biol.** v.11, p.634-640, 1999.

SUREWICZ, W.K, MANTSCH, H.H. New insight into protein secondary from resolution-enhanced infrared spectra. **Biochimica Biophysica Acta.** 952:115-30, 1988.

STUART, B. **Biological applications of infrared spectroscopy.** Chichester: John Wiley & Sons, Ltd.; 1997.

STUPP, R.; GOLDBRUNNER, R.; NEYNS, B.; SCHLEGEL, U.; CLEMENT, P.; GRABENBAUER, G. G.; HEGI, M. E.; NIPPGEN, J.; PICARD, M.; WELLER, M. Phase I/IIa trial of cilengitide (EMD121974) and temozolomide with concomitant radiotherapy, followed by temozolomide and cilengitide maintenance therapy in patients (pts) with newly diagnosed glioblastoma (GBM). **J. Clin. Oncol.**, Annual Meeting Proceedings. v.25, n. 18S, 2007.

SVENSSON, O., THURESSON, K., ARNEBRANT, T. Interactions between chitosan-modified particles and mucin-coated surfaces, **J. Colloid Interface Sci.** v.325, p.346-350, 2008.

SWENSON, S., COSTA, F. Intravenous liposomal delivery of the snake venom disintegrin contortrostatin limits breast cancer progression. **Mol. Cancer Ther.**, v.3, n.4, p.499-511, 2004.

TARIN, D. Clinical and experimental studies on the biology of metastasis. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 780, p. 227-235, 1985.



- TALEGAONKAR, S.; MISHRA, P. R. Intranasal delivery: an approach to bypass the blood brain barrier. **Indian J. Pharmacol.**, v.36, p.140-147, 2004.
- TOBIO, M.; GREF, R.; SANCHEZ, A.; LANGER, R.; ALONSO, M.J. Stealth PLA-PEG nanoparticles as protein carriers for nasal administration. **Pharm. Res.** v.15, n.2, p.270-275, 1998.
- TRIKHA, M., ROTE, W. E. Purification and characterization of platelet aggregation inhibitors from snake venoms. **Thromb. Res.**, v.73, n.1, p.39-52, 1994.
- UHM, J.H.; GLADSON, C.L.; RAO, J. S. The role of integrins in malignant phenotype of gliomas. **Front. Biosci.**, v.4, p. D188-199, 1999b.
- VASCONCELOS, F.; CRISTOL, S.; PAUL, J-F; TRICOT, G. G.; AMOUREUX, J. P.; MONTAGNE, L.; MAURI, F.; DELEVOYE, L. <sup>17</sup>O solid-state NMR and first-principles calculations of sodium trimetaphosphate (Na<sub>3</sub>P<sub>3</sub>O<sub>9</sub>), tripolyphosphate (Na<sub>5</sub>P<sub>3</sub>O<sub>10</sub>), and pyrophosphate (Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>). **Inorg. Chem.**, v.47, n.16, p.7327, 2008.
- VOLODKIN, D.; BALL, V.; SCHAAF, P.; VOEGEL, J.-C.; MOHWALD, H. Complexation of phosphocholine liposomes with polylysine. Stabilization by surface coverage versus aggregation. **Biochim. Biophys. Acta**, 1768, p.280-290, 2007.
- WANG, Y-Y.; LAI, S. K.; SUK, J. S.; PACE, A.; HANES, J. Addressing the PEG Mucoadhesivity Paradox to Engineer Nanoparticles that “Slip” through the Human Mucus Barrier. **Angew Chem Int Ed Engl.**, v.47, n.50, p.9726–9729, 2008.
- WAN, Y., CREBER, K. A. M., PEPPELEY, B., BUI, V. T. Synthesis, characterization and ionic conductive properties of phosphorylated chitosan membranes. **Macromol. Chem. Physiol.**, v. 204, p.850-858, 2003.
- WONGSAGONSUP, R., SHOBSNGOB, S., OONKHANOND, B., & VARAVINIT, S. Zeta potential and pasting properties of phosphorylated or crosslinked rice starches. **Stärke**, v.57, p.32–37, 2005.
- WOODLEY, J. Bioadhesion, new possibilities for drug administration? **Clin. Pharmacokinet.**, v. 40, n. 2, p. 77-84, 2001.
- WU, X.; REDDY, D.S.; Integrins as receptor targets for neurological disorders. **Pharmacol. Ther.**; v.134, n.1, p.68-81, 2012.
- XIONG, J.-P.; STEHLE, T.; ZHANG, R.; JOACHIMIAK, A.; FRECH, M.; GOODMAN, S. L.; ARNAOUT, M. A. Crystal Structure of the Extracellular Segment of Integrin  $\alpha_v\beta_3$  in Complex with an Arg-Gly-Asp Ligand. **Science**, v.296, p.151-155, 2002.

- YANG, R. S.; TANG, C. H.; CHUANG, W. J.; HUANG, T. H.; PENG, H. C.; HUANG, T. F.; FU, W. M. Inhibition of tumor formation by snake venom disintegrin. **Toxicon**, v. 45, p. 661-669, 2005.
- YI, M.; RUOSLAHTI, E. A fibronectin fragment inhibits tumor growth, angiogenesis, and metastasis. **Proc. Natl Acad. Sci. USA**, v.98, p.620–624, 2001.
- YIN, Y., CHEN, D., QIAO, M., LU, Z., HU, H., 2006. Preparation and evaluation of lectin-conjugated PLGA nanoparticles for oral delivery of thymopentin. **J. Control. Release**, v.116, p.337, 2006.
- YIN, H-Q.; MAI, D-S.; GAN, F.; CHEN, X-J. One-step synthesis of linear and cyclic RGD conjugated gold nanoparticles for tumour targeting and imaging **RSC Adv.**, v.4, p.9078-9085, 2014.
- YU, Y. P.; WANG, Q.; LIU, Y. C.; XIE, Y. Molecular basis for the targeted binding of RGD-containing peptideto integrin  $\alpha_v\beta_3$ . **Biomaterials.**, n. 5, v.35, p.1667-1675, 2014.
- ZHAN, C., GU, B., XIE, C., LI, J., LIU, Y., LU, W. Cyclic RGD conjugated poly(ethylene glycol)-co-poly(lactic acid) micelle enhances paclitaxel anti-glioblastoma effect. **J. Control. Release**, v.143, n.1, p.136-42, 2009.
- ZHAN, C.; MENG, Q.; LI, Q.; FENG, L.; ZHU, J.; LU, W. Cyclic RGD–Polyethylene Glycol–Polyethylenimine for Intracranial Glioblastoma-Targeted Gene Delivery. **Chemistry – An Asian Journal**, v.7, n.1, p.91–96, 2012.
- ZHANG, X.; ZHANG, H., WU, Z. Nasal absorption enhancement of insulin using PEG-grafted chitosan nanoparticles. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, v.68, p.526–534, 2008.
- ZHANG, C. Y.; ZHANG, C. L.; WANG, J. F.; LU, C. H.; ZHANG, Z.; WANG, X. P.; FANG, Q. F. **Journal of Applied Polymer Science**, v.127, n.3, p.2152, 2013.
- ZITZMANN, S.; EHEMANN, V.; SCHWAB, M. Arginine-glycine-aspartic acid (RGD)-peptide binds to both tumor and tumor-endothelial cells in vivo. **Cancer Res.**, v.62, p.5139-5143, 2002.