



**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

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 bichinônico
- 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 do 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.</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>27</b>
<b>2.</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>35</b>
<b>2.1.</b>	<b>Câncer.....</b>	<b>35</b>
<b>2.2.</b>	<b>Quimioterapia em glioblastomas.....</b>	<b>37</b>
<b>2.3.</b>	<b>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.</b>	<b>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.</b>	<b>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.</b>	<b>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.</b>	<b>Sistemas multifuncionais teranósticos como estratégia para terapia e diagnóstico por imagem em GBMs.....</b>	<b>64</b>
<b>3.</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>71</b>
<b>4.</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>72</b>
<b>4.1.</b>	<b>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.</b>	<b>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).

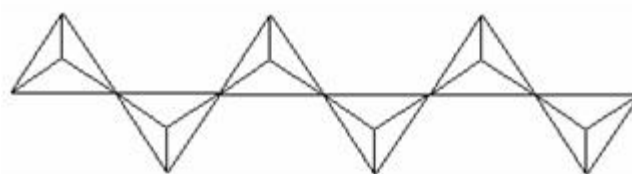
Nanopartículas de quitosana para incorporação de desintegrinas foram desenvolvidas por Kiill, 2012. As nanopartículas de quitosana reticuladas com tripolifosfato de sódio e incorporadas com a desintegrina DisBa-01 mostraram alta eficiência de encapsulação e aumento significativo da mucoadesão em mucosa 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.

## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

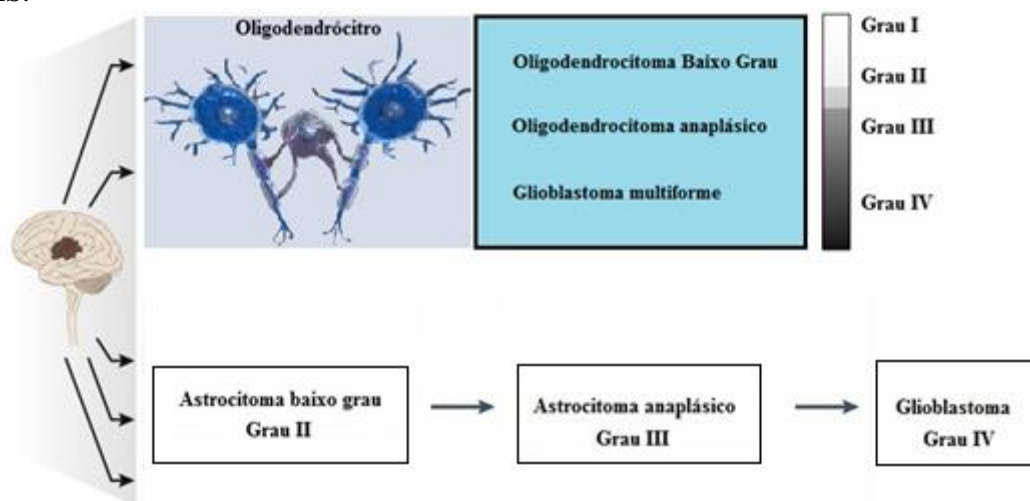
### **2.1. Câncer**

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 de seus mecanismos, ainda não foram elucidados. Dentre os diferentes tipos de tumores existentes, os do sistema nervoso central (SNC) são responsáveis por 4% 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), os quais podem ser classificados quanto ao seu grau de malignidade. Os tumores derivados de oligodendrócitos classificam-se em grau I, II ou III. As lesões de grau I têm um baixo poder proliferativo e têm ótimo prognóstico após ressecção cirúrgica. As de grau II têm atividade proliferativa pouco intensa, mas são recorrentes e podem se transformar em tumores mais agressivos do tipo grau III (anaplásico) e de grau IV (glioblastoma), como pode ser observado na Figura 2. Os gliomas de grau III exibem aumento de anaplasia e proliferação, no entanto, os gliomas de grau IV (GBM) são a forma mais invasiva (KLEIHUES et al., 1995; LOUIS, 2006).

Os glioblastomas representam aproximadamente 15% dos tumores cerebrais o que faz com que estes tumores tenham alta relevância clínica (LOUIS, HOLLAND, CAIRNCROSS, 2001; LOUIS, POMEROY, CAIRNCROSS, 2002).

**Figura 2** - Progressão maligna de astrocitoma humano (do grau I ao grau IV) segundo classificação da OMS.



Fonte: Adaptado de HUSE; HOLLAND, 2010.

A dificuldade em se distinguir a natureza da célula tumoral (astrócitos ou oligodendrócitos) é um problema enfrentado no diagnóstico de gliomas, e isso ocorre principalmente pela falta de um marcador exclusivo e confiável para oligodendrocitoma (SANSON et al., 2004). Por esse motivo, a OMS incorporou à sua classificação alguns critérios de diagnóstico, como análises imuno-histoquímicas da expressão de proteínas de citoesqueleto, tais como a vimentina e a proteína glial fibrilar ácida (GFAP), e o fator de crescimento de endotélio vascular (VEGF). Também foram acrescentadas análises moleculares como a perda ou mutação do gene p53, perda do PTEN/MMAC1 (gene supressor tumoral), amplificação do CDK4 (quinase dependente de ciclina) e dos receptores dos fatores de crescimento epidermal (EGF) e de crescimento derivado de plaqueta (PDGF) (MENTLEIN; HELD-FEINDT, 2003; PLATE; RISAU, 1995). Entretanto, a classificação da OMS não mudou expressivamente a sobrevivência dos pacientes com gliomas, indicando a necessidade de utilização de alternativas que melhorem o diagnóstico destas neoplasias.

Os principais tratamentos dos gliomas consistem na retirada do tumor por meio de cirurgia, radioterapia e quimioterapia com temozolamida (TMZ). Embora esse tipo de tumor raramente apresenta metástase fora do SNC, os GBMs são fortemente resistentes às quimioterapias convencionais assim como à radioterapia devido a sua infiltração difusa no cérebro (LOUIS; POMEROY; CAIRNCROSS, 2002). Segundo a OMS, apenas 10% dos GBMs apresentam alguma responsividade às terapias convencionais. Portanto, é de extrema

importância o desenvolvimento de novos tratamentos e terapias alternativas para estes tipos de tumores.

## **2.2. Quimioterapia em glioblastomas**

Durante a última década, uma grande variedade de tratamentos para os GBMs foi explorado. Entretanto, a maioria deles teve sucesso limitado devido à localização do tumor e a sua biologia complexa e heterogênea (MRUGALA, 2013).

Atualmente, o tratamento padrão para pacientes com diagnóstico recente de GBMs inclui ressecção cirúrgica do tumor seguida por seis meses de radioterapia, além de administração concomitante de TMZ (MRUGALA, 2013). A quimioterapia utiliza fármacos para impedir a replicação celular e a radioterapia utiliza a radiação com o objetivo de impedir a proliferação celular. Essa radiação pode ser particulada (prótons e nêutrons) ou eletromagnética (raios gama ou raio X).

Os quimioterápicos mais comumente empregados incluíam o agente carmustina e molustina, assim como os agentes metilantes procarbazina e TMZ, utilizados sozinhos ou em combinação (PRADOS, 2011).

A TMZ é um agente alquilante com toxicidade moderada quando administrado oralmente e é capaz de atravessar a BHE. TMZ atua como um pró-fármaco e é estável em pH ácido, uma vantagem que permite sua administração por via oral. Em pH fisiológico, a TMZ sofre conversão química espontânea para formar o metabólito citotóxico monometil triazeno 5-(3-metil triazeno-1-il)-imidazol-4-carboxamida (MTIC), o qual é responsável pela depleção da enzima de reparo do DNA O<sup>6</sup>-metilguanina-DNA metiltransferase (MGMT). A metilação do DNA parece ser o principal mecanismo responsável pela citotoxicidade da TMZ (JACINTO, ESTELLER, 2007; MAKINO et al., 2012).

## **2.3. O papel das integrinas no câncer**

Neste tópico será discutido o papel das integrinas como reguladores de diversas funções em células tumorais, incluindo proliferação, migração e invasão. Integrinas são intermediadoras na comunicação entre o citoesqueleto celular e proteínas plasmáticas ou da matriz extracelular por meio da adesão célula-a-célula através de interações com outras proteínas de membrana. Desse modo, as integrinas podem ser consideradas moduladores

chave da proliferação, migração, e ainda, a manutenção das funções específicas de diferenciação celular. A importante contribuição das integrinas na biologia das células tumorais tem feito das integrinas um alvo atraente para o desenvolvimento de terapias específicas em diferentes tipos de câncer, entre eles os GBMs. Além disso, o uso de integrinas como biomarcadores para imagem e terapêutica representa uma área bastante promissora (CAI, et al., 2011; LI et al., 2014).

### **2.3.1. Matriz extracelular e integrinas**

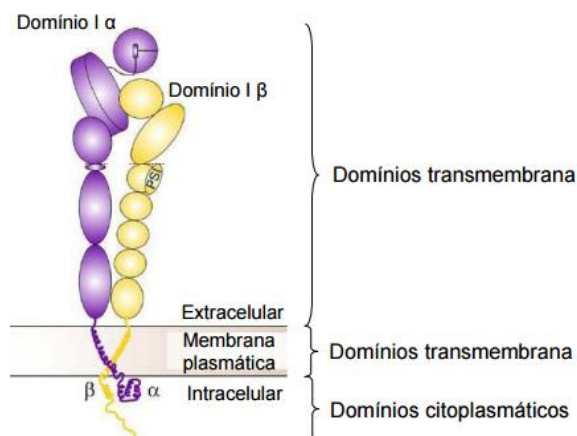
A matriz extracelular (MEC) determina as propriedades físicas dos tecidos, bem como muitas de suas características. Em alguns casos, uma mesma proteína da MEC pode desempenhar diferentes funções, dependendo das vias de sinalização que são ativadas. De maneira geral, a MEC pode ser definida como um grupo de moléculas de diferente natureza que interagem entre si de forma dinâmica e que estão estreitamente relacionadas com a fisiologia celular (BORNSTEIN; SAGE, 2002).

Os efeitos da MEC sobre o comportamento da célula podem ocorrer por dois principais mecanismos: no primeiro ocorre o armazenamento de fatores de crescimento ou proteínas que se ligam a fatores de crescimento. Após um armazenamento passivo destes fatores, a MEC pode liberá-los, através do remodelamento enzimático. No segundo mecanismo, as interações entre célula e MEC podem regular diretamente o comportamento da célula, através da sinalização mediada por receptor, ou por modulação da resposta celular a fatores de crescimento (STREULI et al., 1999). Por exemplo, a ligação de integrinas, a maior classe de receptores de moléculas da MEC, altera profundamente a resposta celular a sinais mitógenos e tem uma grande contribuição no desenvolvimento de tumores, incluindo GBMs e tumores de mama (HOWE et al., 1998; SCHWARTZ; BARON, 1999).

O termo integrina descreve uma família de receptores da superfície celular que desempenham um papel chave na mediação e interação entre as células tumorais, endoteliais e os componentes da MEC. Estas proteínas heterodiméricas são constituídas de uma subunidade  $\alpha$  e uma  $\beta$ . Até o momento são conhecidas 18 subunidades  $\alpha$  e 8 subunidades  $\beta$  que se combinam para formar pelo menos 24 integrinas diferentes. Estruturalmente as integrinas são glicoproteínas transmembrana heterodiméricas constituídas por uma subunidade  $\alpha$  (120-180 kDa) e  $\beta$  (90-110 kDa) ligadas não covalentemente (Figura 3). Cada

subunidade contém um domínio extracelular (700-900 aminoácidos), um domínio transmembrana e um domínio citoplasmático (HUMPHRIES et al., 2007; HYNES, 2002).

**Figura 3** - Estrutura das subunidades das integrinas.



Fonte: GAHMBERG et al., 2009.

As integrinas são expressas em baixas quantidades em células normais e altamente expressas em células tumorais. A integrina  $\alpha_v\beta_3$  é geralmente expressa em baixos níveis em células epiteliais e células endoteliais, mas é altamente expressada em tumores, incluindo neuroblastomas e glioblastomas (ALBELDA et al., 1990; FALCIONI et al., 1994; GASPARINI et al., 1998; SCHNELL et al., 2008). A integrina  $\alpha_v\beta_3$  é superexpressa não somente em células tumorais, mas também em células endoteliais da neovasculatura tumoral. A superexpressão da  $\alpha_v\beta_3$  em células endoteliais ativadas pode favorecer a adesão celular e migração durante a angiogênese tumoral e sua expressão em células de carcinoma potencializa metástases pela facilitação da invasão e movimento das células tumorais através dos vasos sanguíneos. Também foi demonstrado que o nível de expressão de  $\alpha_v\beta_3$  se correlaciona bem com o potencial de metástase e agressividade de muitos tumores (MEITAR et al., 1996; ZITZMANN et al., 2002). Enquanto algumas integrinas reconhecem seletivamente uma única glicoproteína ligante na membrana celular (exemplo,  $\alpha_5\beta_1$  reconhece primeiramente a fibronectina), outras podem se ligar a várias glicoproteínas (por exemplo, integrina  $\alpha_v\beta_3$  liga-se a vibronectina, fibronectina, fibrinogênio, colágeno denaturado ou proteolísado e outras proteínas da matriz) (JIN; VARNER, 2004). Uma integrina  $\alpha_v\beta_3$  não ligada, e presumivelmente bloqueada, pode promover apoptose em células endoteliais

vasculares. Stupack e colaboradores (2001) demonstraram que o domínio citoplasmático da subunidade  $\beta_3$  da integrina que se liga e ativa a caspase-8. A integrina  $\alpha_v\beta_3$  também pode ser um alvo para fatores anti-angiogênicos (YI; RUOSLAHTI, 2001).

As integrinas possuem uma porção intracelular curta ligada as quinases, que regula processos de proliferação, diferenciação e migração das células tumorais (GUO, GIANCOTTI, 2004; UHM, GLADSON, RAO, 1999b) e uma porção extracelular mais alongada que possui afinidade pela sequência adesiva arginina-glicina-ácido aspártico (RGD) que é encontrada em várias proteínas da MEC, como por exemplo, a vitronectina, fibrogênio e fibronectina, e é responsável pelas interações destas proteínas com as integrinas. As diferentes subunidades  $\alpha$  e  $\beta$  das integrinas podem interagir com os componentes específicos da MEC como mostra a Tabela 1.

**Tabela 1** - Subunidades de integrinas e seus ligantes.

Ligante	Subunidade $\beta$	Subunidade $\alpha$
Lm, Col	$\beta_1$	$\alpha_1$
Col, Lm, $\alpha_3\beta_1$		$\alpha_2$
Fn, Lm, Col, Epi, Ent, $\alpha_2\beta_1$		$\alpha_3$
Fn (EILDV), VCAM $\alpha_4$		$\alpha_4$
Fn (RGDS)		$\alpha_5$
Lm, Ka, Epi		$\alpha_6$
Lm		$\alpha_7$
Osteopontin		$\alpha_8$
Lm, Tem, VCAM-1		$\alpha_9$
Fn, Vn		$\alpha_v$
ICAM	$\beta_2$ (CD18)	$\alpha_L$ (LFA, CD11a)
IC3b, Fb, FX		$\alpha_M$ (Mac1, CD11b)
IC3b		$\alpha_X$ (p150, 95, CD11c)
Fb, VWF, Fn, Vn, TSP	$\beta_3$ (GPIIIa)	$\alpha_{IIb}$ (GPIIb)

(continua)

**Tabela 1** - Subunidades de integrinas e seus ligantes.

(conclusão)

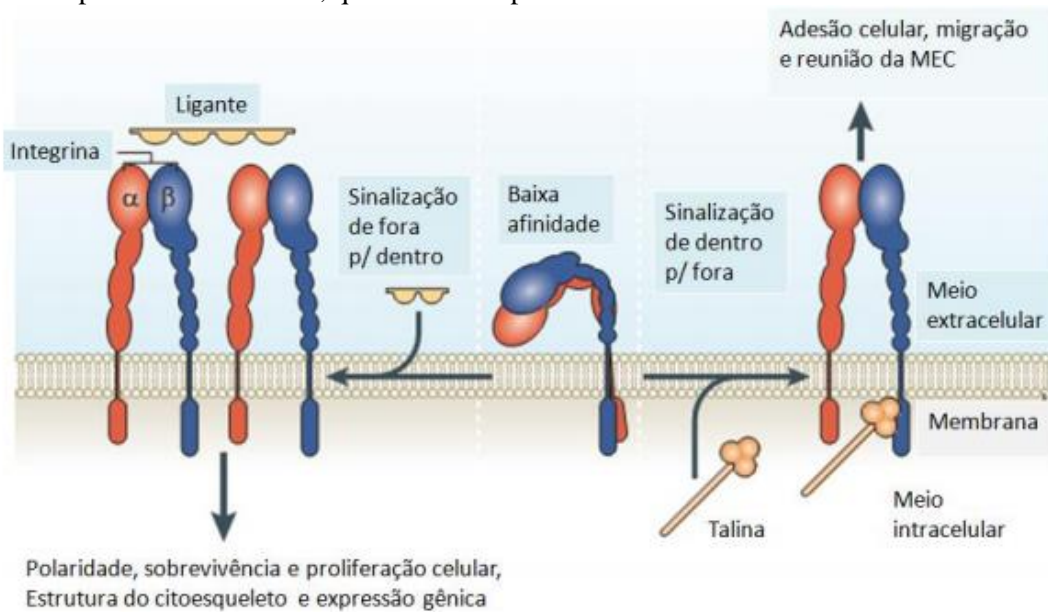
Ligante	Subunidade $\beta$	Subunidade $\alpha$
Fn	$\beta_6$	$\alpha_v$
Fn (EILDV), VCAM	$\beta_7$ (Bp)	$\alpha_4$
Caderina		$\alpha E$
Vn	$\beta_8$	$\alpha_v$
Vn, VWF, Fn, Fg, Ost, TSP, Te		$\alpha_v$ (VNR)
Lm, Ka	$\beta_4$	$\alpha_6$
Vn	$\beta_5$	$\alpha_v$

Abreviações: Lm – Laminina; Col – Colágeno; Vn – Vitronctina; Fb – Fibrinogênio; VWF – Fator Von Willebrand; FX – Fator X; ICAM – Molécula de Adesão Intracelular, células endoteliais; VCAM – Molécula de Adesão Vascular; Ka – Kalanin; Epi – Epigrillin, Ent – Enctatin; Ost – Osteopontin; Te – tenascin; RGDS – Arg-Gly-Asp-Ser; EILDV – Glu-Ile-Leu-Asp-Val; iC3b – sistema complemento.

*Fonte:* Extraída de PETRUZZELLI et al., 1999.

As integrinas funcionam de forma bidirecional, transmitindo sinais tanto de dentro para fora (*inside-out*) quanto de fora para dentro (*outside-in*) das células. Os eventos intracelulares ativam a sinalização *inside-out* por meio de ligações com proteínas intracelulares. Já na sinalização *outside-in*, as integrinas agem como receptores e interagem com seus ligantes extracelulares ativando vias de sinalização intracelulares (Figura 4) (SHATTIL et al., 1998).

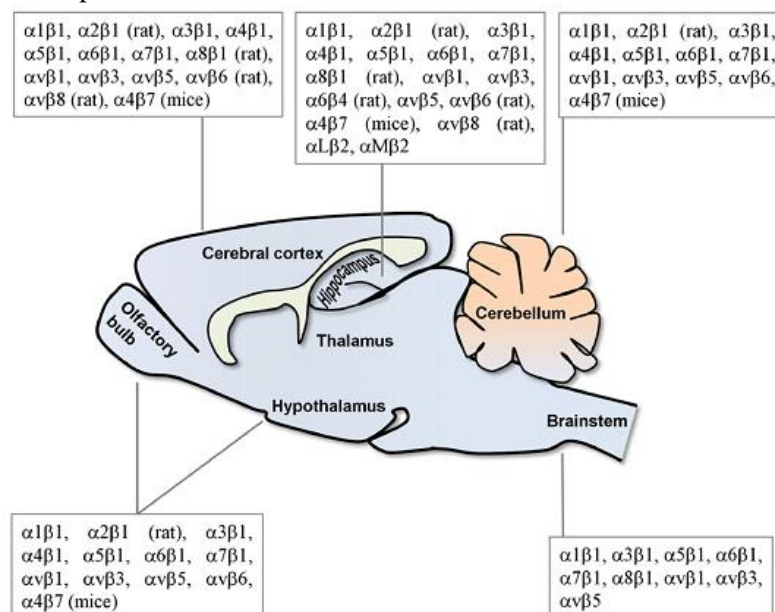
**Figura 4** - Ativação e sinalização bidirecional das integrinas. As integrinas podem ser ativadas tanto de dentro para fora das células, quanto de fora para dentro das células.



Fonte: SHATTIL et al., 1998.

No cérebro adulto, a laminina, a fibronectina e o colágeno IV são os principais componentes das membranas basais associadas a glia, as células do plexo coróide e as células endoteliais vasculares, favorecendo a migração das células tumorais dos GBMs através da interação com os elementos da MEC via ligação com as integrinas (KNOTT et al., 1998; 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. A Figura 5 ilustra o padrão de expressão de integrinas no sistema nervoso central (WU, REDDY, 2012).

**Figura 5** - Integrinas expressas no sistema nervoso central.

Fonte: WU, REDDY, 2012

### 2.3.2. Desintegrinas e câncer

Uma vez que as integrinas desempenham um importante papel durante o processo de crescimento, invasão e angiogênese em GBMs, os inibidores de integrinas tem sido ferramentas terapêuticas bastante promissoras em conjunto com modalidades terapêuticas já estabelecidas, como a radioterapia e quimioterapia. Muitos autores relataram que as integrinas  $\alpha v\beta 3$  são superexpressas nos GBMs e nos vasos quando comparado com tecidos endoteliais normais, sugerindo que estas integrinas podem ser moléculas alvo para a terapia antitumoral (GINGRAS et al., 1995; PAULUS; TONN, 1994; PIJUAN-THOMPSON; GLADSON, 1997).

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), sendo consideradas potentes inibidores da adesão celular, podendo ser utilizadas no combate de diversas patologias como, por exemplo, o câncer (DENNIS; HENZE; PITTI, 1990; GOULD et al., 1990; HUANG, 1998; McLANE et al., 1998; NIEWIAROWISK et al., 1994; SHEU et al., 1995; SOUZA et al., 2000).

As desintegrinas são potentes inibidores da agregação plaquetária, algumas possuem a sequência adesiva RGD (arginina, glicina, ácido aspartático) através da qual se ligam especificamente ao receptor de fibrinogênio e glicoproteína IIb/IIIa encontrada em membrana de plaquetas (integrina  $\alpha_{IIb}\beta_3$ ), o que resulta na inibição da agregação plaquetária dependente de fibrinogênio, além de se ligar a outras integrinas RGD-dependentes como a integrinas  $\alpha_v\beta_3$ ,  $\alpha_v\beta_5$  e  $\alpha_5\beta_1$  presentes nas células dos GBMs (AVRAAMIDES et al., 2008; DESGROSELLIER; CHERESH, 2010; KONSTANTOPOULOS; THOMAS, 2009).

Dentre as diversas classes de proteínas de venenos de serpentes que têm sido estudadas destacam-se as desintegrinas, cujos efeitos biológicos estão relacionados com ligações a receptores celulares e são potentes inibidores de agregação plaquetária e de adesão celular (CALVETE et al., 2005). As desintegrinas de venenos de serpentes apresentam um enorme potencial para estudos básicos de reconhecimento celular em metástases e angiogênese, bem como potencial terapêutico (BEVIGLIA; STEWART; NIEWIAROWSKI, 1995; GENTILUCCI et al., 2010; KONSTANTOPOULOS; THOMAS, 2009).

Trabalhos têm demonstrado resultados interessantes na inibição do desenvolvimento de metástases, sugerindo a utilização dessas moléculas como uma alternativa terapêutica para neoplasias, pois são capazes de se ligar em integrinas superexpressas em células tumorais impedindo a adesão, migração e proliferação celular destas células a matriz extracelular (BEVIGLIA; STEWART; NIEWIAROWSKI, 1995; SHEU et al., 1995; SOUZA et al., 2000).

As desintegrinas de veneno de serpentes são da família das metaloproteases de veneno de serpentes (SVMPS) e são classificadas de acordo com sua estrutura e multidomínio em PI, PII e PIII. Membros da classe P-I são formados somente por um domínio metaloprotease, enquanto as desintegrinas tipo P-II, apresentam uma metaloprotease e um domínio desintegrina. As desintegrinas do tipo P-III originam as desintegrina-like, são formadas por ligação covalente desintegrina-like e domínios ricos em cisteínas (BJARNASON; FOX, 1995; FOX; SERRANO, 2008).

Várias desintegrinas derivadas de SVMPS, do tipo P-II, são capazes de inibir a adesão de células de linhagens tumorais. Durante o processo de invasão e metástase, as células tumorais invadem a membrana basal, sendo um dos eventos adesivos mais importantes na formação da metástase. A adesão ao endotélio vascular expõe a membrana basal endotelial

que possui uma variedade de proteínas adesivas como vitronectina, fibronectina e laminina (TARIN, 1985). A capacidade das desintegrinas de se ligar as integrinas presentes nas células de linhagens tumorais e a inibição da adesão destas células as proteínas presentes na matriz extracelular faz com que muitas desintegrinas sejam capazes de inibir metástases (BEVIGLIA; STEWART; NIEWIAROWSKI, 1995; COMINETTI, 2004; SHEU et al., 1995; SOUZA et al., 2000).

A desintegrina eritostatina foi estudada em um modelo de metástase experimental empregando as células tumorais MV3, que são altamente invasivas. Observou-se que a desintegrina foi capaz de inibir em 87% a formação de metástases pulmonares (DANEN et al., 1998). Outra desintegrina estudada foi a salmosina, que foi capaz de inibir a adesão de células de melanoma B16F10 à fibronectina, vitronectina e colágeno tipo I e IV de maneira dose dependente. O efeito da salmosina na supressão da metástase tumoral está relacionada com a inibição da adesão das células B16F10 às proteínas da matriz extracelular através do bloqueio das integrinas  $\alpha_v\beta_3$  e  $\alpha_v\beta_1$  na superfície destas células (KANG et al., 1999).

Da glândula venenífera de um espécime de *Rhinocerosphis alternatus*, foram extraídos ácidos ribonucléicos mensageiros (mRNAs) e utilizando a tecnologia do DNA recombinante através da fusão His-Tag, foi obtida a desintegrina recombinante DisBa-01, que é derivada de uma metaloproteinase de tipo P-II e possui massa molecular de 11,637 kDa, podendo ser produzida de forma heteróloga em bactérias e posteriormente purificada (KAUSTOT et al., 2008; RAMOS, 2005; RAMOS et al., 2008). A desintegrina-RGD monomérica, DisBa-01, é uma proteína recombinante que interage especificamente com as integrinas  $\alpha_v\beta_3$  e  $\alpha_5\beta_1$ , exibindo potente propriedade antitumoral e antiangiogênica (RAMOS, 2005; RAMOS et al., 2008). Estudos demonstraram que a DisBa-01 inibe a proliferação de células endoteliais de capilares da derme (HMEC-1), inibe também a adesão à vitronectina e reduz as metástases pulmonares em células de melanoma (B16F10). DisBa-01 também inibe a agregação plaquetária induzida por adenosina difosfato (ADP), trombina e fibrinogênio *in vitro*, diminuindo o tempo de oclusão trombótica e sangramento *in vivo* através da interação com a integrina  $\alpha_v\beta_3$  (KAUSKOT et al., 2008; RAMOS et al., 2008). Montenegro e colaboradores (2012) demonstraram que a DisBa-01 adere aos fibroblastos e às células de câncer de mama (MDA-MB-231) e inibe a adesão destas células no colágeno tipo I sob condições de fluxo, simulando o fluxo sanguíneo. Além disso, a DisBa-01 diminuiu fortemente a liberação de

mRNA de VEGF e dos seus receptores (VEGFR1 e VEGFR2) em células endoteliais. Segundo estes autores, os resultados demonstram que a inibição de integrinas por DisBa-01 pode resultar em bloqueio da angiogênese e inibição do tumor.

A salmosina é uma desintegrina contendo a sequência RGD derivadas do veneno de cobra-coreano (*Halis piscivoru brevicaudus*) que se liga a integrina  $\alpha_v\beta_3$ , inibindo fortemente a proliferação celular induzida pelo fator de crescimento de fibroblastos básico (bFGF), a adesão de células à proteínas da MEC e à metástase experimental *in vivo*, em células de melanoma (B16F10) (KANG et al., 1999).

Derivados de desintegrinas, também estão sendo desenvolvidos e estudados para o tratamento de GBMs. O pentapeptídeo cíclico RGD cilengitide (Merck Serono - Alemanha) também conhecido como EMD121974, é um inibidor das integrinas  $\alpha_v\beta_3$  e  $\alpha_v\beta_5$ . Cilengitide foi o primeiro inibidor de integrinas que atingiu a fase III de estudos clínicos devido as suas propriedades antiangiogênicas e anticancerígenos (STUPP et al., 2007). Porém no ano de 2013, a Merck anunciou que Cilengitide falhou na Fase III pois não promoveu um aumento significativo na sobrevida dos pacientes.

Na Tabela 2 temos outros exemplos de desintegrinas de venenos de serpentes que têm sido estudadas e a atividade que exercem sobre as células tumorais.

**Tabela 2** - Tipos de desintegrinas e atividade sobre as células tumorais.

(continua)					
Desintegrina	Motivo adesivo	Integrina ligante	Ligante	Atividade inibitória relevante	Referência
Salmosina 2	RGD	$\alpha_v\beta_3$	Vitronectina	Angiogênese	KANG et al., 1999
Flavoridina	RGD	$\alpha_5\beta_1$	Fibronectina	Melanoma de pulmão (metástase)	OLIVA et al., 2007
Trigramina	RGD	$\alpha_v\beta_3$	Vitronectina	Metástase de osso	YANG et al., 2005

**Tabela 2** - Tipos de desintegrinas e atividade sobre as células tumorais.

Desintegrina	Motivo adesivo	Integrina ligante	Ligante	(conclusão)	
				Atividade inibitória relevante	Referência
Eristostatina	RGD	$\alpha_{IIb}\beta_3$	Fibrinogênio	Melanoma (metástase)	DANEN et al., 1998
DisBa-01	RGD	$\alpha_v\beta_3$	Vitronectina	Melanoma (metástase)	RAMOS et al., 2008
Cilengitide	RGD	$\alpha_v\beta_3, \alpha_v\beta_5$	Vitronectina	Glioblastoma	STUPP et al., 2007
Vicrostatin	RGD	$\alpha_v\beta_3, \alpha_v\beta_5$	Fibronectina	Glioblastoma, Mama, Ovário	MINEA et al., 2012
Triflavina	RGD	$\alpha_v\beta_3$	Vitronectina	Angiogênese	SHEU et al., 1997

Fonte: Adaptado de Selistre-de-Araujo et al., 2010.

Embora até agora nenhum medicamento tenha sido registrado empregando uma molécula nativa purificada a partir de veneno de cobra, vários peptidomiméticos foram concebidos baseando-se na estrutura destas moléculas. A aprovação do FDA para uso de anticoagulantes foi obtida em 1998 e dois fármacos desenvolvidos com base em desintegrinas de veneno de cobra estão disponíveis no mercado como agentes antiplaquetários: Tirofiban (Aggrastat<sup>®</sup>) e eptifibatide (Integrilin<sup>®</sup>) (KOH; KINI, 2012). Além destes dois fármacos no mercado, o Aggrastat<sup>®</sup> (tirofiban) que foi desenvolvido baseando-se na desintegrina equistatina, uma desintegrina de *Echis carinatus*, que se liga-se as integrinas  $\alpha_{IIb}\beta_3$  e  $\alpha_v\beta_3$ . Além disso, é um inibidor da GPIIb-IIIa e promove a adesão das plaquetas e fosforilação da proteína tirosina quinase, e tem sido usado para infarto do miocárdio e isquemia refratária (GAN et al., 1988; PEERLINCK et al., 1993).

O Integrilin<sup>®</sup> (Eptifibatide) tem ligações semelhantes com as desintegrinas de veneno de cobra, e recebeu aprovação da FDA para ser usado em síndromes coronárias agudas (GAN et al., 1988; PEERLINCK et al., 1993).

### 2.3.2.1. Efeitos das desintegrinas sobre as células de GBMs

Wide-Bode e colaboradores (2001) determinaram os marcadores moleculares para migração e invasão em células de GBMs. Os níveis de expressão da integrina  $\alpha_v\beta_3$  em 12 linhagens humanas de GBMs foram avaliadas e correlacionadas com os mecanismos de invasão e migração. Eles descobriram que os níveis de expressão da integrina  $\alpha_v\beta_3$  tem um papel chave na migração e invasão em células de GBMs e sugeriram que esta integrina pode ser um alvo promissor para o tratamento de GBMs.

A maioria das linhas celulares de glioma desprende da placa de cultura celular, mas não morrem quando expostos a inibidores de integrina  $\alpha_v\beta_3$  e  $\alpha_v\beta_5$ , como por exemplo, anticorpos ou o peptídeo RGD cilengitide. Estas observações demonstram uma possível atividade anti-glioma de antagonistas da integrina em ensaios clínicos. No entanto, outros autores relataram que cilengitide conduz ao descolamento de células de glioma na MEC induzindo a apoptose (STUPP et al., 2007). Para a interpretação dos diversos dados sobre a indução de apoptose em diferentes tipos celulares, tem que ser tomado em consideração que a morte mediada por integrina ou a adesão celular mediada por integrina pode não ocorrer da mesma maneira em todas as células. Além disso, a apoptose mediada por integrina deve ser distinguida de *anoikis* mediadas pela integrina, ou seja, morte celular devido ao descolamento das células a partir da matriz extracelular.

Abdollahi e colaboradores (2005) realizaram experimentos *in vivo* com células U87MG de glioma, os experimentos com o peptídeo mimético RGD S247 em combinação com radioterapia fracionada demonstraram que o peptídeo S247 inibe a atividade angiogênica inibindo as integrinas com as subunidades  $\alpha_v$ . O tratamento combinado demonstrou a atividade angiogênica com reduzida densidade dos microvasos e prolongada sobrevivência dos animais.

O tratamento concomitante com cilengitide e radioterapia em modelo ortotópico de gliomas usando células U251 *in vivo* aumentou a apoptose e a sobrevivência dos animais, em comparação com os tratamentos separados. Mikkelsen e colaboradores (2009) demonstraram em experimentos com a célula U251 de gliomas que uma única dose de cilengitide, levou a efeitos sinérgicos quando administrados 4-8 horas antes da radioterapia, mas não quando administrado 2 horas antes ou depois da irradiação. O tratamento combinado com cilengitide e terapia de radiação aumentaram significativamente a taxa de apoptose e células autofágicas.

Em estudos *in vitro*, o tratamento de linhas celulares de glioma com cilengitide induziu ao descolamento das células de maneira dose dependente sem afetar significativamente a proliferação e sobrevivência (MIKKELSEN et al., 2009). O efeito de inibição da integrina antes da radiação pode indicar que cilengitide induz alterações na arquitetura vascular. Skuli e colegas (2009) demonstraram que o aumento na expressão das integrinas  $\alpha_v\beta_3$  e  $\alpha_v\beta_5$  induziram a hipóxia.

Recentemente, a integrina  $\alpha_6\beta_1$  tem ganhado atenção devido a expressão em células de glioma. Esta integrina é importante para a manutenção do glioma porque medeia a interação das células de glioma com a laminina (proteína da MEC), proporcionando um ponto de ancoragem que é um pré-requisito para o seu potencial tumorigênico. Assim, a inibição da integrina  $\alpha_6\beta_1$  pode ser uma abordagem promissora para futuras aplicações terapêuticas (DELAMARRE et al., 2009).

#### **2.4. O papel dos peptídeos cRGDfV, cRGDfK e vicrostatin em GBMs**

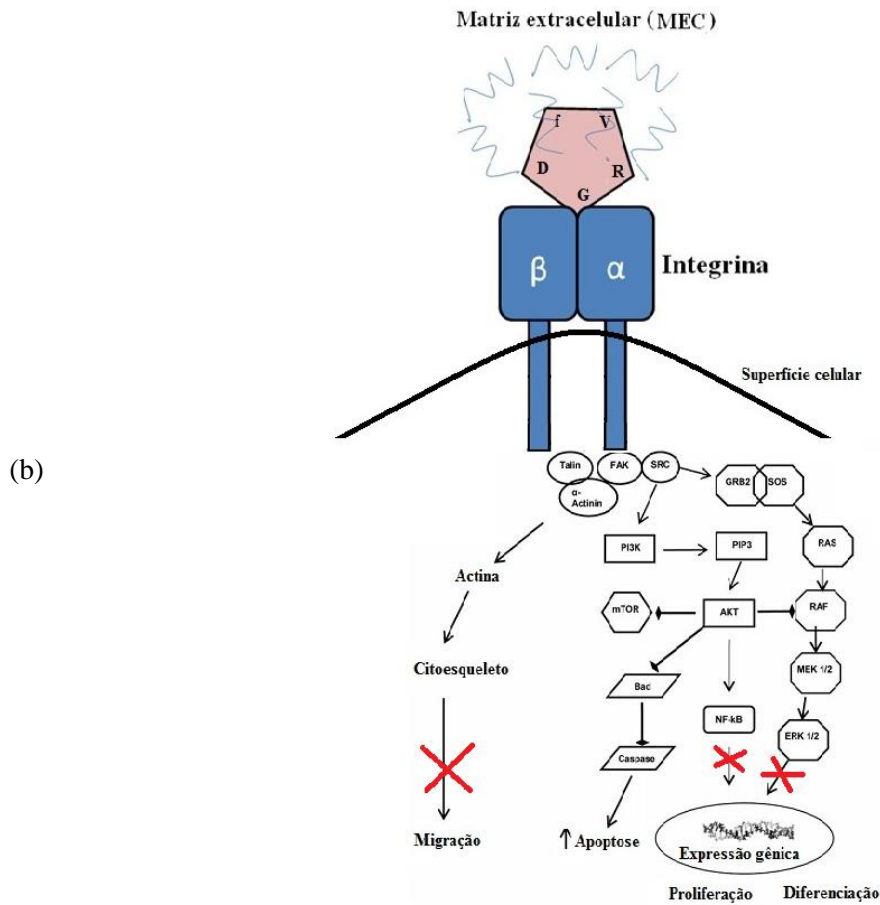
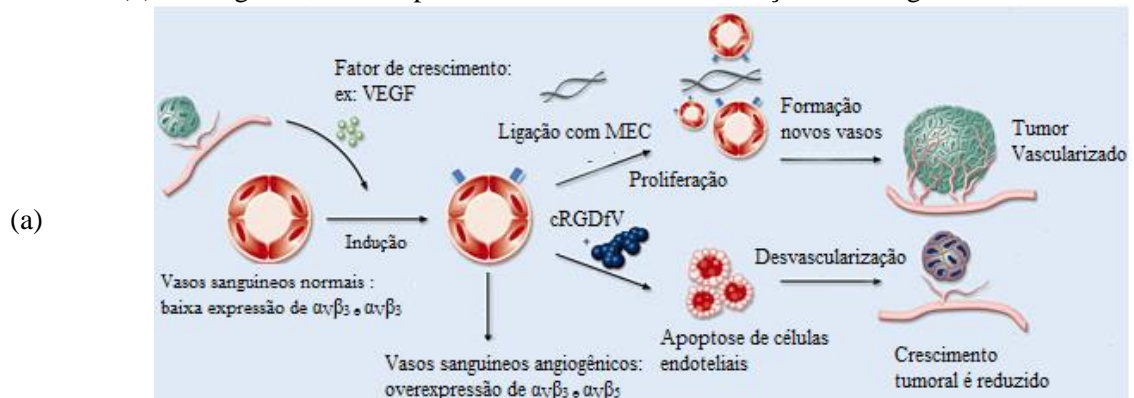
Neste item serão apresentadas os peptídeos utilizadas nesta tese e o seus aspectos estruturais e mecanismo de ação nos GBMs.

##### **2.4.1. cRGDfV**

Vários derivados sintéticos de desintegrinas também estão sendo estudados para combater o câncer, entre eles o pentapeptídeo cíclico RGDfV (arginina, glicina, ácido aspártico, D-fenilalanina, valina). Este peptídeo foi primeiramente sintetizado em 1995 e vêm sendo usado como modelo para o desenvolvimento de outras desintegrinas. O peptídeo cRGDfV é um inibidor das integrinas  $\alpha_v\beta_3$ ,  $\alpha_v\beta_5$  e  $\alpha_5\beta_1$  e está sendo estudado devido as suas propriedades antiangiogênicas e antitumorais contra os GBMs (BROOKS et al., 1994).

Estudos sugerem que o cRGDfV apresenta pelo menos dois mecanismos de ação (Figura 6). O primeiro mecanismo, envolve a inibição da integrina  $\alpha_v\beta_5$  que é um importante componente da resposta mediada por VEGF (fator de crescimento endotelial vascular), um dos principais fatores de crescimento relacionado ao processo de angiogênese (STUPP et al., 2007). O segundo mecanismo está relacionado com a expressão da integrina  $\alpha_v\beta_3$ , que pode levar a apoptose das células tumorais (NABORS, MIKKELSEN, ROSENFELD, 2007; REARDON, FINK, MIKKELSEN, 2008; REARDON et al., 2008; STUPP et al., 2007).

**Figura 6** - Esquema de inibição de integrinas pelo cRGDfV em células endoteliais (a) e células tumorais (b). Na Figura b, estão representadas as vias de sinalização das integrinas.

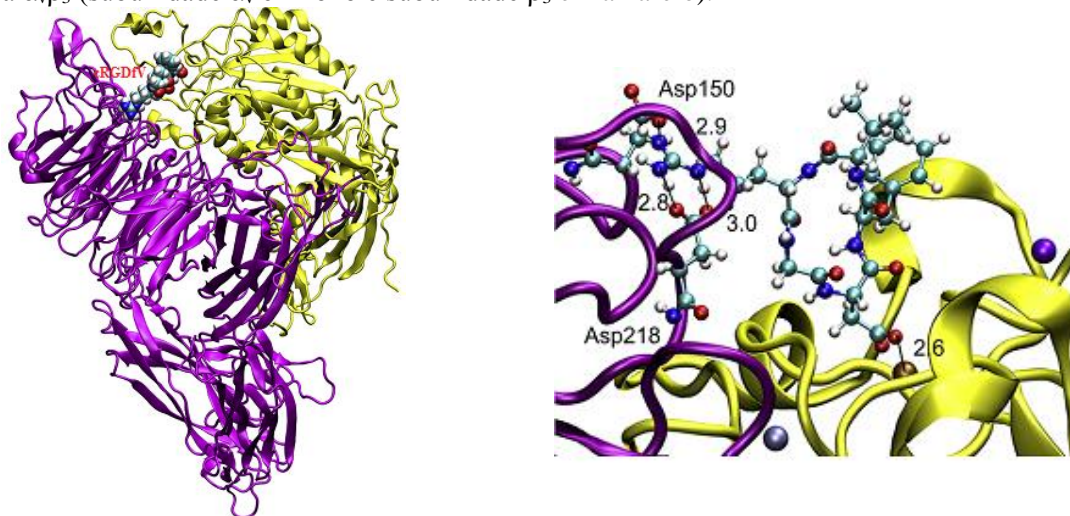


Fonte: Adaptado de GIANCOTTI; RUOSLAHTI, 1999.

A análise da estrutural do complexo entre o fragmento extracelular da integrina  $\alpha v \beta 3$  e o pentapeptídeo cRGDfV mostrou que o peptídeo se insere entre as duas subunidades  $\alpha$  e  $\beta$  da integrina, ficando os resíduos de arginina e ácido aspártico em lados opostos

(MARINELLI et al., 2003; XIONG et al., 2002). A Figura 7 mostra as principais interações entre a integrina  $\alpha_v\beta_3$  e o peptídeo cíclico, sendo possível verificar que tanto os oxigênios da cadeia lateral do ácido aspártico como o hidrogênio da ligação amida entre a glicina e o ácido aspártico estabelecem interações importantes com a integrina. O mesmo acontece com o grupo guanidínio da arginina. O resíduo de glicina encontra-se entre as subunidades  $\alpha$  e  $\beta$  e estabelece interações hidrofóbicas. O resíduo de fenilalanina estabelece interações hidrofóbicas com um resíduo de tirosina da integrina. A valina parece não estabelecer interações com a integrina, o que apoia a hipótese de este ser um bom resíduo para inserir alterações funcionais no pentapeptídeo. A ciclização de peptídeos confere rigidez à estrutura e também podem melhorar a especificidade com a integrina  $\alpha_v\beta_3$ , além de proteger contra a clivagem proteolítica *in vivo*. A adição de aminoácidos na posição D é um outro meio de prolongar a meia-vida e de proteger contra a hidrólise.

**Figura 7** - Representação esquemática das principais interações entre o peptídeo cRGDfV e a integrina  $\alpha_v\beta_3$  (subunidade  $\alpha_v$  em roxo e subunidade  $\beta_3$  em amarelo).



Fonte: YU et al, 2014.

Chatterjee e colaboradores (2000) realizaram experimentos *in vitro* e *in vivo* usando o peptídeo cRGDfV sobre diferentes células de gliomas. Os resultados *in vitro* mostraram que cRGDfV se liga a integrina  $\alpha_v\beta_3$  induzindo a apoptose das células de glioma e resultados *in vivo* mostraram um aumento da sobrevivência em camundongos imunocompetentes.

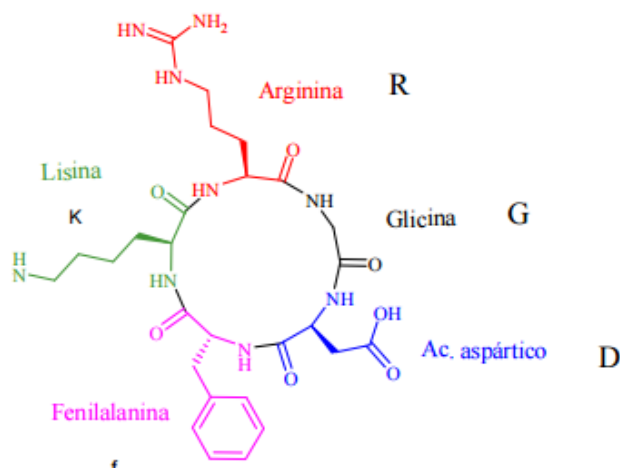
### 2.4.2. cRGDfK

O pentapeptídeo cíclico cRGDfK (arginina, glicina, ácido aspártico, D-fenilalanina, lisina) (Figura 8) foi sintetizado por Haubner e colaboradores (1996), têm a massa molecular de 603.7 Da e apresenta alta ligação específica com a integrina  $\alpha_v\beta_3$ .

Este peptídeo é um análogo do Cilengitide e foi desenvolvido para ser empregado no diagnóstico e terapia do câncer. Devido a presença do aminoácido lisina, a função  $\epsilon$ -amino da lisina pode ser adicionalmente funcionalizadas e transformar o ciclo (-RGDfK-) em um *building block* e biofuncionalização com outras moléculas e nanopartículas (HAUBNER et al., 1996a).

Atualmente o cRGDfK tem sido amplamente utilizado para o revestimento de biomateriais para aumentar a adesão de células ou como agente de imagem para a terapia de tumores.

**Figura 8** - Estrutura química do cRGDfK.



Fonte: HAUBNER et al., 1996.

O mecanismo de ação do cRGDfK está relacionado com a inibição da integrina  $\alpha_v\beta_3$  e  $\alpha_v\beta_5$  que têm um papel importante nos estágios iniciais da angiogênese pois elas medeiam o contato das células endoteliais ativadas com os componentes da MEC durante a angiogênese. Estas integrinas são expressas em baixas quantidades em células endoteliais e em células epiteliais, no entanto, em células endoteliais ativadas presentes nos novos vasos dos GBMs esta integrina está altamente expressa. A inibição da integrina  $\alpha_v\beta_3$  resulta em uma significativa redução da densidade de vasos e retardamento do crescimento tumoral.

### 2.4.3. Vicrostatin

A desintegrina vicrostatin foi desenvolvida no laboratório do Professor Francis Markland na University of Southern da Califórnia onde foi realizado meu doutorado sanduíche. Este grupo tem uma longa história no estudo de proteínas isoladas de venenos de cobra. No início de 1980, o grupo do Dr. Markland estava trabalhando no isolamento e caracterização de enzimas fibrinolíticas de veneno de serpente e, em 1988, foi isolada e caracterizada uma proteína fibrolase que atua no funcionamento direto da fibrina (RETZIOS; MARKLAND, 1988). Mais tarde, uma versão modificada da fibrolase foi criada pela empresa Amgen e, mais tarde ainda passou para a Fase I e II em ensaios clínicos, no entanto, não conseguiu passar os ensaios de Fase III.

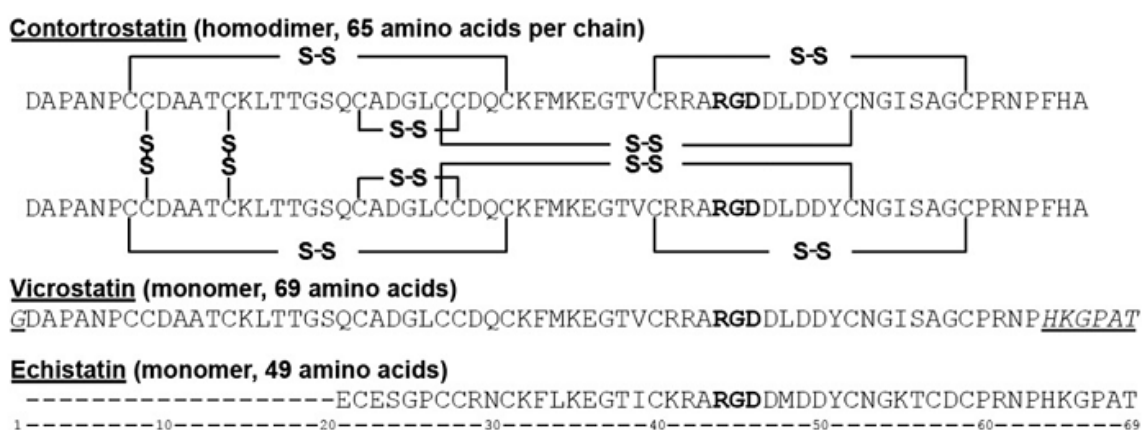
No entanto, Dr. Markland e seu grupo continuaram explorando venenos de serpentes como potenciais moléculas para serem usadas na terapêutica. Em 1994, foi identificado e purificado do veneno da *Agkistrodon contortrix*, uma desintegrina chamada Contortrostatina (CN) que atuava na interação com integrinas de células cancerosas e promoveu a inibição de metástases. CN é um homodímero com um peso molecular de 13500 Da e apresenta um motivo RGD (TRIKHA, ROTE, 1994). CN se liga as subunidades de integrinas  $\beta_1$ ,  $\beta_3$  e  $\beta_5$ , e em experimentos *in vitro* foi capaz de inibir em até 90% o processo de invasão e formação do tubo e migração, que são passos cruciais da angiogênese e migração. Em experimentos *in vivo*, esta desintegrina reduziu a taxa de crescimento tumoral em modelos de câncer de mama e metástase de tumor pulmonar.

Para solucionar problemas relacionados com a imunogenicidade, a encapsulação de CN em lipossomas manteve a sua atividade biológica, ao mesmo tempo em que não promoveu ativação da resposta imunológica, além de ter sido verificado que houve uma melhoria significativa na meia-vida de CN (SWENSON; COSTA, 2004). Apesar de todos os resultados promissores, o problema com CN foi a sua disponibilidade, quantidades limitadas que estavam presentes no veneno de cobra tornando difícil seu uso como agente terapêutico.

Foi então que no ano 2000 o Dr. Radu Minea, colaborador do Dr. Markland, desenhou e construiu uma nova desintegrina recombinante que foi denominada Vicrostatin (VCN). A sequência de aminoácido da VCN foi baseada na CN, no entanto ambas as moléculas eram diferentes em termos da sua estrutura e tamanho.

O VCN é uma desintegrina recombinante quimérico gerado no origami B (DE3) de *Escherichia coli* como uma fusão genética entre a cauda C-terminal da desintegrina equistatina e da CN (Figura 9).

**Figura 9** - Alinhamento de seqüências de contortrostatin (CN), vicrostatin (VCN) e equistatina. VCN é uma seqüência modificada de CN que foi gerado de forma recombinante por trocar a cauda C-terminal de CN com a cauda da equistatina. Nas seqüências abaixo, o motivo RGD é representada em negrito ao passo que os aminoácidos de ambas desintegrinas estão em itálico e sublinhado.



Fonte: MINEA et al., 2010.

VCN é uma molécula monomérica e não um homodímero como no caso de CN, e sua massa molecular é de 7146 Da. VCN pode ser produzida em grandes quantidades (rendimentos superiores a 200 mg de purificados de desintegrina ativa por litro de cultura bacteriana) em Origami B (DE3), uma estirpe de expressão de *E. coli* projetados para suportar o dobramento de proteínas heterólogas ricas em bandas de dissulfeto (MINEA et al., 2010).

VCN é capaz de se ligar as integrinas  $\alpha_v\beta_3$ ,  $\alpha_v\beta_5$  e  $\alpha_5\beta_1$  que são superexpressas em GBMs, e atua tanto em células endoteliais como em células tumorais através de um mecanismo distinto de outras integrinas. VCN perturba profundamente o citoesqueleto de actina das células endoteliais (CE) induzindo a uma desorganização rápida das fibras e reorganização da actina, interferindo na capacidade das CE de invadir e formar tubos (tubulogênese) (MINEA et al., 2010).

As vantagens de VCN como terapia e diagnóstico em GBMs é que VCN tem capacidade de interromper o aparelho locomotor da célula (citoesqueleto de actina) e inibe

dramaticamente a invasão das células tumorais de GBMs e endoteliais angiogênicas. Além disso, VCN é capaz de orientar as integrinas expressas na superfície luminal do endotélio dos GBMs, sendo uma vantagem para administração endovenosa, intratumoral e possivelmente intranasal.

VCN vem sendo estudada para terapia com imagem em diversos tipos de tumores, como por exemplo, tumores de ovário, mama e GBMs. VCN foi radiomarcado e tem sido usado para braquiterapia em GBMs e no diagnóstico por imagem em tumores de mama usando micro tomógrafo por emissão de pósitrons (micro PET) (JANIB et al., 2012).

## **2.5. Nanopartículas para liberação de biomoléculas e via nasal como estratégia para aumentar o direcionamento para as integrinas nos GBMs**

O uso de desintegrinas que interagem especificamente com integrinas expressas em tumores é uma estratégia interessante para o desenvolvimento de terapia antiangiogênica e antimetastática e como ferramenta para auxiliar no diagnóstico de GBMs. Porém, um dos grandes desafios para o uso de proteínas terapêuticas é a degradação enzimática nos fluidos biológicos, baixa permeabilidade através das biomembranas, como barreira hematoencefálica (BHE). Para contornar os problemas relacionados com a estabilidade das proteínas em fluidos fisiológicos e a consequente perda de atividade, pesquisadores começaram a explorar vias alternativas de administração e diferentes sistemas de liberação para fármacos proteicos, tais como lipossomas, cristais líquidos, microemulsões e nanopartículas. Os sistemas de liberação nanoestruturados representam uma estratégia interessante para administração de fármacos proteicos, pois podem protegê-los contra degradação e possibilitar liberação no local específico de ação com uma taxa de liberação controlada (KANG; CHO; YOO, 2009).

As nanopartículas são sistemas carreadores que apresentam diâmetro inferior a 1000 nm e podem ser divididas em nanocápsulas e nanoesferas, as quais diferem entre si segundo a composição e organização estrutural. As nanocápsulas são constituídas por uma membrana polimérico disposto ao redor de um núcleo oleoso, podendo o fármaco estar dissolvido neste núcleo e/ou adsorvido à parede polimérica (SCHAFFAZICK et al., 2003). Por outro lado, as nanoesferas, são formadas por uma matriz polimérica, em que o fármaco encontra-se disperso em seu interior e desta forma obtém-se um sistema monolítico, em que não é possível identificar um núcleo diferenciado (SCHAFFAZICK et al., 2003), como é o caso das

nanopartículas de quitosana preparadas pela técnica de gelificação ionotrópica com tripolifosfato de sódio (TPP) (AMIDI et al., 2006; BARBI et al., 2015; CHEN; ZHANG; HUANG, 2007; DYER et al., 2002; GUIMARÃES, 2005; KIILL, 2012; LAUS et al., 2006; SADEGHI et al., 2008; SCHAFFAZICK et al., 2003).

Kim e colaboradores (2008) desenvolveram nanopartículas de quitosana para encapsulação de um peptídeo RGD para terapia do câncer. Os estudos *in vitro* demonstraram que a liberação do peptídeo encapsulado nas nanopartículas foi prolongada, além de inibir a adesão de células endoteliais (HUVEC), indicando um efeito antiangiogênico. *In vivo*, foi verificada uma diminuição significativa no crescimento do tumor quando comparado ao peptídeo não encapsulado em nanopartículas. Han e colaboradores (2010) também desenvolveram nanopartículas de quitosana e encapsularam outro peptídeo RGD que inibe as integrinas  $\alpha_v\beta_3$ . Nos estudos *in vivo* utilizando ratos como modelo de carcinoma ovariano observou-se uma diminuição significativa no crescimento do tumor quando comparado ao grupo controle.

As nanopartículas podem ser administradas por diferentes vias, tais como a parenteral, oral, oftálmica e nasal (ILLUM, 1998; QUAN et al., 2008; SCHAFFAZICK et al., 2003; SADEGHI et al., 2008). 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 susceptíveis à degradação ácida e enzimática ou que sofrem metabolismo pré-sistêmico (GAVINI et al., 2008).

A mucosa nasal apresenta grandes vantagens na absorção sistêmica de proteínas, pois 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 tanto na cavidade nasal quanto no transporte e permeação através da barreira hematoencefálica (BHE), fazendo com que seja absorvida diretamente na circulação sistêmica sem sofrer metabolização pré-sistêmica, atingindo rapidamente níveis plasmáticos terapêuticos (ILLUM, 2003; MAINARDES et al., 2006).

O mecanismo de transporte de fármacos incorporado em nanopartículas através da mucosa nasal para permear através da BHE não está inteiramente elucidado até o momento. O mecanismo mais aceito é a endocitose das nanopartículas de quitosana pelas células

endoteliais dos capilares do cérebro, que compõem maior interface entre o cérebro e o sangue. A superfície catiônica da quitosana (QS) pode promover a abertura das junções 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 envolvem interação eletrostática entre cargas positivas da quitosana e cargas negativas da superfície endotelial facilitando a passagem de moléculas proteicas pela BHE (HERVÉ; GHINEA; SCHERMANN, 2008).

Outro mecanismo envolvido no transporte de fármacos administrados por via nasal atingirem o SNC é por meio das vias nervosas olfativas que se localizam na porção superior da cavidade nasal, na região olfatória. Devido ao ambiente único do epitélio olfativo, é possível que fármacos administrados por via nasal atinjam o SNC através de mecanismos de transporte ao longo dos nervos olfativos (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 em que 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 fármaco. Por outro lado, 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, alguns fatores limitam a absorção nasal de fármacos. Essas barreiras incluem os mecanismos de depuração mucociliar, o qual remove rapidamente a formulação da cavidade nasal, além da degradação enzimática que pode acontecer tanto no lúmen da cavidade nasal como na passagem através da barreira epitelial (MAINARDES et al., 2010). Uma estratégia utilizada para retardar a remoção da formulação pela depuração mucociliar é a utilização de sistemas mucoadesivos, que aumentam o contato entre a formulação e o local de absorção na cavidade nasal (ILLUM et al., 2003).

Moléculas catiônicas como a QS 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 a 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).

## 2.6. Delineamento racional de nanopartículas poliméricas para aplicação terapêutica em GBMs

Algumas propriedades das nanopartículas são importantes para sua interação com as membranas biológicas e receptores celulares. Assim, neste tópico abordaremos os aspectos centrais para o delineamento racional de nanopartículas a base de polímeros e uma discussão sobre o impacto do tamanho, forma e composição de nanopartículas e seu alvo pretendido.

O tamanho, as propriedades de superfície e forma de uma nanopartícula tem um papel chave no desempenho da partícula. O acúmulo de nanopartículas nos tumores devido ao efeito de retenção e permeabilidade aumentada (EPR) foi relatado pela primeira vez na década de 1980 e somente em 1995, descobriu-se que as nanopartículas eram capazes de atravessar a BHE (JIANG et al., 2008; LOPEZ et al., 2013).

Na Tabela 3 estão apresentadas as principais características das nanopartículas que podem impactar no seu direcionamento para o tumor.

**Tabela 3** - Características das nanopartículas e o impacto sobre seu direcionamento nos tumores.

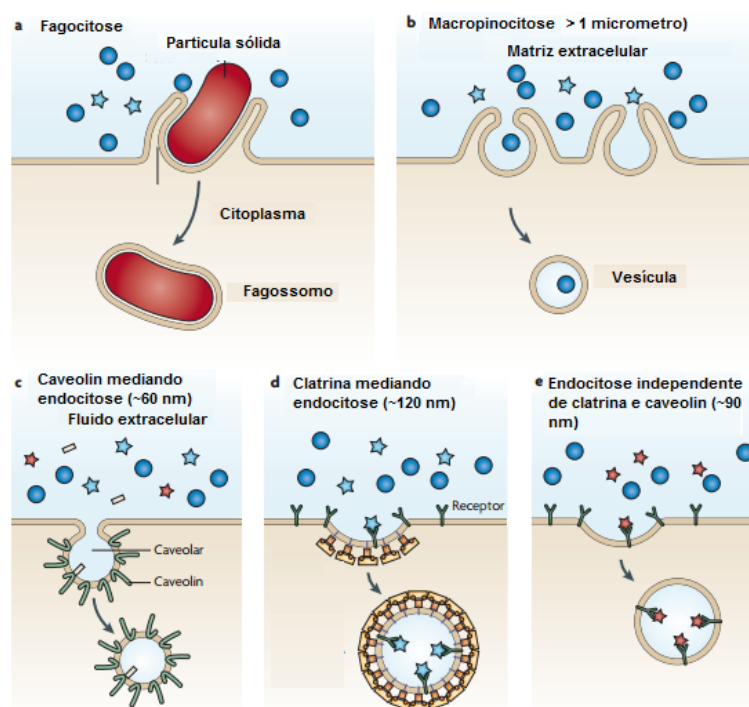
	<b>Hidrofilico</b>	<b>Anfifílico</b>	<b>Hidrofóbico</b>
<b>Hidrofobicidade</b>	Aumento da meia vida	Aumento da permeação através da BHE	Rápida eliminação pelo sistema reticuloendotelial
	<b>Catiônica</b>	<b>Aniônica</b>	<b>Não-iônica</b>
<b>Carga superficial</b>	Transcitose pela BHE	Redução da internalização <i>in vivo</i> pelos GBMs	A carga reduzida pode facilitar a partícula atingir o tumor

Fonte: Adaptado de AIKATERINI; LEITE; PILKINGTON, 2015.

O efeito do tamanho tem sido extensivamente estudado com partículas de forma esférica e algumas tendências gerais têm sido notadas (ALEXIS et al., 2008; CHAMPION; KATARE; MITRAGOTRI, 2007; OWEENS; PEPPAS, 2006). Nanopartículas com tamanhos entre 50-250 nm são capazes de acumular nos tumores através do efeito de retenção e permeabilidade aumentada (EPR). Estas nanopartículas possuem um tempo de circulação longo em comparação com as partículas menores (10-20 nm) que são rapidamente filtradas através dos rins. Nanopartículas com tamanhos maiores (> 150 nm) são captados pelo sistema fagocitário (OWEENS; PEPPAS, 2006).

O tamanho das partículas também tem influência nos mecanismos de internalização celular, como a fagocitose, macropinocitose, endocitose mediada por caveolina ou endocitose mediada por clatrina (Figura 10). O conhecimento detalhado da via de internalização da partícula na célula é uma importante informação e pode ser usada para o delineamento das nanopartículas de forma mais racional, ou seja, manipulando as características das nanopartículas é possível o direcionamento para microambientes intracelulares de forma mais específica (ZHANG, ZHANG, WU, 2008).

**Figura 10** - Mecanismos de internalização das nanopartículas e respectivas limitações relacionadas ao tamanho.



Fonte: Adaptado de PETROS; DESIMONE, 2010.

A presença de carga superficial nas nanopartículas pode alterar o perfil de opsonização da partícula, o reconhecimento pelas células do sistema fagocitário e o perfil de circulação plasmática das nanopartículas.

Nanopartículas com cargas superficiais negativas podem aumentar ou diminuir ou mesmo não ter impacto algum sobre a depuração sanguínea, enquanto que nanopartículas com carga superficial positiva são mais facilmente reconhecidas pelos macrófagos. Entretanto, alguns estudos tem demonstrado que nanopartículas com carga superficial positiva podem favorecer a interação com vasos sanguíneos das células tumorais, além de um aumento na permanência destas partículas no ambiente tumoral devido as interações supramoleculares, evitando sua redistribuição pela circulação sistêmica (AINA, 2007; DRUMMOND et al., 1999; MILOWSKY, 2007). Esta estratégia tem sido usada para fins terapêuticos, utilizando fármacos e macromoléculas antiangiogênicas visando atingir o endotélio dos vasos do tumor. Outros estudos demonstram que as nanopartículas carregadas positivamente também tem a capacidade de permear a BHE através do transporte paracelular por meio da abertura das junções apertadas das células.

Algumas estratégias podem ser empregadas para aumentar o direcionamento das nanopartículas para o tumor. A primeira estratégia que pode ser utilizada é a incorporação de macromoléculas nas nanopartículas de forma supramolecular (interação eletrostática, iônica), onde o peptídeo/proteína está fisicamente retido ou absorvido nas nanopartículas, e o direcionamento para o tumor será com o auxílio do efeito EPR. Também existem métodos de modificações covalentes onde as macromoléculas estarão fortemente ligadas à superfície das nanopartículas e o principal mecanismo de direcionamento para o ambiente tumoral será através de ligação com receptores, como por exemplo, via integrinas.

### **2.6.1. Nanopartículas poliméricas e mecanismo de internalização pelas células tumorais**

Uma propriedade interessante das nanopartículas é a sua capacidade natural de se acumular no tumor. Os vasos sanguíneos saudáveis são compostos de células endoteliais que estão unidas por junções contínuas e, portanto, impedem que partículas grandes atravessem a membrana. Entretanto, os vasos do tecido tumoral apresentam fenestrações que favorecem a passagem das partículas. Este processo de segmentação passiva ocorre por causa das várias

anomalias anatômicas que ocorrem em vasos tumorais, apresentando aumento da permeabilidade da vasculatura e drenagem deficiente do sistema linfático, denominado este efeito de permeabilidade e retenção aumentada (EPR) (MATSUMURA; MAEDA, 1988).

Uma consideração importante para o desenvolvimento de nanopartículas que deverão se acumular no tumor por meio do efeito EPR é o tamanho da partícula. Partículas entre 50-250 nm de diâmetro se acumulam rapidamente nos tumores por meio do efeito EPR (ALEXIS et al., 2008; DREHER et al., 2006).

Para que se possamos utilizar como estratégia o efeito EPR, as nanopartículas devem permanecer em circulação o tempo necessário para que se proporcione o seu acúmulo no tumor. Contudo, como as nanopartículas estão sujeitas a sofrerem captação pelo sistema fagocitário, uma estratégia para aumentar a captação das nanopartículas pelo tumor é a utilização de polietilenoglicol (PEG) e seus derivados. O PEG tem sido muito utilizado como revestimento, pois contribui para prolongar o tempo de meia-vida das nanopartículas (TOBIO et al., 1998).

A modificação da superfície com o PEG pode promover uma diminuição da opsonização das nanopartículas, resultando no impedimento estérico causado pelas cadeias hidrófilas (KATAOKA et al., 2003). Além da capacidade de escape da opsonização e posterior fagocitose, as nanopartículas estericamente estabilizadas têm sido usadas como estratégia para a liberação de fármacos no cérebro e aumento da captação pelos tumores devido ao aumento da meia-vida (KREUTER, 2001).

O principal mecanismo por trás do direcionamento ativo é o reconhecimento do ligante pelo seu receptor alvo. Vários ligantes têm sido acoplados de forma covalente à superfície das nanopartículas, entre eles anticorpos, proteínas, peptídeos, desintegrinas, ácidos nucleicos, açúcares, e moléculas pequenas, tais como vitaminas (ACCARDO et al., 2011; DANIELS et al., 2012; HOLLAND et al., 2012; KORKUSUZ et al., 2011; LIM et al., 2014; STUPP et al., 2007).

O direcionamento ativo das nanopartículas empregadas na terapia do câncer apresenta como vantagem proporcionar a administração de macromoléculas terapêuticas de forma específica para o tumor, que pode reduzir ou eliminar efeitos potencialmente tóxicos do fármaco sobre o tecido saudável (HALEY; FRENKEL, 2008).

A funcionalização de nanopartículas com biomoléculas apresenta alguns obstáculos que podem ter impactos significativos sobre a eficácia terapêutica, uma vez que essas substâncias podem alterar a carga de superfície, tamanho e a polaridade das nanopartículas. Outro grande desafio é a manutenção da estabilidade das nanopartículas durante o processo de conjugação com as biomoléculas. Portanto, a escolha de uma estratégia de acoplamento depende da estabilidade da nanopartícula, dos grupos funcionais, das condições de bioconjugação (pH, temperatura, força iônica, escolha do solvente). Com relação a biomolécula é importante controlar sua orientação para assegurar que a biomolécula permaneça ativa após a conjugação com a nanopartícula.

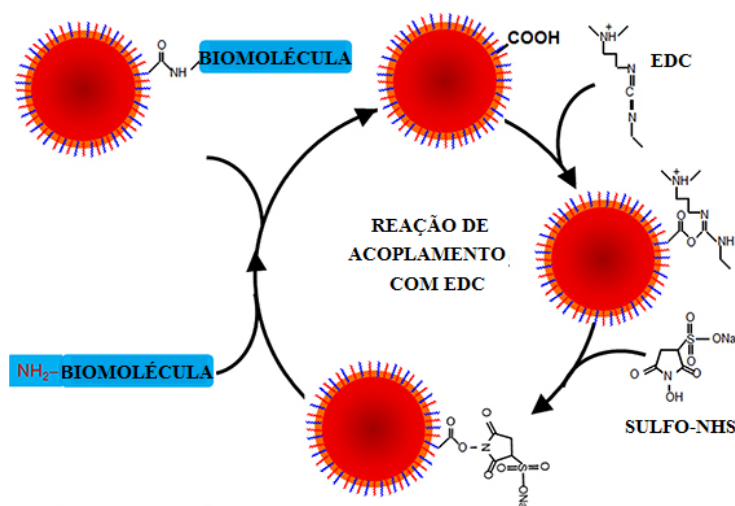
As nanopartículas funcionalizadas covalentemente com PEG e conjugadas com desintegrinas em sua superfície são de interesse terapêutico e diagnóstico. A peguilação neste caso é empregada como espaçadores de PEGs heterobifuncionais, ou seja, eles são inseridos na superfície das nanopartículas através de ligação covalente, que aumentará a distância entre a superfície da nanopartícula e a desintegrina, melhorando a afinidade da desintegrina com a integrina  $\alpha_v\beta_3$  (WANG et al., 2008).

O acoplamento das desintegrinas de forma covalente fornece a estabilidade de ligação da biomolécula com as nanopartículas. A maioria das proteínas e peptídeos têm grupos amina na sua superfície, e podem, assim, ser conjugados com as nanopartículas que contêm grupos reativos, tais como aminas, aldeídos, epóxidos, anidridos (KONG, SHAONING, 2010; PETROS, 2010). A bioconjugação através de ligação covalente com PEG requer maior esforço que a peguilação de forma supramolecular, mas pode resultar em conjugados com melhor especificidade e que se mantem ativos por mais tempo.

Existem algumas estratégias para a conjugação das desintegrinas na superfície das nanopartículas por meio desses espaçadores de PEG. Os espaçadores bifuncionais ou heterobifuncionais de PEG são usados para conjugar as desintegrinas e outros ligantes através de reações químicas. A formação de uma ligação covalente entre a desintegrina e a superfície da nanopartícula é geralmente feita por reações com grupos carboxílicos, por exemplo, usando uma N-hidrosuccinamida (NHS) e cloridrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodimina (EDC), que reage por ataque nucleofílico com grupos amina do ligante ou da nanopartícula.

A reação de acoplamento com EDC, que é um agente de ligação cruzada usado para nanopartículas com aminas primárias, ocorre com o grupo carboxílico da biomolécula, formando uma amina reativa *O*-acilissouréia intermediária. A adição de sulfo-NHS estabiliza a reação intermediária, convertendo em um éster de sulfo-NHS amino-reativo que também reage com uma amina em uma segunda biomolécula, produzindo um conjugado das duas biomoléculas ligadas por uma ligação amida estável (Figura 11) (GRABAREK; GERGELY, 1990).

**Figura 11** - Reações de acoplamento entre biomoléculas (ex. desintegrinas) e as nanopartículas peguiladas usando EDC e NHS.



Fonte: CONDE et al., 2014.

Uma das principais vantagens do acoplamento usando EDC é a sua solubilidade em água, o que permite a bioconjugação de forma direta sem prévia dissolução em solvente orgânico. Além disso, os subprodutos formados podem ser facilmente removidos por diálise ou filtração. Para aumentar a estabilidade do EDC, N-hidroxissuccinimida (NHS) ou N-hidroxissulfoxuccinimida (sulfo-NHS) pode ser usado (JANG; KENG, 2008). Os parâmetros que devem ser controlados quando se utiliza EDC são pH (devido reação de hidrólise), a quantidade de EDC para não favorecer a agregação das nanopartículas, devido alteração de carga das partículas, e a proporção de EDC/NHS (NAKAJIMA; IKADA, 1995; SAM et al., 2009; SHEN et al., 2009).

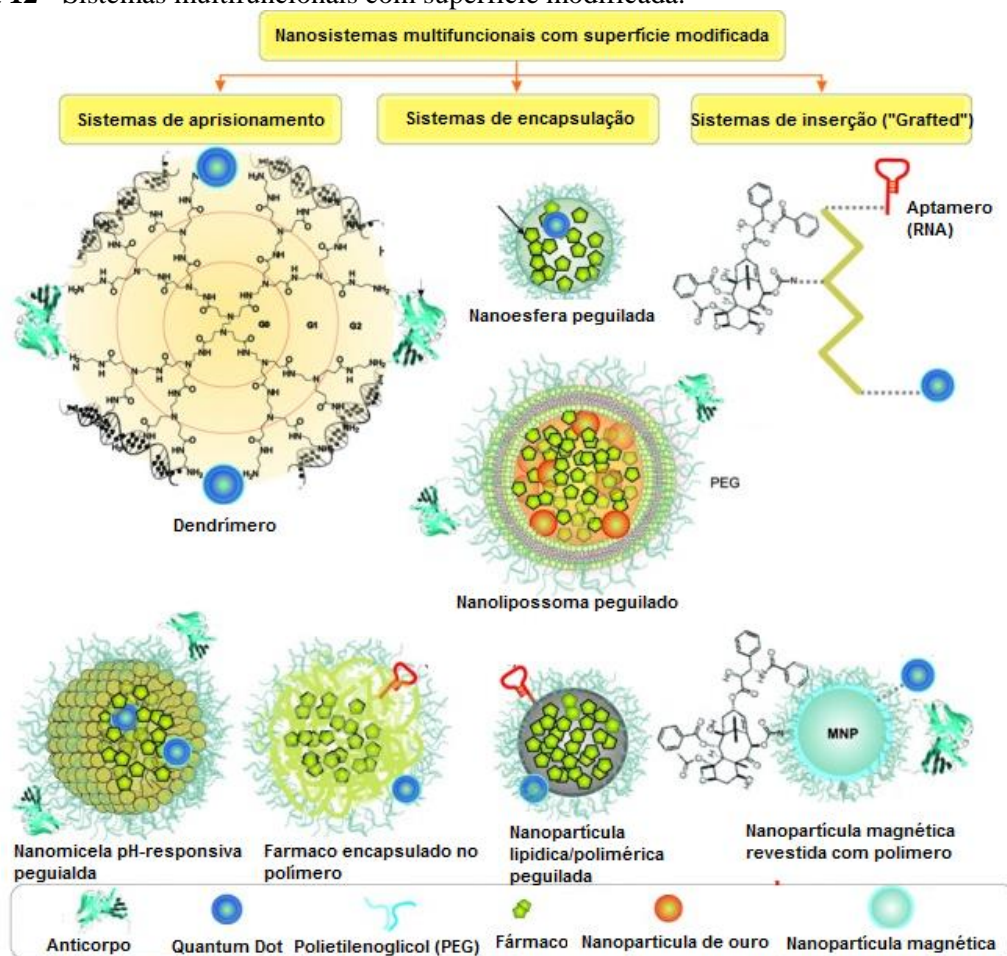
Outra estratégia de acoplamento é o uso de grupos maleimida que podem reagir com grupamentos amino presentes nas nanopartículas e com grupos sulfidril das desintegrinas, para formar uma ligação estável.

O pentapeptídeo cíclico RGDyK conjugado com poli-caprolactona e polietilenoglicol (PCL-PEG) em micelas foi usado para melhorar o efeito e eficácia do paclitaxel contra glioblastoma (ZHAN et al., 2009). Este mesmo pentapeptídeo foi acoplado em nanopartículas de quitosana com reações com Mal-PEG e facilitou o direcionamento e a liberação de genes em modelos de glioblastoma *in vivo* (empregada por ZHAN et al., 2012).

## **2.7. Sistemas multifuncionais teranósticos como estratégia para terapia e diagnóstico por imagem em GBMs**

Recentes avanços em nanociência e nanotecnologia têm expandido nossa habilidade para desenvolver nanoestruturas multifuncionais que combinem especificidade e funções terapêuticas e de diagnóstico em um único complexo nanoestruturado. Estes materiais, chamados de "teranósticos", são interessantes para diversas aplicações, principalmente no diagnóstico precoce e tratamento do câncer. A versatilidade destas estruturas baseadas em nanomateriais (Figura 12) advém da possibilidade de incorporação de vários tipos de moléculas na superfície de uma única nanopartícula, a qual pode desempenhar múltiplas funções.

Figura 12 - Sistemas multifuncionais com superfície modificada.



Fonte: Adaptado de BARAR; OMIDI, 2014.

Considerado o impacto da nanotecnologia na terapêutica e devido a sua capacidade de selecionarem o alvo terapêutico de forma ativa, ou de forma passiva, estes sistemas têm apresentado um grande potencial para serem utilizados no âmbito da imagiologia. Diversas técnicas têm sido atualmente empregadas, tais como a imagem por ressonância magnética (RMI), a tomografia computadorizada (CT), a tomografia por emissão de pósitrons (PET), a tomografia por emissão de fóton único (SPECT) e a ultrassonografia (US), as quais visam a obtenção de imagens do corpo humano para fins clínicos ou científicos, através de um conjunto de processos, normalmente não invasivos (CLEMENTE-CASARES; SANTAMARIA, 2014; COHEN; SHOUSHAN, 2013; MURA; COUVREUR, 2012).

A combinação entre as nanoplataformas disponíveis e os diversos agentes de contraste utilizados em imagiologia, dos quais se destacam os agentes de contraste fluorescentes

próximo ao infravermelho (NIR), as nanopartículas de óxido de ferro superparamagnético (SPIONs) e os íons metálicos paramagnéticos, como o gadolínio, tem promovido o desenvolvimento de plataformas plurivalentes que podem contribuir significativamente, tanto para a detecção, como para o diagnóstico de diversas patologias (MURA; COUVREUR, 2012).

A aplicação de ressonância magnética (RMI) para a visualização das estruturas internas em humanos foi descrita pela primeira vez em 1977 e recebeu a aprovação do FDA para uso clínico em 1985. Tornou-se uma técnica versátil no campo dos diagnósticos e da pesquisa biomédica por ser uma técnica de imagem tridimensional e não-invasiva, que tem desempenhado um papel central em oncologia clínica. Por isso, oferece várias vantagens sobre outras modalidades clínicas, incluindo alta resolução espacial, não utilização de radiação ionizante, alto contraste anatômico, excelente capacidade de diferenciar tecidos moles, além da não invasividade (BARRET et al., 2006).

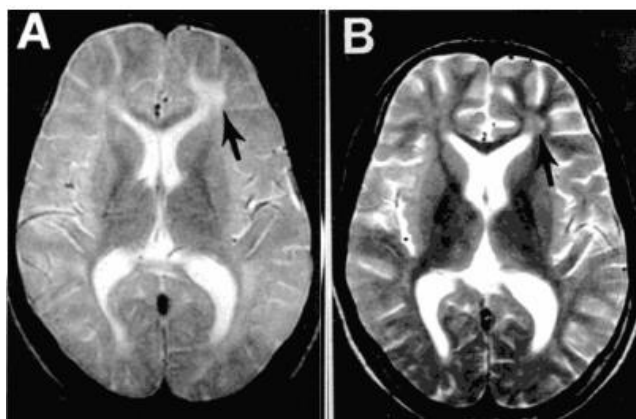
A base para o sinal de RMI está na relação entre os núcleos de hidrogênio da água e a aplicação de um campo magnético. Após a aplicação de impulsos de radiofrequência, o processo de relaxamento por meio do qual os núcleos voltam ao estado alinhado original é explorado para produção de imagem. Durante este processo, regiões hiperintensas (brancas) e regiões hipointensas (pretas) aparecem devido às diferenças entre as densidades de prótons nos tecidos biológicos em imagens de ressonância magnética (HAGE; IWASAKI, 2009). No entanto, resta a questão do insuficiente contraste entre os tecidos saudáveis e doentes devido a diferenças relativamente pequenas em termos estruturais, o que resulta em uma baixa sensibilidade do RMI para identificar algumas anormalidades. O principal desafio é o desenvolvimento de novos agentes de contraste para serem utilizados em RMI que melhorem a sensibilidade e resolução *in vivo* (CLEMENTE-CASARES; SANTAMARIA, 2014; COHEN; SHOUSHAN, 2013; MURA; COUVREUR, 2012).

Os atuais agentes de contraste utilizados em RMI exigem grandes quantidades a serem administradas, e a imagem é limitada aos locais onde eles podem se acumular e em concentrações mais elevadas. Vários agentes de contraste são usados atualmente para aumentar a sensibilidade e para proporcionar alta resolução de contraste de tecidos moles empregando a RMI. A especificidade e a sensibilidade da RMI podem ser ainda melhoradas pela utilização de agentes de contraste à base de metais paramagnéticos, tais como gadolínio

(Gd), e seu uso em pesquisa e na prática clínica tem aumentado (BARRET et al., 2006; CARAVAN et al., 2006).

Atualmente os agentes de contraste disponíveis para o uso em RMI podem ser divididos em dois grupos: os agentes T1 e agentes T2. Geralmente, os agentes T1 promovem um aumento da velocidade de rotação da estrutura-relaxamento ( $1/T1$ ) de prótons de hidrogênio no tecido. Este efeito redutor de T1 aumenta a intensidade do sinal e uma melhora das imagens. Os agentes T1 têm muito pouco impacto sobre o relaxamento *spin-spin*. Devido ao aumento da intensidade do sinal destes agentes T1, eles são chamados de agentes de contraste positivos. Por outro lado, os agentes T2 influenciam largamente a taxa de relaxação *spin-spin* ( $1/T2$ ), através da diminuição de T2. Isto resulta na redução da intensidade do sinal. Assim, estes agentes representam agentes de contraste negativos (Figura 13) (JUNG et al., 1998).

**Figura 13** - Imagens de RMI do cérebro. A) agente de contraste tipo T1; B) agente de contraste tipo T2.



Fonte: JUNG et al., 1998.

Devido ao seu comportamento magnético, os agentes de contraste usado em RMI podem ser descritos como agentes superparamagnéticos e paramagnéticos. Os agentes de contraste superparamagnéticos são cristais de óxido de ferro insolúveis em água, geralmente com base em magnetita ( $Fe_3O_4$ ) ou maguemita ( $\gamma-Fe_2O_3$ ). Cada cristal de óxido de ferro é constituído por milhares de íons paramagnéticos de Fe ( $Fe^{2+}$  e  $Fe^{3+}$ ). Os agentes de contraste de óxido de ferro são muitas vezes revestidos com materiais macromoleculares, incluindo dextrano, quitosana, amido, poliestireno, albumina, entre outros, e pertencem a uma classe de

nanopartículas superparamagnéticas de óxido de ferro (SPIONs). Abaixo de 50 nm eles são chamados de nanopartículas de óxido de ferro ultra pequenas (USPIONs) (JUNG et al., 1998; KROFT et al., 1998).

O mecanismo de relaxação destes agentes de contraste está relacionado com a susceptibilidade de induzir o relaxamento, ou seja, as moléculas de água se difundem através de campo magnético ao redor das partículas e os prótons são relaxados por um mecanismo que acontece na parte externa da esfera. O termo esfera externa significa que ocorre interações entre os íons paramagnéticos e as moléculas de água estreitamente difusas, enquanto que a esfera interior descreve o relaxamento de prótons das moléculas de água diretamente ligadas ao agente de contraste. Como consequência, o T2 é encurtado e a intensidade de sinal nas imagens em T2 diminui. Em adição ao seu efeito sobre T2, estes agentes também induzem um relaxamento mais rápido em T1 (BARSKY, PUTZ, 1992).

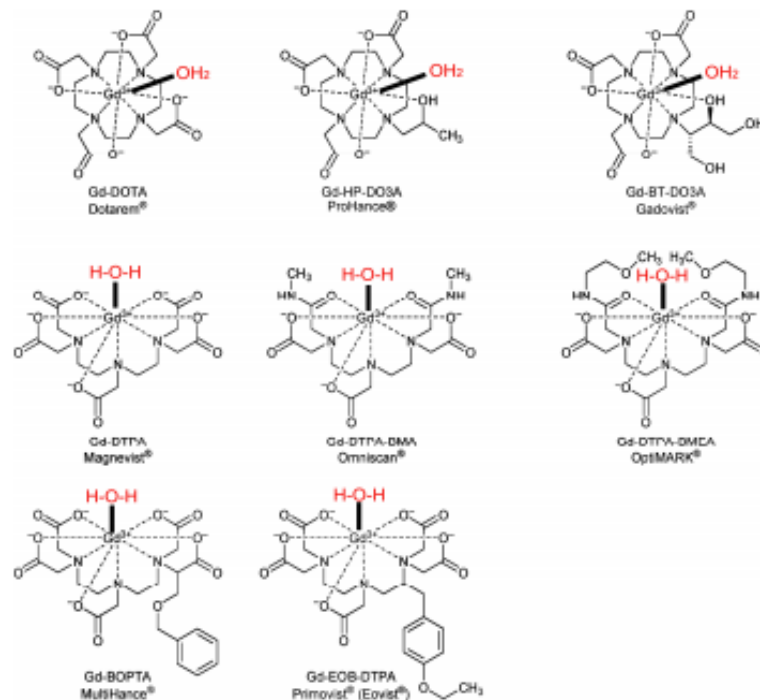
A outra classe de agentes de contraste são os agentes de contraste paramagnéticos que são baseados em íons metálicos com elétrons desemparelhados como é o caso do gadolínio ( $Gd^{3+}$ ), manganês ( $Mn^{2+}$ ,  $Mn^{3+}$ ), ferro ( $Fe^{2+}$ ,  $Fe^{3+}$ ), lantanídeos ( $La^{3+}$ ) e disprósio ( $DY^{3+}$ ). Todos eles já têm sido utilizados em RMI (HIROHASHI et al., 1998; RUNGE et al., 1996; SCHMITT-WILLICH et al., 1999; SHUTER et al., 1998).

Os agentes de contraste paramagnéticos mais importantes consistem em complexos com o íon gadolínio ( $Gd^{3+}$ ). No entanto, os íons de metais pesados livres como  $Gd^{3+}$  são tóxicos e não pode ser aplicado na sua forma iônica. Portanto, para ser usado na clínica, ele deve ser ligado em um complexo para garantir uma elevada estabilidade e resistência a transmetalção. Os íons metálicos endógenos como o  $Zn^{2+}$  e  $Ca^{2+}$  são concorrentes e, assim, o quelante tem que exibir uma maior seletividade para o  $Gd^{3+}$  para que não ocorra a complexação com o  $Zn^{2+}$  e  $Ca^{2+}$ . Para cumprir esses requisitos dois tipos de quelantes tem sido associados ao Gd, o ácido linear dietilenotriaminopentacético (DTPA) e o macrocíclico 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-N,N',N'',N'''-tetraacético (DOTA) (MURA; COUVREUR, 2012).

Os agentes de contraste de baixo peso molecular baseado em Gd, são o Gd-DTPA (Magnevist<sup>®</sup>), Gd-DTPA-BMA (Omniscan<sup>®</sup>), Gd-DTPA-BMEA (Optimark<sup>®</sup>), Gd-BOPTA (MultiHance<sup>®</sup>), Gd-EOB-DTPA (Primovist<sup>®</sup>) e o Gd-DOTA cíclico (Dotarem<sup>®</sup>),

Gd-HP-DO3A (ProHance<sup>®</sup>) e Gd-DO3A-BT (Gadovist<sup>®</sup>) são clinicamente aprovados e atualmente em uso (Figura 14).

**Figura 14** - Agentes de contraste de baixo peso molecular utilizados na clínica.



Fonte: GAYNOR; GRIFFITH, 2012.

Uma abordagem alternativa para melhorar a terapia e diagnóstico de tumores do cérebro é a utilização de macromoléculas como agentes de direcionamento para o ambiente tumoral. Uma das estratégias mais utilizadas para conseguir o direcionamento eficiente para o tumor, é a conjugação de ligantes específicos que reconhecem e se ligam aos seus receptores na superfície do tumor. Esses ligantes incluem anticorpos monoclonais (DINAUER et al., 2005), peptídeos (ACCARDO et al., 2011; DANIELS et al., 2012), transferrina (DANIELS et al., 2012; HOLLAND et al., 2012), aptâmeros (LIM et al., 2014) e desintegrinas (KIM et al., 2008; STUPP et al., 2007).

Estudos recentes sobre a biologia molecular dos tumores de cérebro já identificaram várias moléculas que podem ser usadas como alvo por serem altamente expressas no ambiente tumoral e pouco expressas em células normais. Entre os vários tipos de alvos que têm sido estudados, as integrinas se destacam. Como já foi discutido anteriormente, as

integrinas desempenham um papel vital na angiogênese; muitas integrinas são conhecidas por se ligarem na sequência adesiva arginina-glicina-ácido aspartático (RGD) presente em vários componentes da matriz extracelular (MEC), tais como fibronectina, vitronectina, colágeno e fibrinogênio. Ademais, as desintegrinas podem ser usadas como inibidores de integrinas pois apresentam alta afinidade por estas moléculas que estão na superfície das células tumorais, inibindo e bloqueando a sua função (KESSLER et al., 1995; KOH et al, 2012).

O uso de desintegrinas acopladas à superfície das nanopartículas contendo o agente de contraste poderá aumentar o acúmulo deste nos tumores e, conseqüentemente, aumentar o contraste entre o tumor e o tecido normal, contribuindo, assim, para um aumento da sensibilidade do diagnóstico por RMI, tornando possível o diagnóstico de tumores em um estágio precoce. Portanto, as desintegrinas podem e têm sido usadas como uma alternativa para melhorar a eficiência em diagnóstico por RMI em tumores de cérebro.

### 3. OBJETIVO GERAL

O objetivo deste trabalho foi o desenvolvimento de nanopartículas baseadas em quitosana contendo inibidores de integrinas encapsuladas e acoplada na superfície das nanopartículas. O planejamento fatorial foi empregado como estratégia para um planejamento racional de nanopartículas que tem como alvo as integrinas superexpressas em GBMs. O objetivo principal foi avaliar o efeito das nanopartículas contendo desintegrinas encapsuladas e acoplada na superfície em estudos de citotoxicidade e captação em células de GBMs, a fim de promover uma diminuição da inibição da adesão, proliferação e metástase nos GBMs. Foi avaliada também partículas de um derivado da quitosana acoplada com uma desintegrina vicrostatin e encapsuladas com agente de contraste, no desenvolvimento de sistemas teranósticos para aplicação concomitante em terapia e em diagnóstico por imagem.

#### Objetivos específicos:

1. Desenvolvimento e caracterização de nanopartículas de quitosana vazias utilizando o planejamento fatorial como estratégia racional para o desenvolvimento das nanopartículas;
2. Desenvolvimento de nanopartículas de quitosana sem e com modificação supramolecular com PEG e encapsulação dos inibidores de integrinas cRGDfV e cRGDfK;
3. Desenvolvimento e caracterização de nanopartículas de quitosana peguiladas de forma covalente e funcionalizadas com cRGDfK na superfície;
4. Estudos comparativos *in vitro* do efeito das desintegrinas encapsuladas ou acopladas em nanopartículas. Foram avaliadas a citotoxicidade, internalização e ligação dos inibidores de integrinas em nanopartículas com as integrinas por citometria de fluxo e microscopia confocal em células U87 de GBMs;
5. Desenvolvimento e caracterização de nanopartículas teranósticas de carboximetilquitosana encapsuladas com Gd-DTPA e modificadas com a desintegrina vicrostatin;
6. Avaliação *in vitro* da captação em células U87 e U251 de GBMs por citometria de fluxo e microscopia confocal.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1. MATERIAIS

#### 4.1.1. Substâncias e Reagentes

- Anticorpo monoclonal anti-humano (rato)  $\alpha_v\beta_3$  (MAB1976), (Milipore, CA, EUA);
- Anticorpo monoclonal anti-humano (rato)  $\alpha_v\beta_5$  (MAB1961), (Milipore, CA, EUA);
- Carboximetilquitosana (Peso molecular: 100 kDa; Grau de desacetilação: 90%) (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, EUA);
- Cianina-5 Éster-N-hidroxilsuccinimida (Cy5-NHS) (Lumiprobe, FL, EUA);
- ABC Elite<sup>®</sup> (avidina-peroxidase), (Vector Laboratories, CA, EUA);
- AEC Peroxidase (3-amino-9-etilcarbazol) (Vector Laboratories, CA, EUA);
- Filtro Amicon Ultra-15 (100 kDa) (Thomas Scientific, Swedesboro, NJ, EUA);
- Gadolínio-DTPA (ácido dietilenotriamina penta-acético) (Sigma Aldrich);
- Inibidor de integrina  $\alpha_5\beta_1$  (Arginina-Glicina-Ácido Aspartático-D-fenilalanina-Valina) sintetizada pela MocellBiotech, China;
- Inibidor de integrina  $\alpha_5\beta_1$  (Arginina-Glicina-Ácido Aspartático-D-fenilalanina-Lisina) sintetizada pela NovoPro Bioscience Inc., China;
- Isotiocianato de Fluoresceína-N-hidroxilsuccinimida (FITC-NHS) (Pierce Biotechnology, Rockford, IL, EUA);
- Meio de cultura Dulbecco's modificado (Alta glicose) (Sigma-Aldrich);
- Mucina de suínos, tipo II (Sigma-Aldrich);
- Maleimida Poliethilenoglicol Ester N-hidroxilsuccinimida (Mal-PEG-NHS-MW 2000 Da and 5000 Da) (Jenkem Technology, Plano, TX, USA);
- Methoxil Poliethilenoglicol Ester Succinimidil Carbonato (mPEG-NHS – MW 2000) (Nanocs Inc., New York, NY, EUA);
- Methoxil Poliethilenoglicol Ester Succinimidil Carbonato (mPEG-NHS – MW 5000) (Jenkem Technology, Plano, TX, EUA);
- Meglumina (Sigma Aldrich, Saint Louis, IL, EUA);
- N-hidroxilsuccinimida (NHS) (Pierce Biotechnology, Rockford, IL, EUA);

- N-succinimidyl-s-acetylthio-acetate (SATA), (Pierce Biotechnology, Rockford, IL, EUA);
- Quitosana de baixa massa molecular (Sigma Aldrich);
- Tripolifosfato de Sódio (LabSynth);
- Polifosfato de sódio (Merck);
- Polietilenoglicol 6000 Da (Sigma Aldrich);
- Soro fetal bovino (Thermo Fisher, SP, Brasil);
- Rodamina hidroxilsuccinimida (Rodamina-NHS) (Pierce Biotechnology, Rockford, IL, EUA);
- Tripsina 0,25% (Thermo Fisher, SP, Brasil);
- Vicrostatin gentilmente cedido pelo Professor Radu Minea do laboratório de Biologia Molecular da University of Southern California.

#### 4.1.2. Células

- Células C6 de glioma de *Rattus norvegicus* (ATCC n° CCL-107<sup>TM</sup>);
- Células U251 de glioblastoma, astrocitoma humano (resistente e sensível a temozolamida) (Sigma-Aldrich);
- Células U-87MG de glioblastoma, astrocitoma humano grau IV (resistente e sensível a temozolamida) (ATCC n° HTB-14<sup>TM</sup>);
- Células T98G de glioblastoma humano (ATCC n° CRL-1690<sup>TM</sup>);
- Células LN18 glioblastoma humano grau IV (ATCC n° CRL-2610<sup>TM</sup>);
- Células LN229 glioblastoma humano (ATCC n° CRL-2611<sup>TM</sup>).

#### 4.1.3. Equipamentos e Acessórios

- Agitador mecânico (Marconi);
- Agitador magnético (Fisatom);
- Analisador de partículas *Light Scattering* – Brookhaven Instruments Corporation, modelo EMI 9863 - Fonte de Laser He-Ne 10 mW, 514 e 532 nm;
- Analisador de partículas Zetasizer Nano series Nano-ZS, Malvern Instruments acoplado a um MPT – Multi Purpose Titrator (metodologia de análise - MIE);

- Calorímetro exploratório diferencial DSC 1 – Metler Toledo;
- Centrífuga (Beckman Coulter), modelo Avanti Centrifuge J25;
- Citômetro de Fluxo (BD SORP FACS Aria I);
- Citômetro de Fluxo (FACS Canto);
- Difrátômetro de Raios X, modelo D5000 (Siemens®);
- Espectrofotômetro de arranjo de diodo UV-Vis (Hewlett Packard®-mod. 8453);
- Espectrofotômetro por transformada de Fourier (FT-IV Prestige-21);
- Espectrômetro/Espectropolarimento de Dicroísmo Circular (Jasco J-815)
- Equipamento de ressonância magnética nuclear Fourier 300 MHz;
- Liofilizador (Edwards), modelo Modulyo;
- Microscópio Confocal (Zeiss LSM 510);
- Microscópio de Varredura (Jeol JSM 7500 F);
- Microscópio de Varredura acoplado com EDS (espectroscopia de energia dispersiva) (JEOL JSM-7001F, Tokyo, Japan);
- pH metro Digital (Gehaka- PG 1800).

## 4.2. MÉTODOS

### 4.2.1. Desenvolvimento das nanopartículas de quitosana

#### 4.2.1.1. Preparação das soluções de quitosana

A solução de QS foi preparada na concentração de  $2 \text{ mg.mL}^{-1}$  em solução de ácido acético glacial a 0,1 M e 0,2 M, mantida sob agitação mecânica por 24 horas a temperatura ambiente ( $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Após a completa solubilização da QS, o pH foi ajustado para 4,4 e 4,8 com solução de hidróxido de sódio 0,1 M (CALVO et al., 1997; CHEN; ZHANG; HUANG, 2007).

#### 4.2.1.2. Preparação da solução de TPP, polifosfato de sódio e polietilenoglicol

As soluções de TPP, polifosfato de sódio e polietilenoglicol foram preparadas com água purificada, nas concentrações de  $1 \text{ mg.mL}^{-1}$ ,  $1 \text{ mg.mL}^{-1}$  e  $2 \text{ mg.mL}^{-1}$ , respectivamente.

As soluções foram mantidas por 30 min sob agitação magnética a temperatura ambiente (25 °C) para total solubilização do TPP e polifosfato e polietilenoglicol (CALVO et al., 1997; CHEN; ZHANG; HUANG, 2007).

#### 4.2.1.3. Desenvolvimento das nanopartículas de quitosana vazias empregando planejamento fatorial

As nanopartículas foram preparadas pela técnica de geleificação ionotrópica através da adição das soluções de TPP e/ou polifosfato de sódio em solução de quitosana, de acordo com metodologia descrita por Calvo et al. (1997).

A influência de variáveis como o pH, concentração de poliânions e molaridade da solução de ácido acético foram avaliadas usando como parâmetros 3 variáveis independentes com dois níveis (-1 e +1), totalizando 8 experimentos ( $2^3$ ). As variáveis independentes avaliadas estão apresentadas na tabela 4. Foram avaliados o pH (4,4 e 4,8), concentração final de polifosfato e/ou tripolifosfato (0,34 e 0,40 mg.mL<sup>-1</sup>) e a molaridade do ácido acético (0,1 e 0,2 M). Estas variáveis podem influenciar na formação das nanopartículas de quitosana.

As variáveis dependentes avaliadas foram o diâmetro médio das nanopartículas, o índice de polidispersão e o potencial zeta (Tabela 4). Estas variáveis dependentes e independentes foram escolhidas de acordo com estudos de pré-formulação e pesquisa na literatura com o objetivo de otimizar o desenvolvimento das nanopartículas. A influência das variáveis independentes no desenvolvimento das nanopartículas foi analisada utilizando o software STATISTICA 10.0 (StafSoft, Inc.).

**Tabela 4** - Níveis e parâmetros avaliados no planejamento fatorial.

Variáveis independentes	Nível -1	Nível +1	Variáveis dependentes
pH	4,4	4,8	Diâmetro médio,
TPP ou polifosfato (m/V)	0,34	0,40	Índice de polidispersão,
[Ácido acético] (M)	0,1	0,2	Potencial zeta

#### **4.2.1.4. Preparação de nanopartículas modificadas por interações supramoleculares com PEG**

As nanopartículas de quitosana modificadas com PEG foram preparadas pela técnica de geleificação ionotrópica como descrito no item 4.2.1.3. A solução de PEG foi preparada na concentração de 2 mg.mL<sup>-1</sup> e adicionada nas soluções de TPP ou polifosfato de sódio e gotejadas sobre a solução de QS.

#### **4.2.1.5. Incorporação dos peptídeos cRGDfV e cRGDfK nas nanopartículas de QS e QS modificadas com PEG**

As nanopartículas de quitosana que atendem aos parâmetros desejáveis como diâmetro médio de até 250 nm, potencial zeta entre +20-40 mV e índice de polidispersão de até 0,4. Para desenvolvimento das nanopartículas com cRGDfV e cRGDfK, os inibidores de integrinas na concentração de 2,5 mg foram solubilizados na solução de TPP e/ou polifosfato e/ou TPP e/ou polifosfato com PEG e gotejadas sobre a dispersão de QS.

#### **4.2.1.6. Desenvolvimento das nanopartículas de QS funcionalizadas com o peptídeo cRGDfK na superfície**

A nanopartícula de QS escolhida no planejamento fatorial reagiu por 2 horas em temperatura ambiente com um excesso de 20/1 razão molar de maleimida-poli(etileno-glicol)-N-hidroxisuccinimida (Mal-PEG2000-NHS) em relação a QS, foi utilizado para peguilação e inserção de grupamentos maleimida nas nanopartículas formando nanopartículas de QS-Maleimida-PEG- N-hidroxisuccinimida. Em seguida, para o revestimento da superfície das nanopartículas, adicionou-se metoxil PEG-NHS (mPEG2000-NHS) reagindo por mais 2 horas em temperatura ambiente. Os compostos que não reagiram (mPEG2000-NHS e Mal-PEG2000-NHS), foram removidos por centrifugação utilizando um filtro Amicon Ultra-15 (peso molecular de corte de 100 kDa).

O segundo passo foi acoplar cRGDfK às nanopartículas de CS-Mal-PEG-NHS. Primeiramente, grupos sulfidril foram introduzidas na molécula de cRGDfK por reação com SATA (N-succinimidil-S-acetiltio-acetato de etilo). Um excesso molar de 20 vezes de cRGDfK modificado com SATA foi adicionada a solução de nanopartículas já peguiladas e

as reações ocorreram *overnight* para permitir que as lisinas do inibidor de integrina reagisse com os grupos maleimida do PEG (ZHAN et al., 2009; ZHAN et al., 2012).

Após a funcionalização com cRGDFK, as nanopartículas foram marcadas com um excesso molar de Fluoresceína-NHS e Rodamina-NHS (Éster N-hidroxilsuccinimida), esta reacção foi mantida durante a noite à temperatura ambiente e protegida da luz. Fluoresceína e Rodamina-NHS que não reagiram, foram removidas por centrifugação utilizando um filtro Amicon Ultra-15 (peso molecular de corte é de 100 kDa).

As nanopartículas controle (sem o inibidor de integrina), foram preparadas de forma semelhante por reacção com mPEG-NHS (mPEG2000-NHS), seguida de marcação com fluoresceína e rodamina-NHS e posterior filtração com Amicon Ultra-15 (peso molecular cut-off = 100 kDa).

As nanopartículas formadas estão listadas na Tabela 5.

**Tabela 5** - Nanopartículas de quitosana peguiladas não funcionalizadas e funcionalizadas com cRGDFK.

Tipo de nanopartículas	cRGDFK (mg)	Mal-PEG-NHS	mPEG-NHS
Funcionalizadas	2,5	2k (30% de 20/1 razão molar)	2k (70% de 20/1 razão molar)
Não-Funcionalizadas (controle)	—	—	2k (100% de 20/1 razão molar)

#### 4.2.2. Desenvolvimento de nanopartículas de carboximetilquitosana encapsuladas com gadolínio-DTPA e funcionalizadas com a desintegrina vicrostatin

As nanopartículas de carboximetilquitosana (CMQS) encapsuladas com gadolínio-DTPA (Gd-DTPA) reagiram por 2 horas em temperatura ambiente com um excesso molar de 20 vezes de maleimida-poli (etileno-glicol)-N-hidroxisuccinimida (Mal-PEG2000-NHS e/ou Mal-PEG5000-NHS) para peguilação e inserção de grupamentos maleimida nas nanopartículas formando nanopartículas de CMQS-Gd-DTPA-Mal-PEG-NHS. Em seguida, para o revestimento de toda a superfície das nanopartículas, adicionou-se metoxil PEG-NHS (mPEG2000-NHS e/ou mPEG5000-NHS) reagindo por mais 2 horas em temperatura ambiente. Os compostos que não reagiram (mPEG2000-NHS, mPEG5000-NHS, Mal-PEG2000-NHS e Mal-PEG5000-NHS), foram

removidos por centrifugação utilizando um filtro Amicon Ultra-15 (peso molecular de corte é de 100 kDa).

O segundo passo foi acoplar vicrostatin às nanopartículas de CMQS-Gd-DTPA-Mal-PEG-NHS. Primeiramente, grupos sulfidril foram introduzidas na molécula de vicrostatin por reação com SATA (N-succinimidil-S-acetiltio-acetato de etilo). Um excesso molar de 20 vezes de vicrostatin modificado com SATA foi adicionada a solução de nanopartículas já peguiladas e as reações ocorreram durante toda noite para permitir que as lisinas do vicrostatin reagissem com os grupos maleimida do PEG.

Após a funcionalização com vicrostatin, as nanopartículas foram marcadas a temperatura ambiente e protegidas da luz com um excesso molar de 10 vezes de cianina-5-NHS (Éster N-hidroxilsuccinimida), esta reação foi mantida durante a noite à temperatura ambiente e protegida da luz. Fluoresceína Cianina -5 -NHS que não reagiram, foram removidas por centrifugação utilizando um filtro Amicon Ultra-15 (peso molecular de corte de 100 kDa).

As nanopartículas controle, foram somente preparadas de forma semelhante por reação com mPEG-NHS (mPEG2000-NHS e/ou mPEG5000-NHS), seguida de marcação com cianina 5-NHS e posterior filtração com Amicon Ultra-15 (peso molecular de corte de 100 kDa).

As nanopartículas formadas estão listadas na Tabela 6.

**Tabela 6** - Nanopartículas de carboximetilquitosana encapsuladas com gadolínio-DTPA não funcionalizadas e funcionalizadas com vicrostatin.

Tipo of NPs	Vicrostatin (mg)	Mal-PEG-NHS	mPEG-NHS
Funcionalizadas	5.5	2k (30% de 20/1 razão molar)	2k (70% de 20/1 razão molar)
Funcionalizadas	5.0	5k (30% de 20/1 razão molar)	5k (70% de 20/1 razão molar)
Não-Funcionalizadas (controle)	—	—	2k (100% de 20/1 razão molar)
Não-Funcionalizadas (controle)	—	—	5k (100% de 20/1 razão molar)

### 4.2.3. Caracterização físico-química das nanopartículas

#### 4.2.3.1. Determinação do diâmetro médio, índice de polidispersidade (Pdl) e potencial zeta das nanopartículas

O diâmetro médio e o índice de polidispersidade das nanopartículas obtidas de acordo com os itens 4.2.1.3, 4.2.1.4, 4.2.1.6 e 4.2.2 foram determinados através da técnica de espalhamento dinâmico de luz em comprimento de onda de 633 nm, a 25 °C. As medidas foram feitas em triplicata com 10 determinações do diâmetro para cada uma das amostras (CSABA; KÖPING-HÖGGÅRD; ALONSO, 2009).

O potencial zeta das dispersões de nanopartículas de quitosana e nanopartículas de quitosana modificadas com PEG, sem e com cRGDfV ou cRGDfK e nanopartículas de quitosana não funcionalizadas e funcionalizadas com cRGDfK, foram determinadas através da mobilidade eletroforética das amostras. As análises foram realizadas em Analisador de partículas ZetaSizer Nano-ZS, Malvern Instruments acoplado a um MPT – Multi Purpose Titrator.

A medição efetuada por este equipamento é baseada no efeito de Doppler, ou seja, na alteração da interferência sofrida pela luz dispersa por uma partícula em movimento. A contagem dos fótons permite a elaboração de um espectro de frequência a partir do qual o potencial zeta das partículas pode ser calculado (CSABA; KÖPING-HÖGGÅRD; ALONSO, 2009; MALVERN, 2004).

Para a realização das medidas foram feitas 10 determinações de potencial zeta para cada uma delas, calculando-se os valores médios e os respectivos desvios padrões.

#### 4.2.3.2. Morfologia das nanopartículas por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Microscopia de força atômica (AFM)

As análises morfológicas foram realizadas por microscópio eletrônico de varredura em modo alto vácuo, a uma pressão parcial no interior da câmara de 1,33 mbar. As amostras foram depositadas sobre suporte para microscopia eletrônica de varredura e colocadas em dessecador para secagem e formação dos filmes das nanopartículas. Após formação do filme de nanopartículas, essas amostras foram depositadas sobre pino de alumínio e fixadas em cola de carbono. Em seguida, as amostras tornaram-se condutoras por deposição de uma camada

de carbono e foram posteriormente analisadas. As fotomicrografias foram obtidas utilizando-se um feixe de elétrons de 2.0 kV (CSABA; KÖPING-HÖGGÅRD; ALONSO, 2010).

No caso da microscopia de força atômica, todas as amostras foram colocadas em substratos de silício utilizando um spin-coater (Modelo P6700 da Specialty Coating Systems, Inc.) a 2000 rpm durante 120s promovendo o revestimento das amostras. As amostras foram analisadas por uma sonda de varrimento ICON da Bruker equipado com uma ponta de silício e braço de suporte integrada que tem uma frequência de ressonância de 300 KHz. As velocidades de varredura foram entre 0,7 e 1,2 Hz.s<sup>-1</sup>. A fim de obter resultados reprodutíveis, diferentes regiões dos espécimes foram digitalizados para escolher imagens representativas de AFM.

Para as amostras contendo gadolínio-DTPA, a técnica de espectroscopia de energiadispersiva (EDS) acoplada ao microscópio de varredura foi utilizada para determinação da presença de gadolínio nas nanopartículas.

#### **4.2.3.3. Caracterização das nanopartículas por espectroscopia de absorção na região do infravermelho por transformada de Fourier**

As nanopartículas foram analisadas por espectroscopia de absorção na região do infravermelho por transformada de Fourier, utilizando pastilhas de brometo de potássio (KBr). As amostras foram pesadas e adicionadas ao KBr, trituradas em gral e os discos foram formados em prensa hidráulica. Os discos formados foram transferidos para o equipamento, e os espectros foram obtidos na região de 4000–400 cm<sup>-1</sup>.

#### **4.2.3.4. Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)**

As análises foram realizadas no Departamento de Química Análítica do Instituto de Química de Araraquara. Foi utilizado um módulo DSC 1 da Metler Toledo, acoplado à um módulo de resfriamento por N<sub>2</sub> (IntraCooler).

As curvas de DSC foram obtidas em atmosfera de N<sub>2</sub> (50 mL.min<sup>-1</sup>). Como suporte de amostra, foi empregado um cadinho de alumínio com tampa e como referência um similar vazio. A massa da amostra foi da ordem de 2,00 mg. A razão de aquecimento utilizada foi de 10 °C.min<sup>-1</sup>. Convencionalmente, adotou-se como exotérmico a disposição dos picos

indicados no sentido ascendente. Neste estudo, o intervalo de temperatura das amostras foi entre 25 °C a 350 °C.

As amostras analisadas por DSC foram a QS, TPP, polifosfato, PEG, misturas físicas binárias (QS/TPP e QS/Polifosfato) e mistura ternária (QS/TPP/PEG, QS/PP/PEG).

#### 4.2.3.5. Ressonância Magnética Nuclear de $^{31}\text{P}$ e $^{13}\text{C}$ (RMN)

As amostras foram analisadas por espectroscopia de ressonância magnética nuclear de carbono no estado sólido com polarização cruzada,  $^{13}\text{C}$  CP/MAS (125,5 MHz), em um aparelho Varian Inova 300 MHz, utilizando-se TMS como padrão interno. O tempo de relaxação foi de 3 segundos, e a rotação de 8,0 kHz e pulso de 90 graus.

As análises qualitativas por espectroscopia de ressonância magnética nuclear de fósforo no estado sólido com polarização cruzada,  $^{31}\text{P}$ -MAS (202,05 MHz), foram obtidas em um aparelho Varian Inova 300 MHz, utilizando-se como padrão interno o  $\text{H}_3\text{PO}_4$  85%. O tempo de relaxação foi de 200 segundos, com rotação de 14,0 kHz e pulso de 90 graus.

#### 4.2.4. Caracterização estrutural dos peptídeos cRGDfV e cRGDfK

##### 4.2.4.1. Espectroscopia de Dicroísmo Circular

Os espectros de dicroísmo circular foram realizadas utilizando-se um espectropolarímetro acoplado a um sistema de controle de temperatura no Laboratório de Bioquímica e Biofísica de Proteínas, Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo (USP).

Os espectros foram obtidos a 25 °C, comprimento de onda na faixa de 190 a 260 nm, utilizando-se uma cubeta de quartzo com 1 mm de caminho óptico, em 40 varreduras consecutivas por amostra. Foi empregada a velocidade de varredura de 100 nm.min<sup>-1</sup>. A largura de banda foi de 1 nm e a leitura de elipticidade realizada a cada 0,5 nm.

As amostras analisadas foram a cRGDfV e cRGDfK na concentração de 0,5 mg.mL<sup>-1</sup>, respectivamente, em soluções de tampão fosfato, QS, TPP, PP e PEG. Todos os espectros de dicroísmo circular foram corrigidos com a subtração dos espectros dos componentes utilizados e os dados gerados com a subtração desses espectros foram convertidos em

elipticidade molar por resíduo,  $[\theta]$ , dado em graus  $\text{cm}^2 \cdot \text{dmol}^{-1}$ , calculado de acordo com a equação 1:

$$[\theta]_{MRW(\lambda)} = \frac{\theta_{(\lambda)} \times M_w}{10 \times c_g \times d \times n} \quad \text{Eq. (1),}$$

onde  $\theta_{(\lambda)}$  é a elipticidade (em graus),  $M_w$  é o peso médio da proteína em dalton,  $c_g$  é a concentração da proteína em  $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,  $d$  é a distância caminho óptico em cm,  $n$  é o número de resíduos do aminoácido.

#### 4.2.4.2. Caracterização do cRGDfV e cRGDfK por espectroscopia de absorção na região do infravermelho por transformada de Fourier

As amostras cRGDfV e cRGDfK foram analisadas por espectroscopia de absorção na região do infravermelho por transformada de Fourier, utilizando pastilhas de brometo de potássio (KBr). As amostras foram pesadas e adicionadas ao KBr e trituradas em gral e as pastilhas foram formados em prensa hidráulica. Os discos formados foram transferidos para o equipamento, e os espectros foram obtidos na região de  $4000\text{--}400 \text{ cm}^{-1}$ .

#### 4.2.5. Avaliação da eficiência de associação do cRGDfV e cRGDfK nas nanopartículas

A eficiência de associação do cRGDfV e cRGDfK nas nanopartículas foi determinada pela separação do peptídeo livre no sobrenadante daqueles incorporados nas nanopartículas, através da técnica de filtração-ultracentrifugação utilizando um filtro Amicon Ultra15 (Millipore®) com tamanho de 30 kDa.

Foram utilizados 1 mL das amostras de nanopartículas com cRGDfV e cRGDfK que foram adicionadas no filtro Amicon e foram centrifugadas a  $50,000 \times g$  durante 15 minutos a  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ . O sobrenadante foi transferido para placas contendo 16 poços, em 2 mL de reagente BCA (ácido bicinônico) foram adicionados sobre 200  $\mu\text{L}$  do sobrenadante e analisados por espectrofotometria de UV-Vis a 562 nm. O método BCA está baseado na redução do cobre ( $\text{Cu}^{+2}$  em  $\text{Cu}^{+1}$ ) pela proteína em um meio alcalino utilizando um reagente contendo ácido bicinônico resultando na formação de uma coloração púrpura. Para determinação da eficiência de associação foi construída uma curva padrão de soro albumina bovina (BSA) a

partir da solução estoque de 1 mg.mL<sup>-1</sup>. A BSA foi utilizada como proteína padrão para a determinação da cRGDfV e cRGDfK nas nanopartículas (DUDHANI; KOSARAJU, 2010).

A eficiência de associação (EA) foi calculada através da equação 2. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

$$EA(\%) = \frac{\text{concentração total de proteína} - \text{concentração da proteína livre}}{\text{concentração total de proteína}} \times 100 \quad \text{Eq.(2)}$$

#### 4.2.6. Avaliação da eficiência de ligação das nanopartículas com a mucina

A eficiência de ligação das nanopartículas com a mucina foi avaliada pela do método proposto por Yin e colaboradores (2006). A porcentagem de associação das nanopartículas com a mucina foi determinada pela mistura de 5 mL de suspensão de mucina suína tipo II (0,5 mg.mL<sup>-1</sup> em PBS pH 6,2) com o mesmo volume de nanopartículas. As suspensões formadas foram incubadas e mantidas por agitação constante a 32 °C por 60 minutos. As suspensões foram então centrifugadas a 50,000 ×g por 30 minutos e a concentração de mucina livre no sobrenadante foi determinada por colorimetria, pelo método de Lowry modificado por Peterson (DHAWAN et al., 2004; PETERSON, 1977). Para a determinação da mucina livre no sobrenadante, 1 mL do reagente de Lowry foi adicionado à 1 mL do sobrenadante, permanecendo em temperatura ambiente por 20 minutos. Em seguida, adicionou-se 0,5 mL do reagente de Folin-Ciocalteu's e a reação foi mantida por 30 minutos adicionais nas mesmas condições. A absorbância foi medida por espectrofotometria visível em 749 nm, em duplicata. Para o branco, o mesmo procedimento foi empregado utilizando água destilada. Todas as amostras foram realizadas em replicatas. Para o cálculo da quantidade de mucina livre, foi utilizada uma curva analítica padrão de equação  $y = 0,0085 x + 0,0741$  e o coeficiente de determinação obtido foi  $r^2 = 0,997$  (PEDREIRO, 2015).

A eficiência de ligação das nanopartículas com a mucina foi calculada pela equação 3:

$$EL(\%) = \frac{\text{concentração total de mucina} - \text{concentração da mucina livre}}{\text{concentração total de mucina}} \times 100 \quad \text{Eq. (3)}$$

#### 4.2.7. Avaliação da expressão de integrinas em células de glioma

Os ensaios para determinação das integrinas expressas em células de glioma foram realizados no Laboratório de Patologia e Biologia Molecular, na University of Southern California, Los Angeles, Estados Unidos.

As células de gliomas U251R, U251S, U87R, U87S, T98, LN18 e LN229 foram cultivadas sobre microslides de vidro (8 mm) e fixadas com acetona. Após 24 horas incubadas em estufa a 37 °C e 5% CO<sub>2</sub>, as células foram lavadas com PBS para remoção de células que não estavam aderidas aos microslides. Primeiro as células foram incubadas com tampão de soro de peixe (SEA Block, Thermo Scientific) durante 20 minutos, após este tempo as células foram incubadas *overnight* com anticorpo primário anti-humano de rato  $\alpha_v\beta_3$  e  $\alpha_v\beta_5$  na diluição de 1:100 (Milipore, Temecula, California, EUA). O controle sem anticorpo primário foi usado como controle negativo. Após a incubação, todas as células foram lavadas com PBS e incubadas com o anticorpo secundário biotilado anti-cavalo em tampão de bloqueamento de soro de peixe durante 45 minutos. Em seguida, as células foram lavadas com PBS e incubadas com o complexo avidina/biotina (ABC Elite) durante 30 minutos. Em seguida o reagente 3-amino-9-etilcarbazole (AEC) foi adicionado em cada microslide e incubado até que o controle positivo ficasse vermelho. As células foram coradas com hematoxilina durante 3 minutos. Amostras positivas foram identificadas pelo aparecimento de núcleo vermelho.

##### 4.2.7.1. Avaliação da citotoxicidade *in vitro* de nanopartículas encapsuladas com cRGDfV e cRGDfK em células de glioma utilizando método do MTT

Os ensaios de viabilidade foram realizados utilizando células U87 (células de glioblastoma, astrocitoma grau IV - ATCC n° HTB-14<sup>TM</sup>). Este ensaio foi realizado no Laboratório de Proteômica da Universidade Estadual Paulista - UNESP, Araraquara, São Paulo.

Para o ensaio de viabilidade celular foi utilizado o método baseado na capacidade das células viáveis de clivar o anel tetrazólico presente no sal de MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio), pela ação de enzimas desidrogenases presentes na mitocôndria ativa, formando cristais de formazana (MOSMANN, 1983).

Em uma placa estéril de 96 cavidades de fundo plano, foram distribuídos 100  $\mu\text{L}$  por cavidade das suspensões de células U87 as células foram ajustadas à concentração de  $5 \times 10^4$  células/mL em meio de cultura DMEM, composto de meio essencial mínimo de Dubelcco modificado, contendo 10% de soro fetal bovino, 50  $\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$  de penicilina, 0,1  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  de estreptomicina e 0,25  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  de anfotericina.

Nas placas contendo as células U87 foram adicionados cRGDfV e/ou cRGDfK, as nanopartículas de quitosana (sem e com cRGDfV e/ou cRGDfK), nanopartículas de quitosana peguiladas (sem e com cRGDfV e/ou cRGDfK), nanopartículas de quitosana não funcionalizadas e funcionalizadas com cRGDfK. Para o cRGDfV as concentrações testadas foram 1  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 5  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 10  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 15  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 20  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  e 30  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ . Enquanto que para o cRGDfK, as concentrações testadas foram 5  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 10  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 15  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 30  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 50  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  e 100  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ . Todas as concentrações utilizadas estão baseadas em experimentos da literatura (CAI et al., 2011).

O experimento foi repetido três vezes em ocasiões diversas em triplicata. As placas foram incubadas por 24 h a 37 °C em estufa com 5% de  $\text{CO}_2$ . Após esse procedimento, os sobrenadantes foram retirados por aspiração com auxílio de uma micropipeta e descartados. Por fim, as células foram tratadas com 100  $\mu\text{L}$  de DMSO (dimetilsulfóxido) para solubilizar os cristais de formazana formados. A leitura da densidade ótica foi determinada em espectrofotômetro em UV-Vis a 570 nm com filtro de referência de 690 nm. A análise estatística foi realizada utilizando método de análise de variância (ANOVA), seguido pelo teste *t*-Student na versão de comparações múltiplas de Tukey-Kramer. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos.

#### **4.2.7.2. Avaliação da captação das nanopartículas em células U87 e U251 e estudos de competição por citometria de fluxo**

Em tubos de eppendorff, foram distribuídos 100  $\mu\text{L}$  por cavidade das suspensões de células U87 e U251. As células foram ajustadas à concentração de  $1,5 \times 10^5$  células/mL em meio de cultura DMEM, composto de Meio Essencial Mínimo de Dubelcco Modificado, contendo 10% de soro fetal bovino, 50  $\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$  de penicilina, 0,1  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  de estreptomicina e 0,25  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  de anfotericina. As células foram incubadas durante 10 minutos a 37 °C em em

homogeneizador de sangue horizontal sob constante agitação para promover a exposição das integrinas.

Após este período, as células foram incubadas durante 60 minutos com 10  $\mu$ L de cRGDfV (30  $\mu$ g/tubo), cRGDfK (50  $\mu$ g/tubo), nanopartículas de quitosana (sem e com cRGDfV e/ou cRGDfK), nanopartículas de quitosana peguiladas (sem e com cRGDfV e/ou cRGDfK), nanopartículas de quitosana não funcionalizadas (controle) e funcionalizadas com cRGDfK. Após o período de incubação, as amostras foram centrifugadas por 1570  $\times$ g, durante 3 minutos e as células foram coletadas e homogeneizadas com tampão de citometria seguido de posterior análise. Todas as amostras foram marcadas com isotiocinato de fluoresceína (FITC-NHS), como descrito no item 4.2.1.6. As nanopartículas sem o inibidor de integrina foram utilizadas como controle e foram incubadas por 30 minutos para redução da internalização inespecífica.

Para as nanopartículas de CMQS encapsuladas com gadolínio-DTPA não funcionalizadas (controle) e funcionalizadas com vicrostatin, os experimentos seguiram o mesmo procedimento descrito acima. As amostras de nanopartículas com carboximetilquitosana foram marcadas com cianina-5 e as células foram infectadas com um lentivírus que expressa a proteína verde fluorescente (GFP).

Os experimentos de competição com o receptor (integrinas) seguem o mesmo procedimento descrito acima, exceto pela incubação de todas as amostras com cRGDfK e cRGDfV e vicrostatin com excesso de inibidor de integrina (300  $\mu$ g/tubo) durante 2 horas anteriores a adição das amostras. Foi avaliada a % de células internalizadas, em um total de 20,000 eventos por amostra monitorados no canal de FITC (excitação = 490 nm e emissão = 525 nm).

Os experimentos com cRGDfV e cRGDfK foram realizados no Laboratório de Proteômica da Universidade Estadual Paulista - UNESP, Araraquara, São Paulo utilizando um citômetro de fluxo FACS Canto I e os experimentos com vicrostatin foram realizados na University of Southern California, Los Angeles, utilizando um citômetro BD FACS Aria I.

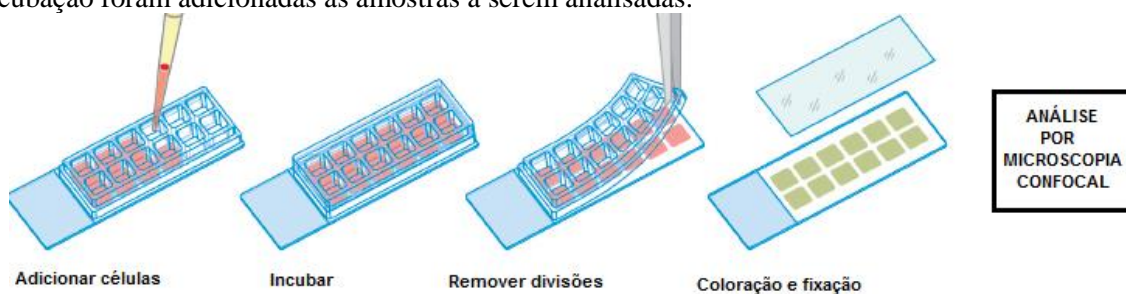
#### **4.2.7.3. Avaliação da captação das nanopartículas em células U87 e U251 por microscopia confocal**

Os estudos de internalização empregando microscopia confocal foram realizados a

fim de avaliar a internalização celular das nanopartículas de forma qualitativa.

As células U251 e U87 marcadas com a proteína GFP (somente para as amostras com carboximetilquitosana) ou células U87 (nanopartículas de quitosana) foram semeadas em câmaras de múltiplos poços (10.000 células/poço) e incubadas por 24 h. Após este período, as células foram incubadas durante 4 horas com 10  $\mu$ L de nanopartículas de quitosana não funcionalizadas (controle) e funcionalizadas com cRGDfK e nanopartículas de CMQS encapsuladas com gadolínio-DTPA não funcionalizadas (controle) e funcionalizadas com microstatin. Após a incubação, as células foram lavadas com tampão fosfato salino (PBS, pH 7,4) e fixadas com 4% de paraformaldeído durante 20 min, com posterior lavagem com PBS gelado, e em seguida adicionou-se DAPI (amostras de carboximetilquitosana), Hoestch 3342 e faloidina (amostras de quitosana) para colorir o núcleo e o citoplasma das células, respectivamente. Em seguida adicionou-se meio de montagem e os poços foram cobertos com uma lâmina de vidro. As imagens microscópicas foram adquiridas na University of Southern California usando uma Zeiss LSM 510 microscópio confocal (Carl Zeiss, Gottingen, Alemanha). As imagens foram obtidas utilizando um laser de Argônio/2 com excitação em 488 nm (10 mW) para células marcadas com GFP e faloidina, um laser de Diodo para o DAPI e Hoescht 3342 com excitação em 405 nm, e um laser de HeNe com excitação em 543 nm para as nanopartículas marcadas com rodamina, e um laser HeNe com excitação em 633 nm (5 mW) para as nanopartículas de carboximetilquitosana marcadas com Cianina-5 (Cy5). As imagens digitais foram analisadas usando software ImageJ<sup>®</sup>. Todos os parâmetros de configuração para detecção de fluorescência e análise de imagem foram mantidos constantes para permitir a consistência na imagem e para posterior comparação.

**Figura 15** - Esquema de preparo das amostras para análise em microscopia confocal. Na etapa de incubação foram adicionadas as amostras a serem analisadas.



Fonte: <http://ibidi.com/applications/immunofluorescence-if/removable-chambers-for-if/>.

## 5. RESULTADOS

### 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

As nanopartículas de quitosana foram desenvolvidas pela técnica de gelificação ionotrópica conforme Calvo e colaboradores (CALVO et al., 1997; KIILL et al., 2012) empregando o planejamento fatorial. Para isso, oito diferentes formulações contendo TPP e outras oito contendo o polifosfato como agentes reticulantes foram preparadas. O planejamento fatorial foi aplicado com o objetivo de maximizar a eficácia experimental com base em estudos de pré-formulação descritos na literatura e reduzir o número de experimentos a fim de se obter resultados satisfatórios em relação ao diâmetro médio, índice de polidispersão e potencial zeta das nanopartículas para a encapsulação dos inibidores de integrinas.

Os parâmetros descritos na Tabela 4 foram utilizados para o desenvolvimento de diferentes nanopartículas. A caracterização por diâmetro médio e índice de polidispersão foi realizada empregando espalhamento dinâmico de luz. O princípio desta técnica está relacionado com o movimento browniano que os sistemas coloidais apresentam, o qual causa uma variação na intensidade de luz dispersa quando um feixe de luz incide sobre a suspensão coloidal. Assim, quanto maiores são as partículas, mais lentamente elas se movem e, conseqüentemente, menor é a velocidade das flutuações da luz dispersada (CSABA; KÖPING-HÖGGÅRD; ALONSO, 2009).

O tamanho das partículas é de extrema importância quando se utiliza nanopartículas como carreadores de proteínas para administração pela via nasal e endovenosa, a fim de que atravessem as barreiras biológicas. Nanopartículas com tamanho entre 50-250 nm conseguem atravessar a barreira hematoencefálica e se ligar aos receptores que são as integrinas expressas nos glioblastomas (KIM et al., 2008; MASSERINI, 2013; OLIVIER, 2005).

Portanto, os parâmetros adotados como adequados neste trabalho foram nanopartículas com diâmetro médio de 50-250 nm, índice de polidispersão (PdI) de 0,4 e

potencial zeta entre +20-40 mV. A partir das variáveis adotadas no planejamento fatorial, foi possível identificar quais são os parâmetros que em conjunto podem levar à formação de nanopartículas com as propriedades desejáveis. As Tabelas 7 e 8 apresentam os resultados de diâmetro médio e PdI das nanopartículas obtidas por planejamento fatorial empregando TPP ou polifosfato como agentes reticulantes, respectivamente.

**Tabela 7** - Diâmetro médio (nm) e índice de polidispersão das nanopartículas com TPP.

Experimento	pH	Concentração de TPP (m/V)	Concentração de Ácido acético (M)	Diâmetro Médio $\pm$ DP (nm)	PdI $\pm$ DP
1	(-) 4,4	(-) 0,34	(-) 0,1	170 $\pm$ 1,4	0,364 $\pm$ 0,04
2	(+) 4,8	(-) 0,34	(-) 0,1	168 $\pm$ 22,1	0,417 $\pm$ 0,03
3	(-) 4,4	(+) 0,40	(-) 0,1	83,1 $\pm$ 0,96	0,283 $\pm$ 0,02
4	(+) 4,8	(+) 0,40	(-) 0,1	158,2 $\pm$ 7,47	0,467 $\pm$ 0,07
5	(-) 4,4	(-) 0,34	(+) 0,2	212,2 $\pm$ 10,7	0,433 $\pm$ 0,02
6	(+) 4,8	(-) 0,34	(+) 0,2	241 $\pm$ 4,85	0,476 $\pm$ 0,03
7	(-) 4,4	(+) 0,40	(+) 0,2	113,9 $\pm$ 2,62	0,411 $\pm$ 0,04
8	(+) 4,8	(+) 0,40	(+) 0,2	94,5 $\pm$ 0,80	0,325 $\pm$ 0,04

**Tabela 8** - Diâmetro médio (nm) e índice de polidispersão das nanopartículas com polifosfato.

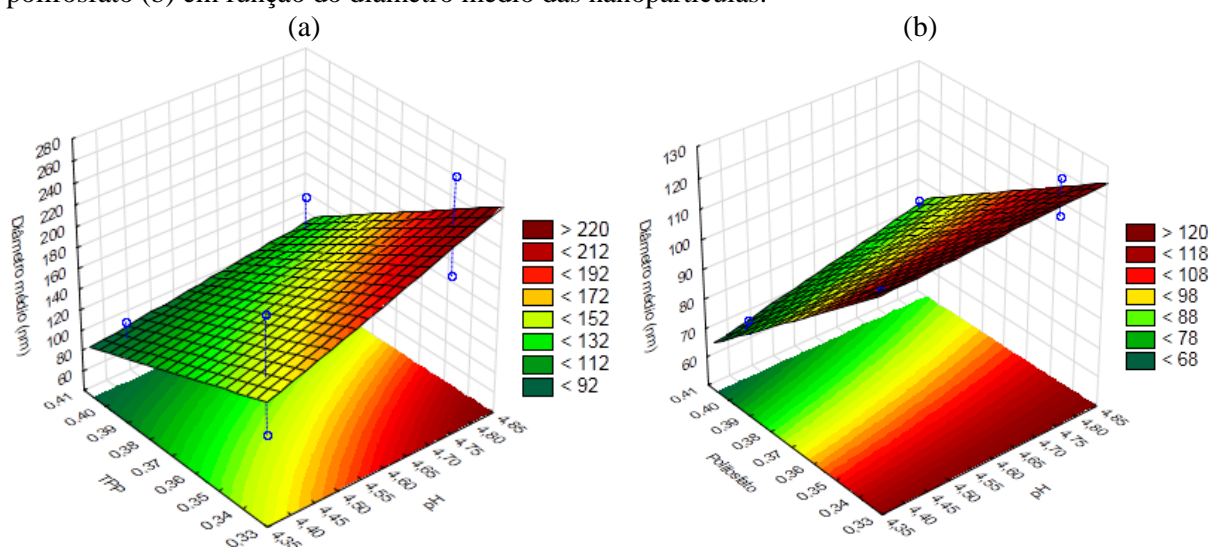
Experimento	pH	Concentração de polifosfato (m/V)	Concentração de Ácido acético (M)	Diâmetro Médio $\pm$ DP (nm)	PdI $\pm$ DP
1	(-) 4,4	(-) 0,34	(-) 0,1	114,6 $\pm$ 1,35	0,435 $\pm$ 0,01
2	(+) 4,8	(-) 0,34	(-) 0,1	112,7 $\pm$ 4,94	0,420 $\pm$ 0,02
3	(-) 4,4	(+) 0,40	(-) 0,1	71,19 $\pm$ 1,06	0,28 $\pm$ 0,004
4	(+) 4,8	(+) 0,40	(-) 0,1	90,0 $\pm$ 0,257	0,375 $\pm$ 0,01
5	(-) 4,4	(-) 0,34	(+) 0,2	114,3 $\pm$ 5,61	0,485 $\pm$ 0,10
6	(+) 4,8	(-) 0,34	(+) 0,2	125,0 $\pm$ 3,38	0,469 $\pm$ 0,01
7	(-) 4,4	(+) 0,40	(+) 0,2	74,44 $\pm$ 1,62	0,300 $\pm$ 0,02
8	(+) 4,8	(+) 0,40	(+) 0,2	82,56 $\pm$ 2,33	0,360 $\pm$ 0,05

Para determinação da relação existente entre as variáveis independentes na obtenção das nanopartículas, a metodologia de superfície de resposta foi aplicada. Esta metodologia

consiste em uma coleção de técnicas estatísticas e matemáticas e teve por objetivo a identificação de quais são os melhores parâmetros para a obtenção de nanopartículas.

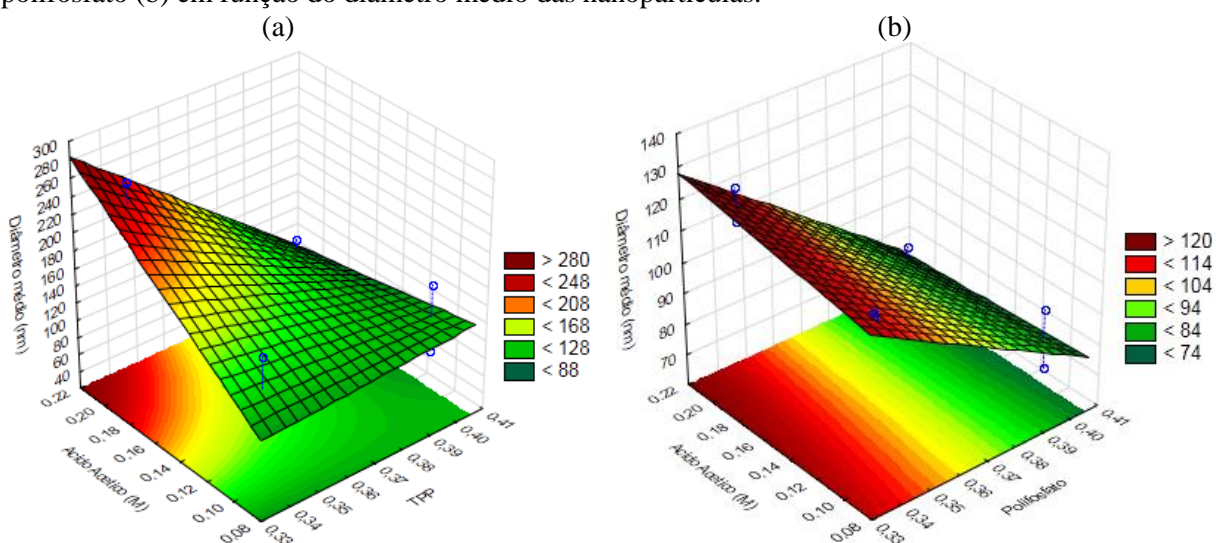
A Figura 16 demonstra que as nanopartículas com maiores concentrações de TPP e polifosfato e menor pH (4,4) apresentaram diâmetros médios menores. A adição de maior concentração de TPP e de polifosfato pode ter favorecido a difusão dos grupos fosfatos no interior das cadeias de QS, contribuindo para a interação destes grupos com os grupamentos amino da QS e possibilitando a obtenção de nanopartículas menores.

**Figura 16** - Gráfico de superfície de resposta do efeito do pH e da concentração de TPP (a) e polifosfato (b) em função do diâmetro médio das nanopartículas.



Nos gráficos de superfície de resposta da Figura 17, observamos que concentrações maiores de ácido acético (0,2 M) levaram a formação de nanopartículas com diâmetros médios maiores. Este fato pode estar relacionado com a alta concentração de ácido acético que pode levar a acetilação da quitosana, ou seja, diminuição do grau de desacetilação dos sítios de ligação devido à diminuição dos grupos aminos e, conseqüentemente, uma diminuição da interação entre TPP ou polifosfato com estes grupos.

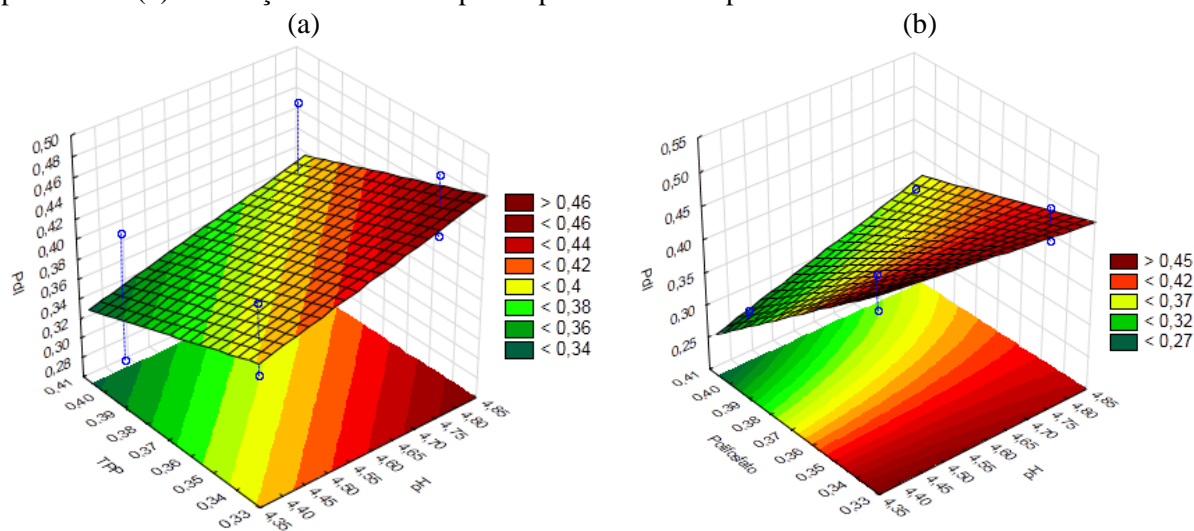
**Figura 17** - Gráfico de superfície de resposta do efeito do ácido acético e da concentração de TPP (a) e polifosfato (b) em função do diâmetro médio das nanopartículas.



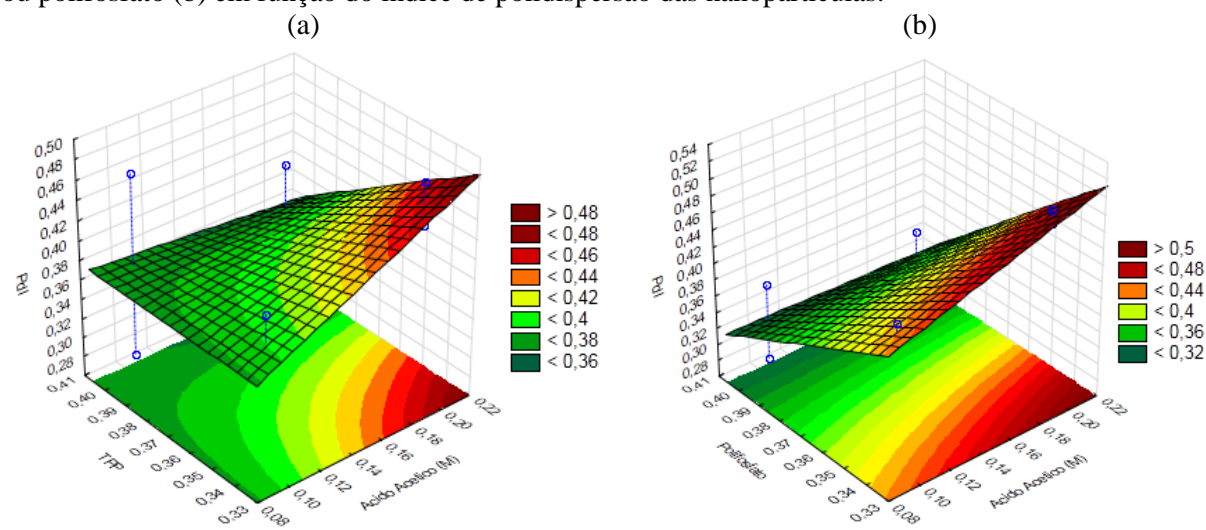
Em relação ao índice de polidispersão, as Figuras 18 e 19 confirmam que valores de pH menores, menor concentração de ácido acético (0,1 M) e concentrações maiores de TPP e polifosfato levam à formação de partículas menores e mais homogêneas.

A presença de menor concentração de ácido acético e valores de pH menores (4,4) promovem a protonação dos grupamentos amino ( $\text{NH}_2$ ) da quitosana em grupos amino protonados ( $\text{NH}_3^+$ ), alterando a densidade de carga da quitosana, o que pode auxiliar na interação com grupamentos fosfato ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) do TPP e polifosfato e, assim, facilitar a formação de partículas menores.

**Figura 18** - Gráfico de superfície de resposta do efeito do pH e da concentração de TPP (a) ou polifosfato (b) em função do índice de polidispersão das nanopartículas.



**Figura 19** - Gráfico de superfície de resposta do efeito da concentração de ácido acético e de TPP (a) ou polifosfato (b) em função do índice de polidispersão das nanopartículas.



Outro parâmetro essencial para a caracterização das nanopartículas é a avaliação do potencial zeta.

O potencial zeta reflete o potencial de superfície das nanopartículas, o qual é influenciado pelas mudanças na interface com o meio dispersante em razão da dissociação de grupos funcionais na superfície da partícula ou da adsorção de espécies iônicas presentes no meio aquoso da dispersão. Este parâmetro foi obtido a partir da determinação dos dados de mobilidade eletroforética, mediante a técnica denominada Anemometria Laser Doppler, utilizando-se o equipamento Nanosizer/Zetasizer® Nano-ZS (Malvern Instruments - USA).

Neste método, a carga elétrica é medida diretamente após a aplicação de um campo elétrico, que faz com que as partículas movimentem-se em direção ao eletrodo de carga oposta e, desta forma, o potencial elétrico possa ser determinado pela medida da sua velocidade de migração (MALVERN, 2004).

Os valores de potencial zeta das formulações das nanopartículas de quitosana com TPP e polifosfato foram avaliados e estão apresentados na Tabela 9 e 10, respectivamente.

**Tabela 9** - Potencial zeta das nanopartículas com TPP.

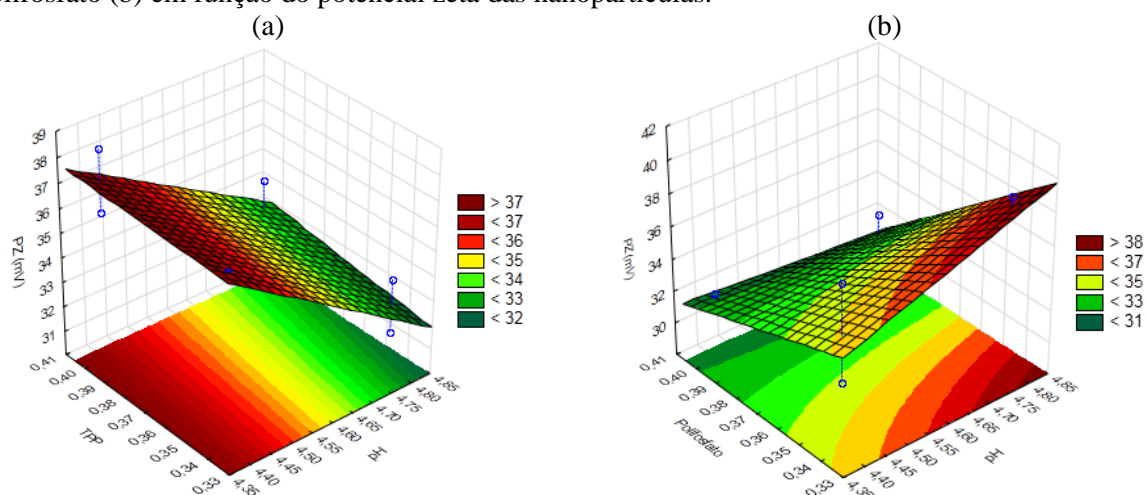
Experimento	pH	Concentração de TPP (m/V)	Concentração de Ácido acético (M)	Potencial Zeta (mV)
1	(-) 4,4	(-) 0,34	(-) 0,1	37,0 ± 3,01
2	(+) 4,8	(-) 0,34	(-) 0,1	31,5 ± 3,32
3	(-) 4,4	(+) 0,40	(-) 0,1	38,5 ± 0,65
4	(+) 4,8	(+) 0,40	(-) 0,1	34,5 ± 3,16
5	(-) 4,4	(-) 0,34	(+) 0,2	37,0 ± 1,56
6	(+) 4,8	(-) 0,34	(+) 0,2	33,7 ± 1,77
7	(-) 4,4	(+) 0,40	(+) 0,2	36,0 ± 3,16
8	(+) 4,8	(+) 0,40	(+) 0,2	32,2 ± 0,84

**Tabela 10** – Potencial zeta das nanopartículas com polifosfato.

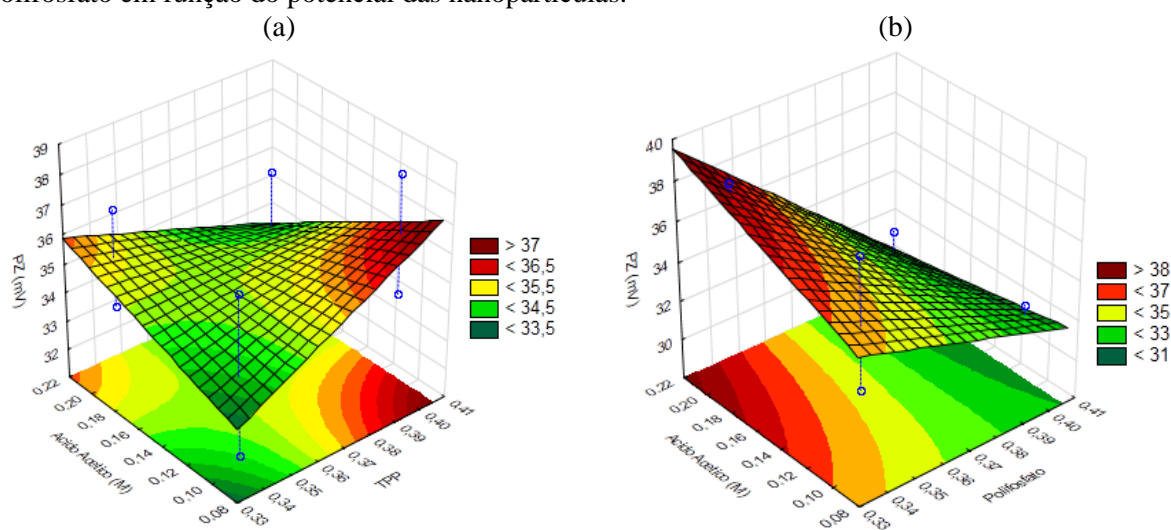
Experimento	pH	Concentração de polifosfato (m/V)	Concentração de ácido acético (M)	Potencial Zeta (mV)
1	(-) 4,4	(-) 0,34	(-) 0,1	32,2 ± 0,67
2	(+) 4,8	(-) 0,34	(-) 0,1	38,7 ± 0,72
3	(-) 4,4	(+) 0,40	(-) 0,1	37,5 ± 0,29
4	(+) 4,8	(+) 0,40	(-) 0,1	32,6 ± 1,52
5	(-) 4,4	(-) 0,34	(+) 0,2	38,1 ± 1,03
6	(+) 4,8	(-) 0,34	(+) 0,2	37,6 ± 0,45
7	(-) 4,4	(+) 0,40	(+) 0,2	32,2 ± 0,56
8	(+) 4,8	(+) 0,40	(+) 0,2	30,2 ± 0,69

Com os resultados apresentados nas Tabelas 9 e 10, utilizando o programa Statistica 10.0, pode ser visualizado o efeito de cada parâmetro – pH, concentração do agente reticulante e concentração de ácido acético – em função do potencial zeta das nanopartículas. Com os gráficos de superfície de resposta abaixo (Figura 20 e 21) foi possível determinar quais parâmetros apresentam diferença estatística significativa no potencial zeta das nanopartículas.

**Figura 20** - Gráfico de superfície de resposta do efeito do pH e da concentração de TPP (a) ou polifosfato (b) em função do potencial zeta das nanopartículas.



**Figura 21** - Gráfico de superfície de resposta do efeito da concentração de ácido acético e TPP ou polifosfato em função do potencial das nanopartículas.



Observamos nas Figuras 20 e 21 que a razão de TPP ou polifosfato ( $0,40 \text{ mg.mL}^{-1}$ ) e valores menores de pH (4,4), além de favorecer a formação de partículas com diâmetros menores e baixa polidispersão, também favoreceu a formação de partículas com potencial zeta acima de 30 mV e, conseqüentemente, com maior estabilidade, uma vez que partículas carregadas se repelem e superam a tendência natural de agregação.

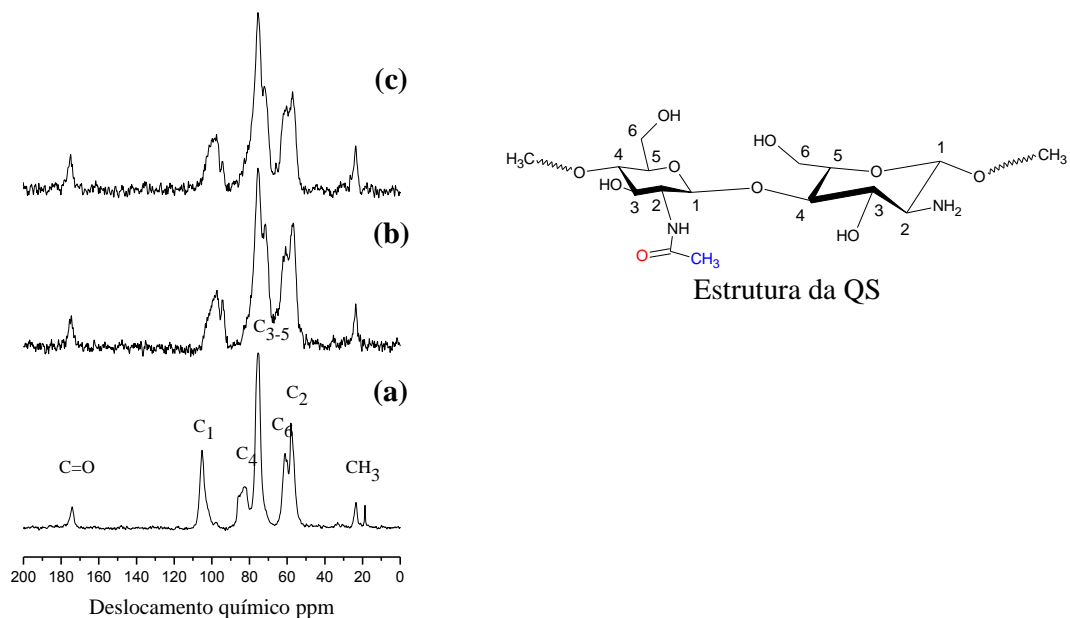
De acordo com a literatura, as nanopartículas com carga superficial superior a +30 mV são mais estáveis, pois apresentam forças repulsivas superficiais suficientes para evitar que elas se agreguem, o que poderia levar a desestabilização do sistema formado (WONGSAGONSUP et al., 2005). Além disso, valores elevados de potencial zeta podem favorecer a mucoadesão das nanopartículas com a mucina presente na cavidade nasal.

O planejamento fatorial foi aplicado a fim de delinear, de forma racional, o desenvolvimento das nanopartículas. A metodologia de superfície de resposta, técnica estatística utilizada para a modelagem dos melhores parâmetros para a preparação das nanopartículas foi aplicado e de acordo com os gráficos de superfície de resposta a nanopartícula que atende melhor em termos de diâmetro médio, índice de polidispersão e potencial zeta foi a nanopartícula com concentração final de  $0,40 \text{ mg.mL}^{-1}$  de TPP ou polifosfato, 0,1 M de ácido acético e pH 4,4. Essas nanopartículas foram as escolhidas e designadas de NPQS/TPP e NPQS/P.

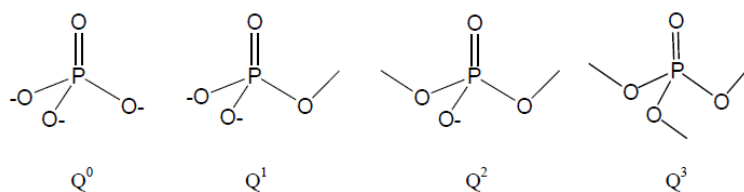
## 5.2. Aplicação da Ressonância Magnética Nuclear de $^{31}\text{P}$ e $^{13}\text{C}$ para avaliar as nanopartículas obtidas com os diferentes agentes reticulantes

A técnica de RMN de  $^{31}\text{P}$  e  $^{13}\text{C}$  foi aplicada para propor as diferenças de formação das nanopartículas reticuladas com TPP e PP, e a diferença da interação da QS com as unidades de fosfato de ambos os reticulantes, o que leva a uma formação de nanopartículas com diferentes diâmetros médios.

A Figura 22 mostra o espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  CP-MAS da QS (a) e das amostras NPQS/PP (b) e NPQS/TPP (c). Os picos característicos da QS são observados em C1 (104,8 ppm), C2 (57,9 ppm), C3/C5 (75,4 ppm), C4 (82,7 ppm), C6 (61,4 ppm) (ZHANG et al., 2013). Observou-se também os picos a 23,2 e 173,9 ppm, que foram atribuídos aos grupos metil ( $\text{CH}_3$ ) e aos grupos carbonil ( $\text{C}=\text{O}$ ), respectivamente, associados a quitina residual. Na amostra NPQS/e NPQS/PP foram observados os picos característicos da QS; no entanto, eles mostraram um aumento na intensidade e um deslocamento no pico 25,4 ppm do carbono acetil e uma ressonância adicional de cerca de 180 ppm, atribuída ao carbono do carbonil, indicando a acetilação da QS durante o processo de obtenção das nanopartículas (ZHANG et al., 2013). A acetilação pode ser devido ao ácido acético usado para a preparação da dispersão de QS.

**Figura 22** - Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da quitosana (a), NPQS/P (b) e NPQS/TPP (c).

A presença do fósforo nas nanopartículas foi confirmada por meio da espectrometria de RMN  $^{31}\text{P}$ . O fósforo pode mostrar-se em diferentes espécies, dependendo do ambiente químico (BARUD, 2006). A Figura 23, mostra as espécies de fosfatos presentes em diferentes ambientes químicos, em que  $Q^n$  representa o número de oxigênios utilizados em ponte por um tetraedro de fosfato.

**Figura 23** - Diferentes espécies de fosfatos conforme a notação  $Q^n$ .

Fonte: MOUSTAFA, 1998.

A Figura 24, mostra os espectros obtidos de  $^{31}\text{P}$  MAS-RMN de TPP e PP. A Figura 24 (a) é referente ao polifosfato de sódio. Os deslocamentos químicos observados em torno de -6,91 ppm e -19,24 ppm mostram a presença de espécies  $Q^1$  e  $Q^2$ . A presença das espécies  $Q^2$  demonstram a presença de fosfato polimérico, formado por fosfatos condensados e unidos

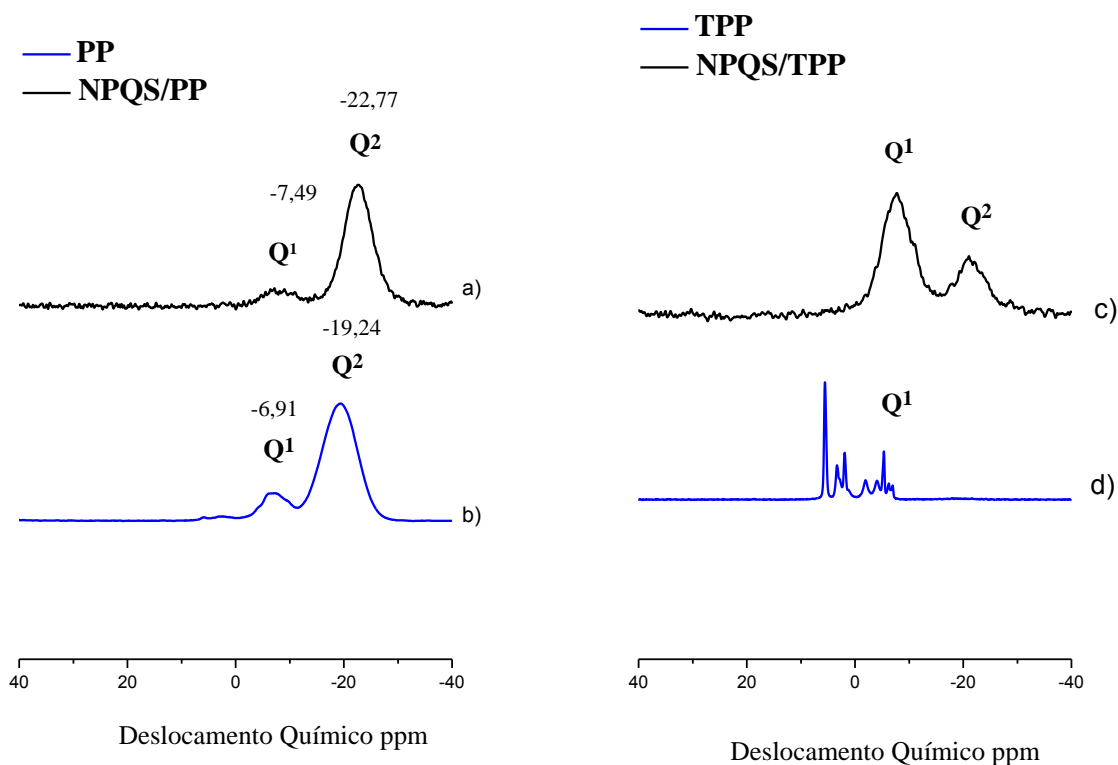
por repetida condensação (polimerização) de unidades de fosfato tetraédricas [PO<sup>4-</sup>] (KIJKOWSKA et al., 2004; MOUSTAFA, 1998). No entanto, sabe-se que o polifosfato é um polímero com espécies de fosfato de diferentes tamanhos, e isto pode ser confirmado pela presença das espécies Q<sup>1</sup> e Q<sup>2</sup>.

A Figura 24 (b) mostra o espectro obtido para as nanopartículas de QS/PP. O espectro indica que o polifosfato foi hidrolisado, pois há a contribuição das espécies químicas Q<sup>1</sup> e Q<sup>2</sup> em -7,49 ppm e -22,77 ppm e a ausência de Q<sup>3</sup> (BARUD, 2006). Nesse espectro nota-se uma diminuição na intensidade do pico referente à espécie Q<sup>1</sup> e um pequeno deslocamento, sugerindo a interação da quitosana com os grupos fosfatos da extremidade. O espectro revela que a presença da quitosana está causando um aumento na intensidade do pico das espécies Q<sup>1</sup> e uma diminuição da intensidade das espécies Q<sup>2</sup>. Essas espécies Q<sup>2</sup> apresentam dois oxigênios que favorecem a interação com os grupamentos amino da QS, levando a formação das nanopartículas poliméricas.

A Figura 24 (c) mostra os espectros do TPP. O TPP comercial, empregado neste estudo, apresentou vários picos na região de 6,60-8 ppm, indicando que trata-se de uma mistura de dois polimorfos de fase cristalina Na<sub>5</sub>P<sub>3</sub>O<sub>10</sub> e Na<sub>5</sub>P<sub>3</sub>O<sub>10</sub>.6H<sub>2</sub>O (FYFE, 1998). O TPP (Na<sub>5</sub>P<sub>3</sub>O<sub>10</sub>) possui duas formas polimórficas anidras, enquanto que o composto comercial Na<sub>5</sub>P<sub>3</sub>O<sub>10</sub> é geralmente uma mistura que contém ambas as fases anidra e cristalina (AVERBUCH-POUCHOT; DURIF, 1996).

A Figura 24 (d) mostra o espectro de <sup>31</sup>P para a nanopartícula de QS/TPP. A amostra apresentou um pico largo, característico de materiais amorfos, o que sugere que os grupos fosfato presentes nestas nanopartículas são amorfos (BARBI et al., 2015). Um pico largo e assimétrico em -7.8 ppm pode ser atribuído às unidades terminais de fosfato amorfo (Q<sup>1</sup>) em TPP, e um pequeno pico a -21 ppm, característico de fosfato ligado por duas unidades de fosfato (Q<sup>2</sup>) (PO<sub>4/2</sub>)<sup>+3</sup>, sugere que a interação entre a QS e o TPP para formação das nanopartículas se dá em maior parte pelas unidades de pirofosfato P<sub>2</sub>O<sub>7</sub><sup>-4</sup> (Q<sup>2</sup>) e, em menor parte, pelo TPP (VASCONCELOS, 2008).

**Figura 24** - Espectros de Ressonância Magnética Nuclear do  $^{31}\text{P}$  das amostras de polifosfato de sódio no estado sólido (a), nanopartículas de QS/PP liofilizadas (b), tripolifosfato de sódio sólido (c), nanopartículas de QS/TPP liofilizadas (d).



A Tabela 11 apresenta os valores dos deslocamentos químicos da QS, NPQS/P e NPQS/TPP.

**Tabela 11** - Valores dos desvios químicos de  $^{13}\text{C}$  (ppm) da QS, NPQS/P e NPQS/TPP.

Amostra	C=O	C <sub>1</sub>	C <sub>2</sub>	C <sub>3</sub> /C <sub>5</sub>	C <sub>4</sub>	C <sub>6</sub>	CH <sub>3</sub>
QS	173,9	104,8	57,9	75,4	82,7	61,4	23,2
NPQS/P	175,3	97,5	57,0	75,4	79,0	60,7	23,2
NPQS/TPP	175,3	97,5	57,0	75,4	80,50	60,7	23,2

A partir da interpretação dos dados de RMN, é possível sugerir que a preparação das dispersões de QS com ácido acético favorece a acetilação dos seus grupos amino. Além disso, as diferentes razões de unidades de fosfato do tipo Q<sup>1</sup> e Q<sup>2</sup> nas QS:TPP ou QS:PP pode explicar a formação de nanopartículas de diferentes diâmetros médios.

### 5.3. Avaliação da influência da modificação da superfície das nanopartículas de quitosana com PEG

Conforme foi mencionado, essas nanopartículas de QS foram modificadas com concentrações crescentes de PEG por meio de interações supramoleculares e parâmetros como o diâmetro médio e índice de polidispersão foram avaliados. O objetivo da modificação supramolecular com PEG é avaliar quais são as influências desta modificação nos parâmetros físico-químicos e biológicos.

Na Tabela 12 é possível observar que a adição de PEG nas nanopartículas promoveu aumento no diâmetro médio. As nanopartículas NPQS/TPP e NPQS/P sem PEG apresentavam diâmetros médios de  $94,45 \pm 0,80$  e  $74,44 \pm 1,62$ , respectivamente (Tabela 11). A adição crescente de PEG tende a aumentar o diâmetro das nanopartículas devido ao aumento da cadeia de PEG, a qual forma uma camada que se estende na superfície das nanopartículas.

**Tabela 12** - Diâmetro médio e índice de polidispersão das nanopartículas modificadas com PEG.

Nanopartículas	PEG/QS (Razão molar)	Diâmetro médio (nm) $\pm$ DP	PdI $\pm$ DP
NPQS/TPP	20/1	$157,8 \pm 2,57$	$0,273 \pm 0,006$
	10/1	$177 \pm 3,13$	$0,291 \pm 0,009$
NPQS/P	20/1	$218 \pm 10,05$	$0,303 \pm 0,017$
	10/1	$207 \pm 6,13$	$0,284 \pm 0,012$

O ensaio de determinação do potencial zeta das nanopartículas modificadas com PEG também foi realizado com objetivo de verificar se o PEG teria capacidade de alterar a carga superficial das nanopartículas, esta carga é importante pois apresenta grande influência na estabilidade, interação com a mucosa nasal e internalização das nanopartículas com as células.

Na Tabela 13, os resultados indicam um decréscimo no valor de potencial zeta para as nanopartículas compostas por QS/PEG (20-30 mV) quando comparado com as nanopartículas de QS/TPP (38,5 mV) e NPQS/P (37,5 mV). A presença do PEG na superfície das nanopartículas forma uma espécie de barreira estérica, que leva a um deslocamento da fase

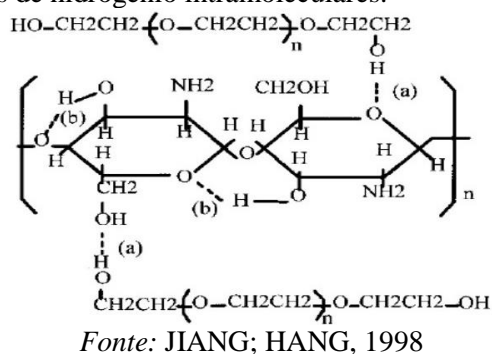
hidrodinâmica do cisalhamento para distâncias maiores a partir da superfície das nanopartículas, ou seja, deslocou o plano de cisalhamento para limites superiores da camada, resultando na redução do valor de potencial zeta

**Tabela 13** - Potencial zeta das nanopartículas modificadas com PEG.

Nanopartículas	PEG:QS (Razão molar)	Potencial zeta (mV ± DP)
NPQS/TPP	20/1	25,8 ± 1,14
	10/1	29,0 ± 0,92
NPQS/P	20/1	22,6 ± 0,30
	10/1	23,4 ± 0,55

A diminuição do potencial zeta pode ser explicada devido a possíveis interações iônicas intermoleculares entre os grupos hidroxila do PEG e grupos hidroxilas e amino da QS, mascarando então as cargas positivas dos grupamentos amino. A Figura 25 ilustra esta possível interação.

**Figura 25** - Esquema da interação entre quitosana e PEG. (a) Ligações de hidrogênio intermoleculares; (b) Ligações de hidrogênio intramoleculares.



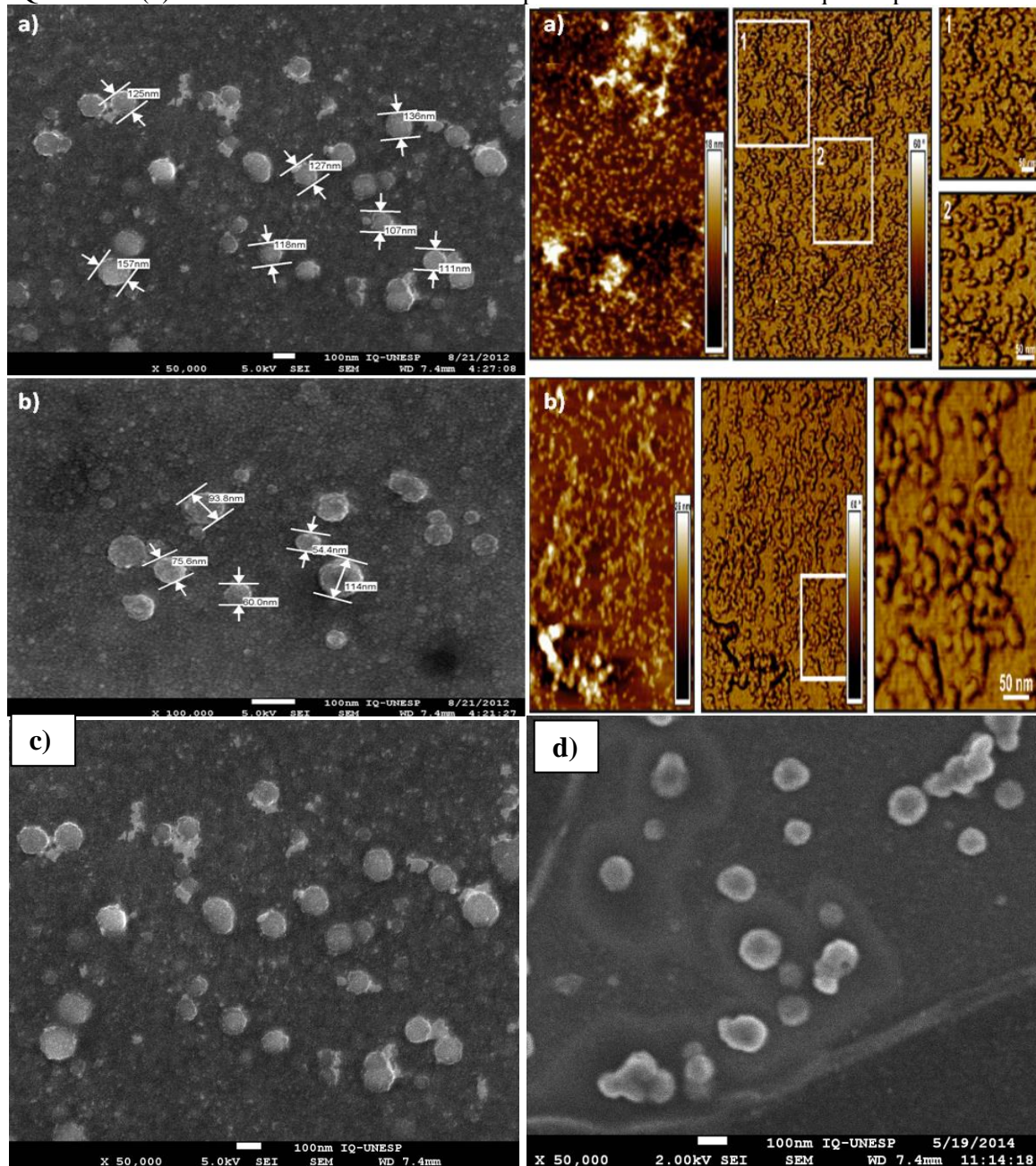
Portanto, esses resultados sugerem que a presença de PEG na superfície das nanopartículas mantém a estabilidade das mesmas e pode contribuir para a diminuição da captação destas nanopartículas pelas células do sistema fagocítico, facilitando a permanência das nanopartículas na mucosa nasal e aumento da biodisponibilidade das desintegrinas para atingir o cérebro (TALEGAONKAR, MISHRA, 2004; TOBIO et al, 1998).

### **5.3.1. Morfologia das nanopartículas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) e microscopia de força atômica (AFM)**

A morfologia das nanopartículas NPQS/TPP e NPQS/P sem e com modificação com PEG foi realizada por MEV e microscopia de força atômica.

As fotomicrografias das nanopartículas NPQS/TPP e das nanopartículas NPQS/P obtidas por MEV mostraram que as nanopartículas apresentam formas esféricas (Figura 26). Da mesma forma, as nanopartículas analisadas por AFM apresentaram uma forma esférica, superfície com presença de agregado e tamanho inferior a 100 nm. Os agregados podem ser uma consequência do processo de secagem da amostra, decorrente da diminuição do volume de solvente em torno das nanopartículas. O tamanho das nanopartículas de QS/TPP e QS/PP obtidas a partir da AFM foi ligeiramente menor do que os dados obtidos por análise de DLS. Uma análise mais profunda dos dados da AFM indicou o tamanho médio das nanopartículas em intervalos de 30-50 nm (Figura 26, à direita). Moura e colaboradores (2009) encontraram resultados semelhantes para as NPQS/TPP desenvolvidas com as mesmas concentrações utilizadas no presente estudo. Além disso, como visualizado em imagens de AFM de alta ampliação, cada nanopartícula foi cercada por um material que parece ser mais escuro. Esse material, com o tamanho de cerca de 5-10 nm, pode ser a QS, e os agentes reticulantes estariam na parte interna das nanopartículas.

**Figura 26** - Fotomicrografias das nanopartículas NPQS/TPP (a), NPQS/P (b), NPQS/TPP-PEG (c) e NPQS/P-PEG (d). As fotos à direita foram obtidas por AFM e as amostras à esquerda por MEV.



A modificação da superfície das nanopartículas com PEG não alterou a forma esférica das mesmas, como pode ser observado na Figura 26 (c, d). Além disso, é possível visualizar o revestimento formado pela presença de PEG.

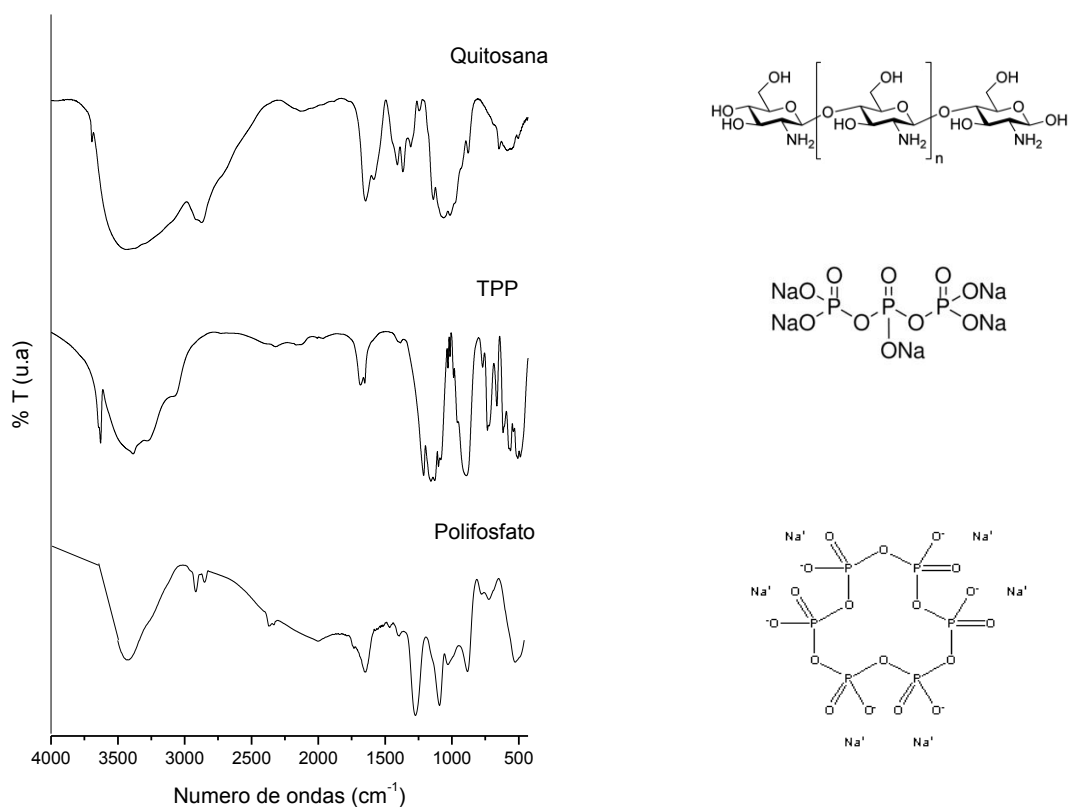
### 5.3.2. Caracterização das nanopartículas por espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier

As amostras de QS, TPP, polifosfato, PEG e nanopartículas foram analisadas por espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier.

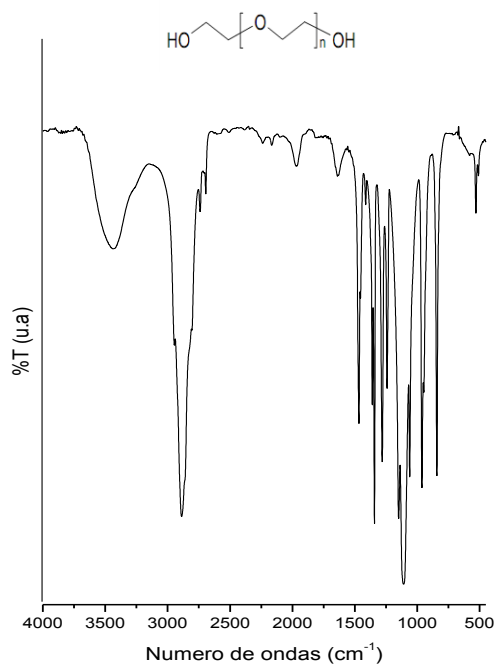
O espectro da QS (Figura 27) apresenta as bandas em  $3444\text{ cm}^{-1}$  do estiramento O-H sobreposta a de N-H e as bandas em  $1657$  e  $1587\text{ cm}^{-1}$  que correspondem, respectivamente, às vibrações de estiramento C=O de amida secundária, sendo uma contribuição da quitina, e às vibrações de deformação de intensidade média N-H de amina primária. Atribui-se a banda em  $1385\text{ cm}^{-1}$  à deformação assimétrica de C-H do grupo  $\text{CH}_3$  referente ao grupo acetamido ainda presente na cadeia polimérica em pequena proporção, visto que a quitosana não está completamente desacetilada. A banda presente em  $1074\text{ cm}^{-1}$  é atribuída à vibração de estiramento vibracional C-O-C de álcool primário (Figura 25) (MUZZARELLI, 1977; LEE et al., 2001).

O TPP apresentou bandas características na região de  $1151\text{ cm}^{-1}$  relacionada às vibrações de estiramento do grupo fosfato P=O e  $893\text{ cm}^{-1}$  do grupamento P-O-P (WU et al., 2005) e em  $617\text{ cm}^{-1}$  aparecem as vibrações de deformação, como pode ser observado na Figura 28.

No espectro do polifosfato (Figura 27), a banda em  $1271\text{ cm}^{-1}$  é atribuída às unidades ( $\text{PO}_2$ ) referentes aos modos de estiramento assimétrico e simétrico dos oxigênios não ligados de um fósforo do meio da cadeia. A banda em  $1094\text{ cm}^{-1}$  é atribuída à vibração de estiramento do grupo P-O- do término da cadeia do polifosfato e é também chamada de frequência de estiramento iônico (COULTHUP, 1950). A banda em  $1020\text{ cm}^{-1}$  é atribuída aos grupos  $\text{PO}_3$  terminais da cadeia de fosfato. A banda em  $877\text{ cm}^{-1}$  é atribuída ao estiramento assimétrico dos modos P-O-P linear do meio da cadeia e a posição dessa banda é fortemente influenciada pelo grau de condensação do fosfato. As bandas na região de  $713$  e  $768\text{ cm}^{-1}$  são atribuídas a vibrações de estiramento simétrico dos grupos P-O-P. E, finalmente, a banda em torno de  $523\text{ cm}^{-1}$  é atribuída à deformação dos modos P-O no  $\text{PO}_4^{3-}$ .

**Figura 27** - Espectros de absorção na região do infravermelho da quitosana, TPP e polifosfato.

No espectro de infravermelho do PEG (Figura 28) observa-se uma banda larga e intensa em  $3427\text{ cm}^{-1}$  devido aos grupos hidroxila terminais da cadeia do PEG associados por pontes de hidrogênio, uma banda intensa em  $2882\text{ cm}^{-1}$  relacionada ao estiramento vibracional de C-H, uma banda em  $1634\text{ cm}^{-1}$  atribuído ao estiramento vibracional do C=O, uma banda em  $1470\text{ cm}^{-1}$  e  $1340\text{ cm}^{-1}$  característico de estiramento vibracional de C-H, uma banda em  $1281\text{ cm}^{-1}$  e  $1238\text{ cm}^{-1}$  atribuído a flexão vibracional de O-H e uma banda intensa em  $1106\text{ cm}^{-1}$  devido ao estiramento assimétrico C-O-C (DHANALAKSHMI, VIJAYALAKSHMI, NARAYANAN, 2012; WANG et al., 2008). As bandas em  $843$ ,  $1280$  e  $947\text{ cm}^{-1}$  podem ser atribuídas as contribuições das regiões cristalinas do PEG.

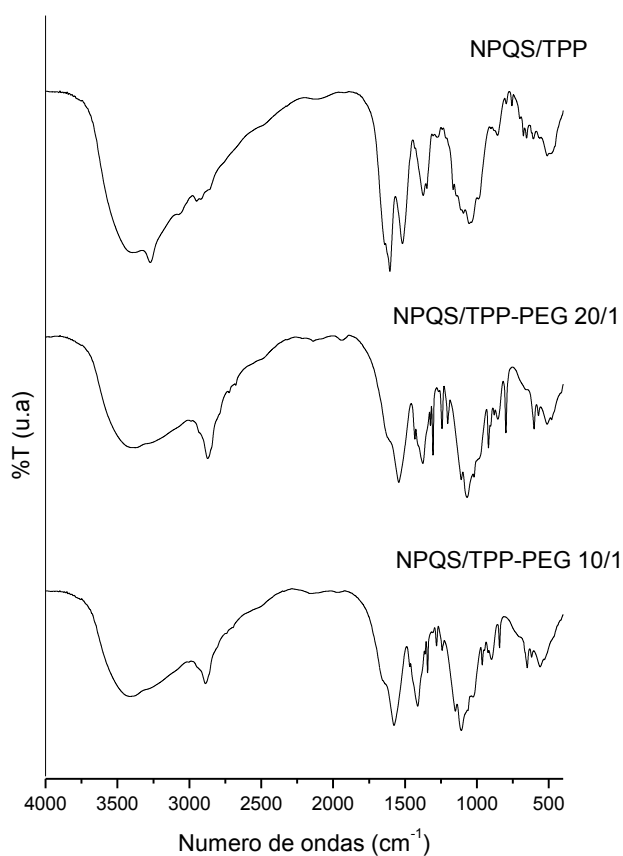
**Figura 28** - Espectro de absorção na região do infravermelho do PEG.

As nanopartículas também foram analisadas por espectroscopia de infravermelho. Nos espectros das nanopartículas com TPP (Figura 29), o estiramento O-H sobrepõe o de N-H da QS, além de aumentar e deslocar para  $3411\text{ cm}^{-1}$ , o que pode indicar a reticulação da QS com TPP através de ligações de hidrogênio (SARMENTO et al., 2006). As bandas de amida II em  $1650\text{ cm}^{-1}$  e  $1587\text{ cm}^{-1}$  do espectro da QS é modificada, e duas novas bandas surgem nas NPQS/TPP, uma banda em  $1643\text{ cm}^{-1}$  e outra em  $1541\text{ cm}^{-1}$ . As bandas de amida II correspondentem a C=O e N-H e o alargamento e deslocamento dessas bandas pode caracterizar a formação das nanopartículas, o que pode indicar que a QS pode estar envolvida em ligações cruzadas com grupos fosfato do TPP por meio de interações eletrostáticas (LAMEIRO et al., 2006).

Nos espectros das nanopartículas NPQS/TPP-PEG (Figura 29), observa-se que as bandas referentes às amidas da quitosana apresentaram deslocamento após funcionalização com PEG, deslocando-se para  $3450\text{--}3443\text{ cm}^{-1}$ . Outra região importante do espectro destas nanopartículas são as vibrações do estiramento axial C-O-C que, após adição do PEG, passa a apresentar valores mais elevados em  $1110\text{ cm}^{-1}$ . Outro ponto importante que sugere a interação entre QS e PEG é o desaparecimento do pico em  $1650\text{ cm}^{-1}$  após a adição de PEG,

sugerindo interações intermoleculares entre QS e PEG atribuídos a ligações de hidrogênio (JIANG; HAN, 1998).

**Figura 29** - Espectros de absorção na região do infravermelho da NPQS/TPP e NPQS/TPP-PEG.



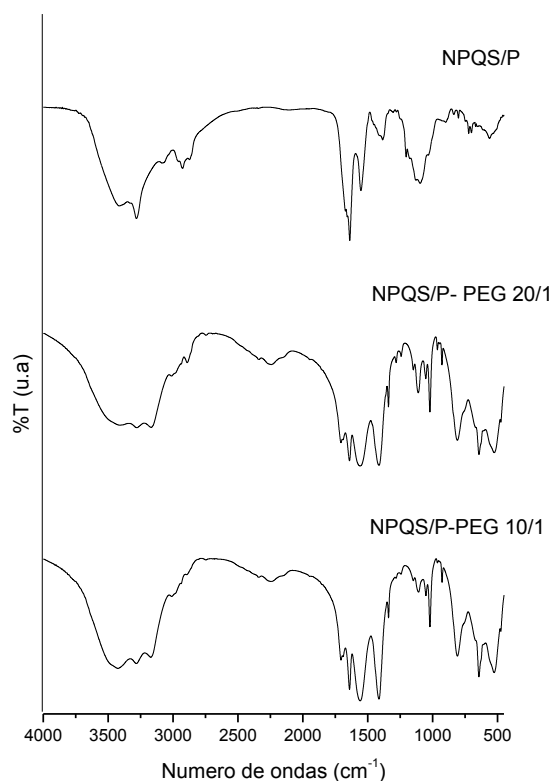
A Tabela 14 mostra os principais grupos químicos e bandas das nanopartículas de quitosana e nanopartículas de quitosana modificadas com PEG.

**Tabela 14** - Principais grupos químicos e bandas das NPQS/TPP e NPQS/TPP-PEG.

Grupamentos	Bandas		
	NPQS/TPP	NPQS/TPP-PEG 20/1	NPQS/TPP-PEG 10/1
O-H; N-H	3411 cm <sup>-1</sup>	3450 cm <sup>-1</sup>	3453 cm <sup>-1</sup>
C-H (Est. axial)	3280 cm <sup>-1</sup>	2885 cm <sup>-1</sup>	2878 cm <sup>-1</sup>
Amida II	1587 cm <sup>-1</sup>	1580 cm <sup>-1</sup>	1578 cm <sup>-1</sup>
C-O (Est. Axial)	1080 cm <sup>-1</sup>	1110 cm <sup>-1</sup>	1139 cm <sup>-1</sup>

No espectro da nanopartícula com polifosfato apresentada na Figura 30, a banda de O-H e N-H também se desloca e aumenta para  $3427\text{ cm}^{-1}$ , o que pode indicar a reticulação da QS com PP através de ligações de hidrogênio. As bandas de amida para NPQS/P surgem em  $1643\text{-}1549\text{ cm}^{-1}$ . O alargamento dessas bandas pode caracterizar a formação das nanopartículas, indicando a interação entre a QS e o polifosfato (LAMEIRO et al., 2006).

Nos espectros de nanopartículas de NPQS/P-PEG apresentados na Figura 30, é possível observar bandas referentes às amidas I e II e o deslocamento da banda de O-H para valores maiores em  $3477\text{ cm}^{-1}$  para a maior proporção de PEG e  $3459\text{ cm}^{-1}$  para a menor proporção de PEG. Este deslocamento pode ser associado às novas ligações de hidrogênio intermoleculares entre os grupos OH do PEG e da QS. As nanopartículas de NPQS/P-PEG também apresentaram vibrações do estiramento axial C-O-C que, após a adição da maior proporção de PEG, passou a apresentar valores mais elevados em  $1110\text{ cm}^{-1}$ . Este deslocamento pode ser atribuído às interações intermoleculares entre QS e PEG atribuídos a ligações de hidrogênio das bandas de O-H. (JIANG; HANG, 1998; ZHAN et al., 2009).

**Figura 30** - Espectro de absorção na região do infravermelho da NPQS/P e NPQS/P-PEG.

A Tabela 15 mostra as atribuições das bandas do PEG e os principais grupos químicos e bandas das nanopartículas NPQS/P e NPQS/P-PEG.

**Tabela 15** - Principais grupos químicos e bandas das NPQS/P e NPQS/P-PEG.

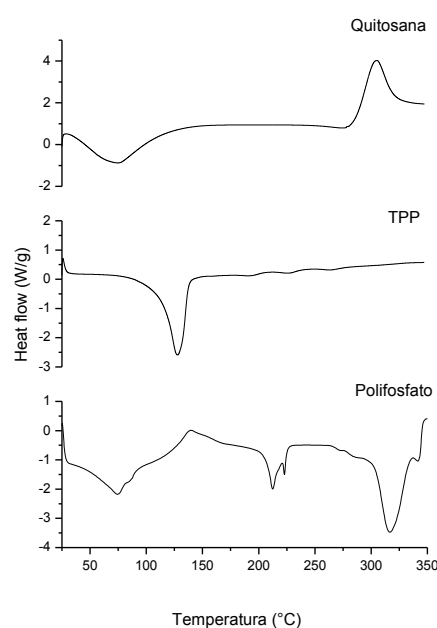
Grupamentos	Bandas		
	NPQS/P	NPQS/P-PEG 20/1	NPQS/P-PEG 10/1
O-H; N-H	3427 cm <sup>-1</sup>	3477 cm <sup>-1</sup>	3469 cm <sup>-1</sup>
C-H (Est. axial)	2868 cm <sup>-1</sup>	2984 cm <sup>-1</sup>	2992 cm <sup>-1</sup>
Amida II	1549 cm <sup>-1</sup>	1554 cm <sup>-1</sup>	1553 cm <sup>-1</sup>
C-O (Est. Axial)	1074 cm <sup>-1</sup>	1110 cm <sup>-1</sup>	1110 cm <sup>-1</sup>

### 5.3.3. Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

Os estudos de DSC foram realizados para compreender o comportamento térmico e as interações químicas entre a quitosana reticulada com TPP ou polifosfato que levam à formação das nanopartículas e o que ocorre após o revestimento destas nanopartículas com PEG.

O termograma da quitosana (Figura 31) apresenta um evento endotérmico a 75,41 °C com entalpia de fusão ( $\Delta H$ ) de 145,2 J.g<sup>-1</sup> (Tabela 15) correspondente à sua desidratação (água associada a grupos hidrofílicos do polímero) e um segundo evento endotérmico (302,84 °C) relacionado com a decomposição térmica do material (Figura 31) devido à desidratação e às reações de despolimerização, mais provavelmente à descarboxilação parcial dos grupos carboxílicos e reações de oxidação dos polieletrólitos (BHUMKAR; POKHARKAR, 2006; KITTUR et al., 2002; PIKAL; RIGSBEE, 1997; SARMENTO et al., 2006).

A curva DSC do TPP (Figura 31) mostrou um evento endotérmico a 127,92 °C com entalpia de fusão de 122 J.g<sup>-1</sup> característico da fusão do TPP e dois eventos exotérmicos entre 200 °C e 240 °C característicos da degradação do TPP. A curva DSC do polifosfato (Figura 31) mostra três eventos endotérmicos, o primeiro em 74,60 °C corresponde à perda de água, o segundo em 212,40 °C com entalpia de fusão ( $\Delta H$ ) de 29,11 J.g<sup>-1</sup> e o terceiro em 316 °C com entalpia de fusão de 81,27 J.g<sup>-1</sup> correspondente às reações de condensação das cadeias do polifosfato envolvidos por grupos hidroxila (Tabela 16) (KOPP et al., 2006).

**Figura 31** - Curva DSC da quitosana, TPP e polifosfato.

A Tabela 16 apresenta os resultados de DSC da QS, TPP e polifosfato.

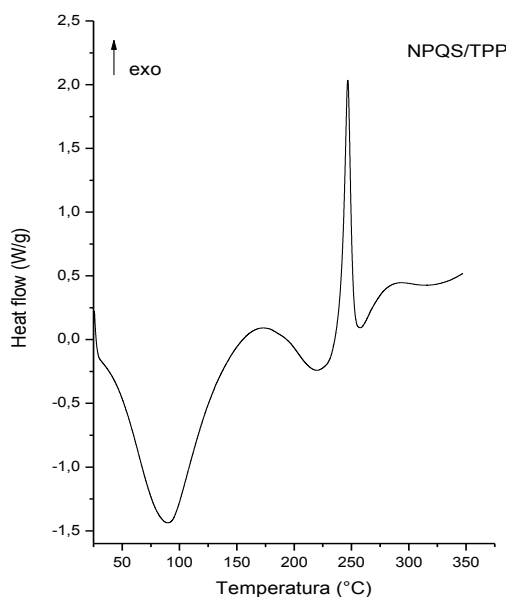
**Tabela 16** - Valores de  $T_{onset}$  ( $^{\circ}\text{C}$ ),  $T_{pico}$  ( $^{\circ}\text{C}$ ) e Entalpia ( $\Delta H$ ) ( $\text{J}\cdot\text{g}^{-1}$ ) de DSC da quitosana, TPP e polifosfato.

Amostras	$T_{Onset}$ ( $^{\circ}\text{C}$ )	$T_{pico}$ ( $^{\circ}\text{C}$ )	Entalpia ( $\Delta H$ ) ( $\text{J}\cdot\text{g}^{-1}$ )
Quitosana	35,66	75,41	145,2
	285,52	302,84	118,3
Tripolifosfato	113,03	127,92	122,00
	196,09	204,39	2,909
Polifosfato	229,22	239,00	3,864
	27,19	74,60	174,97
Polifosfato	205,88	212,40	29,11
	303,25	316,45	81,27

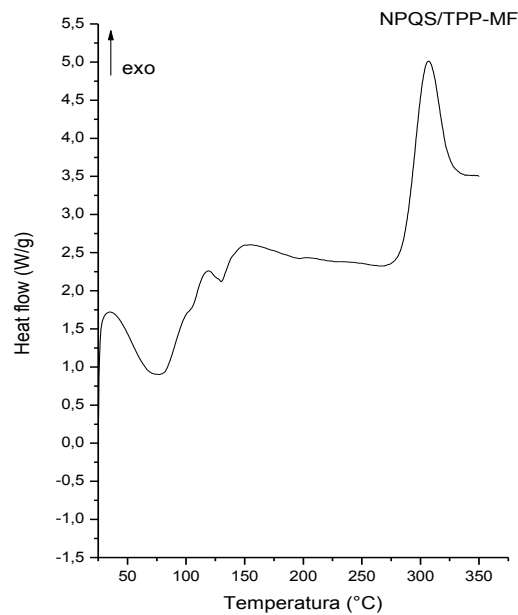
A curva DSC das nanopartículas NPQS/TPP (Figura 32) apresentou um evento endotérmico em  $90,50^{\circ}\text{C}$  com entalpia de  $280,2 \text{ J}\cdot\text{g}^{-1}$  que está relacionado com a perda de água (BHUMKAR; POKHARKAR, 2006; WAN et al., 2003). O segundo pico exotérmico entre  $240$  e  $266^{\circ}\text{C}$  das nanopartículas corresponde ao evento de decomposição térmica das

nanopartículas em temperaturas menores que a QS devido à diminuição do grau de cristalinidade das nanopartículas (PATI; ADHIKARI; DHARA, 2011).

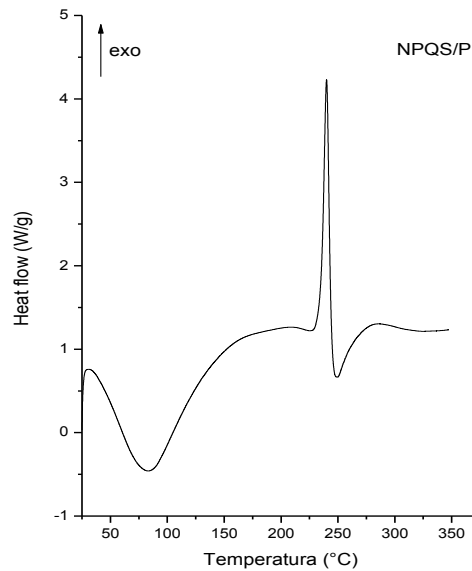
**Figura 32** - Curva DSC da NPQS/TPP.



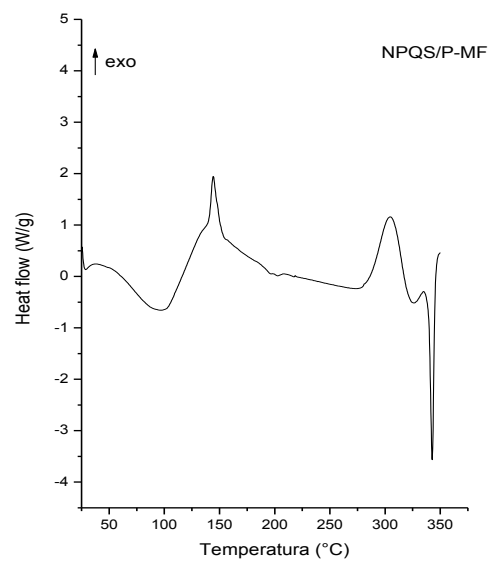
Ao analisarmos a curva DSC da mistura física (Figura 33) formada por QS e TPP nas mesmas concentrações utilizadas no desenvolvimento das NPQS/TPP, observamos a contribuição de cada material, em que o primeiro evento endotérmico está relacionado à desidratação da quitosana em torno de 77 °C. Além disso, observamos um evento endotérmico em 127 °C que está relacionado com a fusão do TPP. Nas nanopartículas este pico não é evidenciado, o que significa que o reticulante está disperso de forma homogênea e interagindo totalmente com a QS. O terceiro evento exotérmico em torno de 304 °C observado para a mistura física está relacionado à decomposição térmica da QS devido à sua desidratação e despolimerização.

**Figura 33** - Curva DSC da NPQS/TPP-MF.

Na curva DSC da nanopartícula NPQS/P (Figura 34), os eventos endotérmicos apresentaram diferentes entalpias de fusão e diminuição do grau de cristalinidade, sugerindo que houve a formação de estruturas diferentes das nanopartícula preparadas com TPP (Tabela 16) (PATI; ADHAKIRI; DHARA, 2011).

**Figura 34** - Curva DSC da NPQS/P.

A curva DSC da mistura física NPQS/P-MF (Figura 35) mostra que não há interação entre os materiais, uma vez que é possível evidenciar a contribuição de cada material.

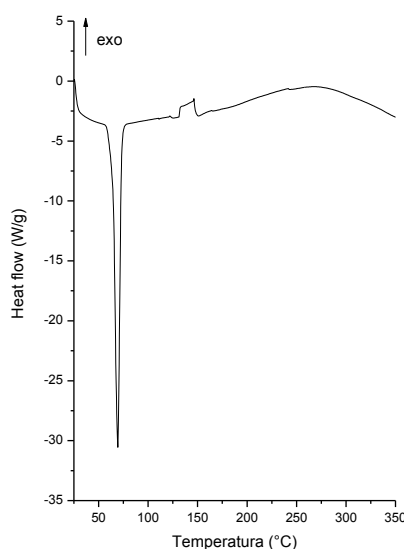
**Figura 35** - Curva DSC da NPQS/P-MF.

A Tabela 17 apresenta os resultados de DSC das nanopartículas NPQS/TPP e NPQS/P e misturas físicas.

**Tabela 17** - Valores de  $T_{onset}$  ( $^{\circ}\text{C}$ ),  $T_{pico}$  ( $^{\circ}\text{C}$ ) e Entalpia ( $\Delta H$ ) ( $\text{J}\cdot\text{g}^{-1}$ ) de DSC da NPQS/TPP, NPQS/P e misturas físicas.

Amostras	$T_{onset}$ ( $^{\circ}\text{C}$ )	$T_{pico}$ ( $^{\circ}\text{C}$ )	Entalpia ( $\Delta H$ ) ( $\text{J}\cdot\text{g}^{-1}$ )
NPQS/TPP	43,47	90,50	280,2
	240,76	246,73	51,75
NPQS/TPP-MF	38,73	67,36	86,74
	120,02	130,25	7,58
NPQS/P	286,68	303,97	108,11
	38,78	83,49	206
NPQS/P-MF	234,97	240,13	57,26
	47,64	95,48	146,17
NPQS/P-MF	285,65	305,74	92,34
	339,20	342,60	41,10

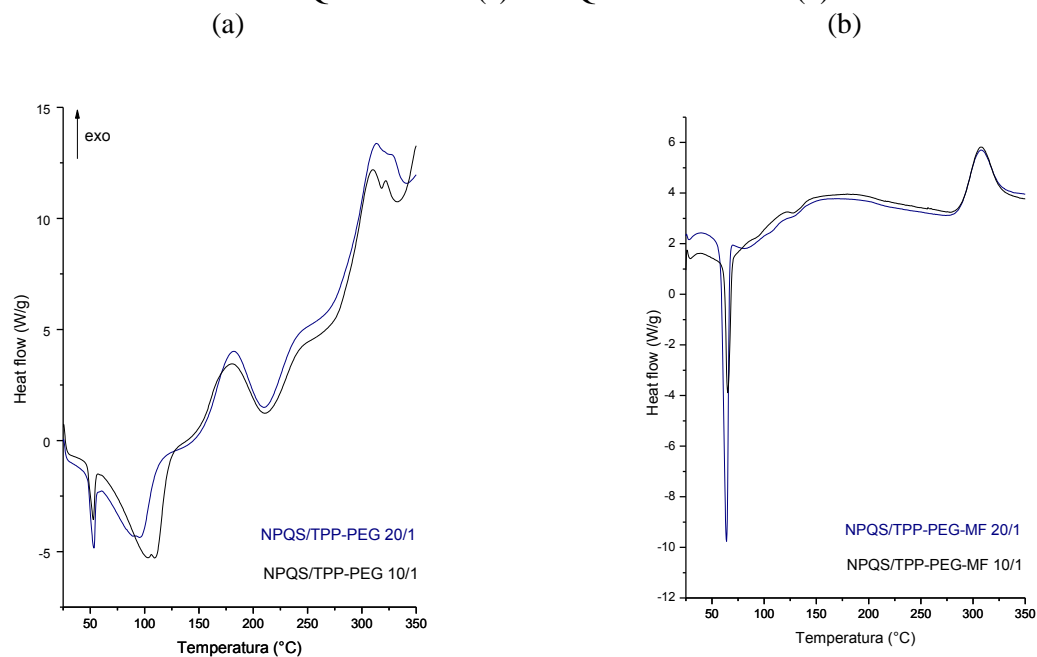
Para compreender a interação química do PEG com as nanopartículas de quitosana, seu comportamento térmico também foi avaliado. Como pode ser observada na Figura 36, a curva DSC do PEG apresentou um pico endotérmico em  $68,37^{\circ}\text{C}$  com entalpia de  $216,21 \text{ J}\cdot\text{g}^{-1}$  que está associado à fusão deste polímero.

**Figura 36** - Curva DSC do PEG.

A Figura 37 mostra as curvas DSC da NPQS/TPP-PEG 20/1 e 10/1. O pico endotérmico associado à fusão do PEG torna-se mais intenso na medida que a concentração de PEG aumenta, aumentando também a entalpia de fusão ( $42,41 \text{ J.g}^{-1}$  e  $29,18 \text{ J.g}^{-1}$ , respectivamente).

O pico da quitosana ao redor de  $75 \text{ °C}$  deslocou-se para temperaturas mais elevadas nas nanopartículas com PEG, ficando entre  $94 \text{ °C}$  e  $112 \text{ °C}$ , os quais correspondem à sua desidratação. O terceiro evento endotérmico ao redor de  $210 \text{ °C}$  está associado à decomposição térmica das nanopartículas, a qual apresenta-se abaixo da decomposição térmica da quitosana pura ( $302 \text{ °C}$ ) (HE et al., 2009; PIELICHOWSKI; FLEJTUCH, 2002).

Ao analisarmos as curvas DSC da mistura ternária (Figura 37b) formada por QS, TPP e PEG nas mesmas concentrações utilizadas no desenvolvimento das nanopartículas observamos a contribuição de cada material, em que o primeiro evento endotérmico está relacionado à fusão do PEG em torno de  $64 \text{ °C}$  (Tabela 18) e um evento exotérmico em torno de  $307 \text{ °C}$  relacionado à decomposição térmica da QS (GINÉS et al., 1996).

**Figura 37** - Curvas DSC da NPQS/TPP-PEG (a) e NPQS/TPP-PEG-MF (b).

A Tabela 18 apresenta os resultados de DSC das nanopartículas NPQS/TPP-PEG com PEG e misturas físicas.

**Tabela 18** - Valores de  $T_{\text{onset}}$  (°C),  $T_{\text{pico}}$  (°C) e Entalpia ( $\Delta H$ ) ( $\text{J}\cdot\text{g}^{-1}$ ) de DSC do PEG, NPQS/TPP-PEG e NPQS/TPP-PEG-MF.

(continua)

Amostras	$T_{\text{onset}}$ (°C)	$T_{\text{pico}}$ (°C)	Entalpia ( $\Delta H$ ) ( $\text{J}\cdot\text{g}^{-1}$ )
PEG	63,94	68,37	216,21
	47,88	53,19	42,41
NPQS/TPP-PEG 20/1	93,01	96,51	232,40
	186,08	210,58	275,69
NPQS/TPP-PEG 10/1	47,11	52,68	29,18
	106,92	109,39	397,87
NPQS/TPP-PEG-MF 20/1	186,07	212,03	250,73
	58,53	63,69	104,08
	289,09	307,57	83,01

**Tabela 18** - Valores de  $T_{\text{onset}}$  ( $^{\circ}\text{C}$ ),  $T_{\text{pico}}$  ( $^{\circ}\text{C}$ ) e Entalpia ( $\Delta H$ ) ( $\text{J}\cdot\text{g}^{-1}$ ) de DSC do PEG, NPQS/TPP-PEG e NPQS/TPP-PEG-MF.

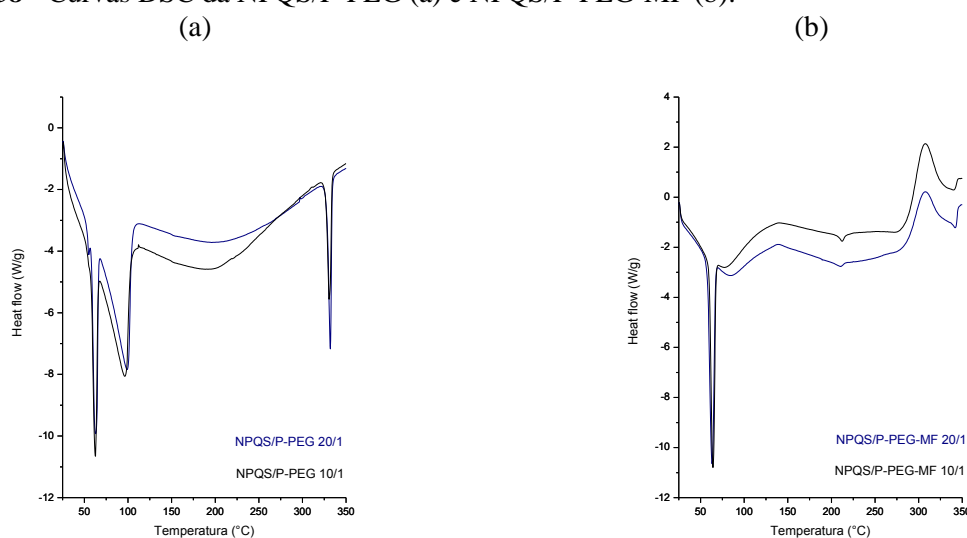
(conclusão)

Amostras	$T_{\text{onset}}$ ( $^{\circ}\text{C}$ )	$T_{\text{pico}}$ ( $^{\circ}\text{C}$ )	Entalpia ( $\Delta H$ ) ( $\text{J}\cdot\text{g}^{-1}$ )
	61,90	64,88	59,56
<b>NPQS/TPP-PEG-MF 10/1</b>	121,70	128,80	4,36
	289,85	307,36	97,67

Os eventos observados nas misturas físicas são diferentes dos observados nas nanopartículas, confirmando que ocorreram interações intermoleculares entre a QS e o PEG levando à formação de um novo material.

A Figura 38 mostra a NPQS/P-PEG, que também apresenta dois picos endotérmicos associados à fusão do PEG em  $62^{\circ}\text{C}$  e outro pico ao redor de  $99^{\circ}\text{C}$  e  $109^{\circ}\text{C}$ , correspondente à desidratação da QS. O terceiro evento endotérmico ao redor de  $330^{\circ}\text{C}$  corresponde a um processo de cristalização que ocorre juntamente com o processo de condensação do polifosfato (HE et al., 2009; PIELICHOWSKI; FLEJTUCH, 2002). A mistura física da NPQS/P-PEG-MF (Figura 38), também apresentaram os eventos térmicos de cada material.

**Figura 38** - Curvas DSC da NPQS/P-PEG (a) e NPQS/P-PEG-MF (b).



A Tabela 19 apresenta os resultados de DSC das nanopartículas NPQS/P-PEG e mistura física.

**Tabela 19** - Resultados de DSC da NPQS/P-PEG e NPQS/P-PEG-MF.

Amostras	T <sub>onset</sub> (°C)	T <sub>pico</sub> (°C)	Entalpia ( $\Delta H$ ) (J.g <sup>-1</sup> )
NPQS/P-PEG 20/1	58,12	62,36	191,96 J/g
	73,65	99,05	458,73 J/g
	327,51	331,54	134,96 J/g
NPQS/P-PEG 10/1	57,58	62,17	217,58 J/g
	70,93	96,38	461,63 J/g
	326,59	330,15	126,25 J/g
NPQS/P-PEG-MF 20/1	57,94	62,84	72,74 J/g
	70,64	86,39	24,00 J/g
	287,37	307,18	81,27 J/g
NPQS/P-PEG-MF 10/1	59,82	63,83	61,67 J/g
	288,24	307,13	99,98 J/g

#### 5.4. Avaliação da encapsulação dos peptídeos cRGDfV e cRGDfK nas nanopartículas de quitosana sem e com modificações com PEG

##### 5.4.1. Caracterização estrutural dos peptídeos cRGDfV e cRGDfK

As principais técnicas para caracterização empregadas para a determinação de alterações na estrutura secundária de peptídeos e proteínas é a espectroscopia de dicroísmo circular e a espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier. As técnicas foram empregadas para avaliar se houve alterações na estrutura do cRGDfV e cRGDfK na presença dos componentes que serão utilizados para o desenvolvimento das nanopartículas onde estes inibidores de integrinas serão encapsuladas.

##### 5.4.1.1. Espectroscopia de dicroísmo circular

A técnica de dicroísmo circular leva em conta a estereoquímica da molécula e baseia-se na determinação da diferença na absorvância da luz circularmente polarizada à

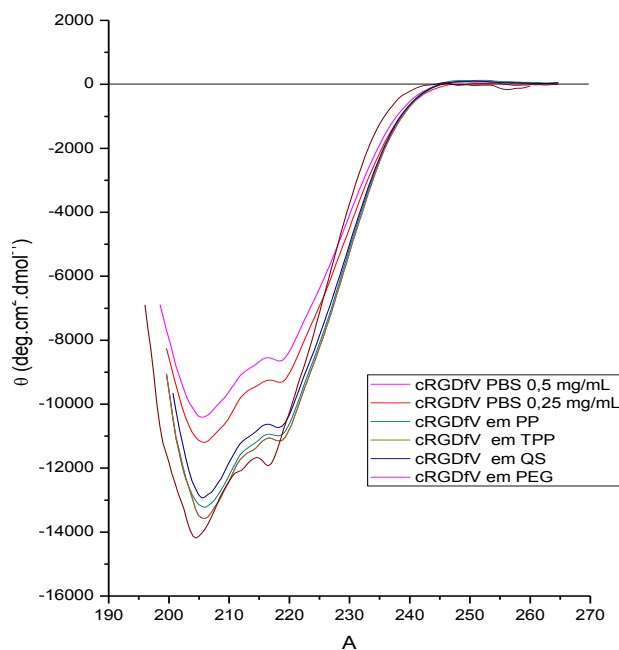
esquerda e à direita em função do comprimento de onda, e pode ser aplicado a qualquer composto opticamente ativo que tenha um cromóforo que, no caso dos peptídeos e proteínas, é a ligação amida (DRAKE, 2001). No caso de proteínas e peptídeos, os cromóforos responsáveis pelo espectro de CD estão na região do ultravioleta (UV), nos comprimentos de onda de 190 a 260 nm, que corresponde à absorção das ligações amida da cadeia peptídica dos resíduos aromáticos de triptofano, tirosina, fenilalanina e das pontes de dissulfeto. Sendo assim, as diferentes conformações de proteínas/peptídeos ( $\alpha$ -hélice, folha  $\beta$ , folha  $\beta$  paralela, folha  $\beta$  antiparalela e randômica) apresentam um espectro típico de CD (DRAKE, 2001).

A espectroscopia de CD foi realizada com o objetivo de determinar se não ocorreram mudanças na estrutura secundária dos inibidores de integrinas após solubilização nos componentes das nanopartículas. A avaliação da estrutura secundária contribui para a estabilização da conformação global da proteína e avaliação da estabilidade. Através dos espectros obtidos foi possível avaliar se ocorreram alterações estruturais, alteração da estabilidade dos fragmentos da proteína, assim como a integridade das mesmas (KELLY; PRICE, 2000; VOLODKIN et al., 2007).

O cRGDfV e o cRGDfK foram avaliadas em tampão fosfato e após a solubilização nos componentes das nanopartículas, que foram a quitosana, TPP, polifosfato e PEG (Figura 39), os espectros de CD e as porcentagens conformacionais foram obtidos pelo software CDNN 2.1.

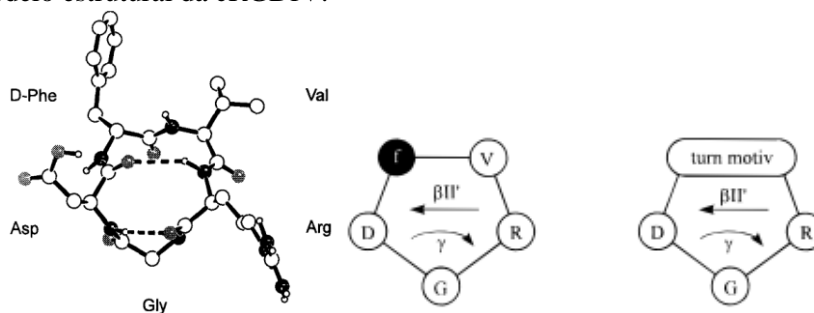
Os espectros de CD do peptídeo cRGDfV de cadeia cíclica mostrado na Figura 40 abaixo, mostrou uma banda negativa com intensidade variável entre 200 e 205 nm, acompanhado de um ombro em torno de 220 nm. A banda negativa próxima de 200 nm é de estrutura com elevado conteúdo de estrutura randômica e folhas- $\beta$  antiparalelas conectadas por uma volta- $\beta$  (LIU et al., 2006). Quando o peptídeo foi solubilizado em QS, houve um deslocamento dos picos. Este fato é referente à estrutura da quitosana que tem amida presentes em sua estrutura, e as amidas são cromóforos e podem ser detectadas pelo espectro de dicroísmo circular.

**Figura 39** - Espectro de dicroísmo circular de cRGDfV em solução de quitosana, TPP, polifosfato e PEG.



A Figura 40 mostra a estrutura do ciclopeptídeo cRGDfV. A estrutura da sequência RGD está exposta na ponta de um loop flexível, em uma cadeia estendida na borda de uma folha- $\beta$ . É possível observar o arranjo do peptídeo com o aminoácido fenilalanina na posição D (estereoisômero) na posição volta- $\beta$  II'.

**Figura 40** - Modelo estrutural da cRGDfV.



Fonte: KESSLER et al., 1995.

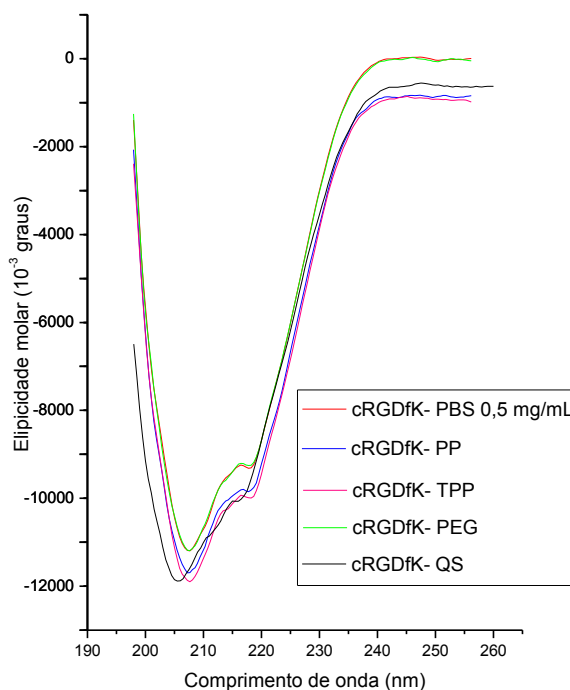
A deconvolução do espectro do cRGDfV foi feita através do software CDNN 2.1. A Tabela 20, mostra o conteúdo conformacional do cRGDfV solubilizado em TPP, polifosfato, PEG e QS.

**Tabela 20.** Deconvolução dos espectros da cRGDfV em TPP, polifosfato, PEG e quitosana.

<b>Estruturas</b>	<b>cRGDfV-PBS</b>	<b>cRGDfV-TPP</b>	<b>cRGDfV-PP</b>	<b>cRGDfV-QS</b>	<b>cRGDfV-PEG</b>
	<b>(%)</b>	<b>(%)</b>	<b>(%)</b>	<b>(%)</b>	<b>(%)</b>
<b><math>\alpha</math>-Hélice</b>	13,9	17,3	16,9	16,7	19,4
<b>Antiparalelo</b>	19,8	14,8	15,2	15,7	12,0
<b>Paralelo</b>	4,8	4,5	4,5	4,6	4,3
<b>Volta-<math>\beta</math></b>	25	26,3	26,3	26,9	27,5
<b>Randômica</b>	36,8	36,3	36,4	36,3	35,8

Os espectros de CD do peptídeo cRGDfK mostrado na Figura 41, também apresentam uma banda negativa com intensidade variável entre 200 e 205 nm, acompanhado de um ombro em torno de 220 nm. A banda negativa próxima de 200 nm é de estrutura com elevado conteúdo de estrutura randômica e folhas- $\beta$  antiparalelas conectadas por uma volta- $\beta$ . Quando o peptídeo foi solubilizado em QS, houve um deslocamento dos picos devido as amidas presentes que são cromóforos e podem ser detectadas pelo espectro de dicroísmo circular.

**Figura 41** - Espectro de dicroísmo circular de cRGDfK em solução de quitosana, TPP, polifosfato e PEG.



A deconvolução do espectro do cRGDfK feito através do software CDNN 2.1. A Tabela 21, mostra o conteúdo conformacional do cRGDfK solubilizado em TPP, polifosfato, PEG e QS.

**Tabela 21.** Deconvolução dos espectros da cRGDfK em TPP, polifosfato, PEG e quitosana.

Estruturas	cRGDfK-PBS (%)	cRGDfK-TPP (%)	cRGDfK-PP (%)	cRGDfK-QS (%)	cRGDfK-PEG (%)
<b><math>\alpha</math>-Hélice</b>	12,8	12,8	12,8	12,5	19,4
<b>Antiparalelo</b>	17,9	18,0	18,5	18,8	12,0
<b>Paralelo</b>	4,2	4,2	4,3	4,3	4,3
<b>Volta-<math>\beta</math></b>	25,6	25,5	25,3	25,3	27,5
<b>Randômica</b>	39,4	39,4	39,1	39,2	35,8

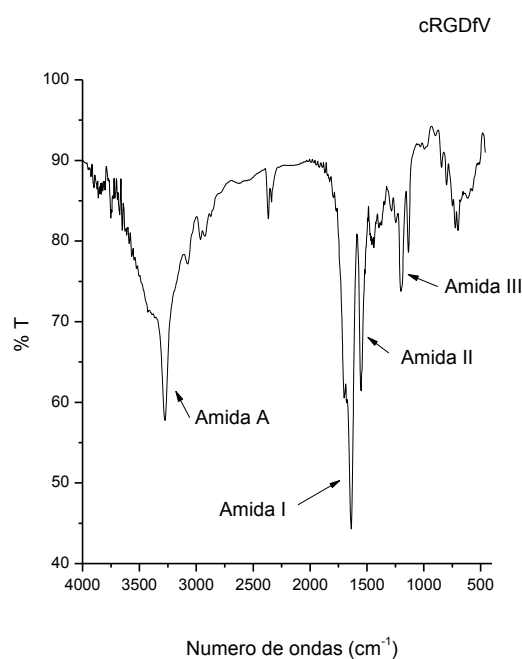
A análise estatística ( $P < 0,05$ ) mostrou que a deconvolução dos espectros de CD do cRGDfV e cRGDfK não apresentaram alterações na estrutura secundária quando solubilizado

na QS, TPP e polifosfato. Os peptídeos apresentaram uma estrutura secundária estável frente aos diferentes componentes utilizados no desenvolvimento das nanopartículas o que garante sua funcionalidade, demonstrando que os peptídeos podem ser encapsulados nas nanopartículas.

#### **5.4.1.2. Caracterização do cRGDfV e cRGDfK por espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier**

A espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier foi usada para auxiliar na análise da estrutura secundária do cRGDfV e cRGDfK e confirmar dados obtidos por dicroísmo circular.

O espectro de infravermelho do cRGDfV (Figura 42) também apresentou uma banda em  $3246\text{ cm}^{-1}$  relacionada ao estiramento de N-H, o que pode indicar ligações de hidrogênio intra e intermoleculares, devido a presença de aminoácidos na estrutura do cRGDfV. A banda de amida I, observada em  $1635\text{ cm}^{-1}$  está relacionada com o estiramento C-N do grupo amina da arginina, com uma pequena contribuição da deformação angular C-N-H, esta banda está associada com a conformação folha- $\beta$ . Nos dados de CD podemos observar uma elevada porcentagem de estrutura  $\beta$  (paralela, antiparalela e volta- $\beta$ ) do peptídeo (KONG; YU, 2007).

**Figura 42** - Espectro de absorção infravermelho do cRGDfV.

A banda de amida II apresentou um pico em  $1543\text{ cm}^{-1}$  que é uma contribuição da combinação do estiramento N-H e C-N com pequenas contribuições dos estiramentos vibracionais C-O e C-C, esta banda é característica de peptídeos cíclicos (STUART, 1997; SUREWICZ, MANTSCH, 1988).

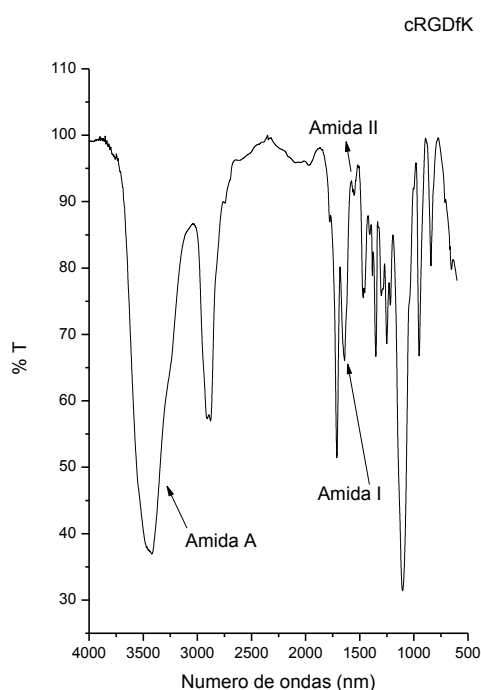
**Tabela 22** - Posição das bandas e picos de amida do cRGDfV.

Descrição	Número de ondas ( $\text{cm}^{-1}$ )	Ligações
Amida A	3246	Estiramento N-H
Amida I	1635	Estiramento C=O
Amida II	1543	Estiramento C-N, Deformação NH

O espectro de infravermelho do cRGDfK (Figura 43) apresentou uma banda intensa em  $3434\text{ cm}^{-1}$  relacionada ao estiramento de N-H, o que pode estar relacionado com a presença do aminoácido lisina na estrutura do cRGDfK. A banda de amida I, observada em  $1626\text{ cm}^{-1}$  está relacionada com o estiramento C=N do grupo amina do aminoácido lisina,

com uma pequena contribuição da deformação angular C-N-H, esta banda está associada com a conformação folha- $\beta$ . Observamos nos dados de CD uma elevada porcentagem de estrutura  $\beta$  (paralela, antiparalela e volta- $\beta$ ) do peptídeo (KONG; YU, 2007).

**Figura 43** – Espectro de absorção na região do infravermelho do cRGDfK.



**Tabela 23.** Posição das bandas e picos de amida da cRGDfK.

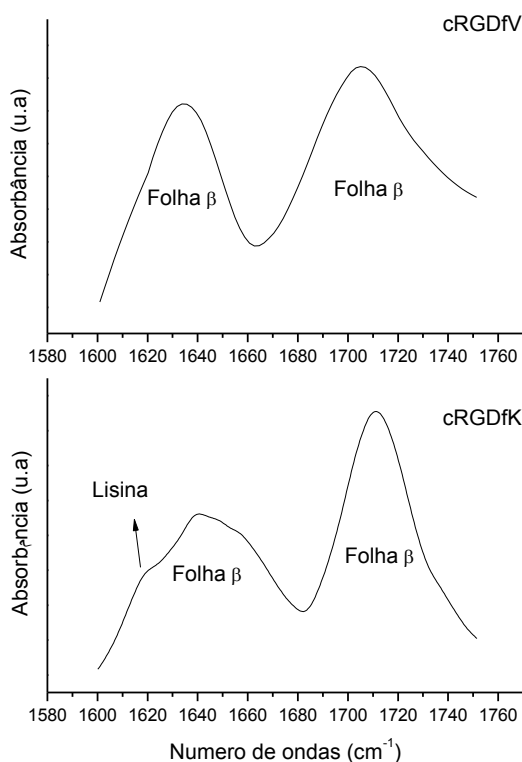
Descrição	Número de ondas (cm <sup>-1</sup> )	Ligações
Amida A	3434	Estiramento N-H
Amida I	1626	Estiramento C=O
Amida II	1534	Estiramento C-N, Deformação NH

As estruturas secundárias de proteínas podem ser analisadas nas bandas de amida I e amida II. No entanto, na de amida II, surgem muitas vezes misturadas as bandas de aminoácidos residuais. Assim, a amida I que corresponde às vibrações de estiramento de C=O do grupo peptídico é mais utilizada para análise de estruturas secundárias de proteínas (BARTH, 2007; BYLER; SUSI, 1986; SUREWICZ; MANTSCH, 1988; STUART, 1997). Nos espectros de segunda derivada foi possível observar as semelhanças entre as estruturas

secundárias do peptídeo cRGDfV e cRGDfK, como mostrado na Figura 44. Além disso, os espectros de segunda derivada com picos claramente resolvidos podem ser associados com a estrutura secundária das desintegrinas ( $\alpha$ -hélice, folha- $\beta$  e voltas- $\beta$ ).

O espectro de infravermelho do cRGDfV e cRGDfK mostraram um pico máximo na banda de amida I em 1634-1639  $\text{cm}^{-1}$  atribuível a um alto conteúdo de folhas- $\beta$ . A segunda banda também indicou a presença de uma estrutura folha- $\beta$  em 1678  $\text{cm}^{-1}$  (ADOCHITEI; DROCHIOIU, 2011).

**Figura 44** - Espectro de absorção na região do infravermelho de segunda derivada do cRGDfV e cRGDfK.



Os resultados do espectro de segunda derivada do infravermelho servem para confirmar os dados obtidos pelo dicroísmo circular e confirmar a similaridade na estrutura secundária do cRGDfV e cRGDfK.

## 5.5. Caracterização físico-química das nanopartículas de quitosana sem e com modificações com PEG após a encapsulação com os peptídeos cRGDfV e cRGDfK

### 5.5.1. Determinação do diâmetro médio, índice de polidispersidade e potencial zeta das nanopartículas

O diâmetro médio, índice de polidispersão e potencial zeta das nanopartículas de quitosana após encapsulação de cRGDfV e cRGDfK também foram determinados pela técnica de espalhamento dinâmico de luz. Os resultados podem ser visualizados na Tabela 24. Observa-se que ambos os peptídeos encapsulados nas nanopartículas com TPP apresentaram diâmetro médios muito próximos, em torno de 159 nm e com baixo índice de polidispersão, o que indica que as nanopartículas são monodispersas. Já as nanopartículas de PP após encapsulação dos inibidores de integrinas apresentaram diâmetros médios e índice de polidispersão maiores que as nanopartículas obtidas com TPP, entretanto mantém-se monodispersas.

Todas as nanopartículas após a encapsulação dos peptídeos mantiveram o potencial zeta elevado e positivo, o que demonstra a boa estabilidade física das nanopartículas, evitando que as mesmas se agreguem.

**Tabela 24** - Diâmetro médio, índice de polidispersão e potencial zeta das nanopartículas com cRGDfV e cRGDfK.

Amostras	Diâmetro Médio (nm) ± DP	PdI	Potencial zeta (mV) ± DP
NPQS/TPP-cRGDfV	159,1 ± 2,90	0,334 ± 0,2	35,0 ± 1,58
NPQS/TPP-cRGfK	157,9 ± 1,33	0,300 ± 0,5	36,2 ± 0,81
NPQS/P-cRGDfV	273,7 ± 17,18	0,40 ± 0,1	41,0 ± 1,25
NPQS/P-cRGDfK	212,8 ± 1,86	0,36 ± 0,08	39,0 ± 1,23

As nanopartículas modificadas com PEG também foram avaliadas quanto ao diâmetro médio, PdI e potencial zeta após incorporação do cRGDfV e cRGDfK.

Na Tabela 25, podemos observar que após adição de PEG nas nanopartículas houve um aumento do diâmetro médio devido ao aumento da cadeia de PEG na superfície das nanopartículas.

**Tabela 25** - Determinação do diâmetro médio, índice de polidispersão e potencial zeta das nanopartículas com PEG.

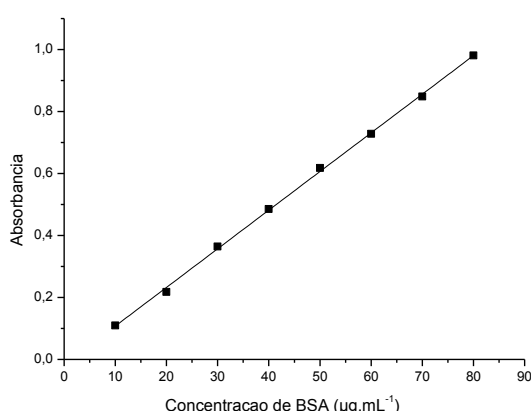
Amostras	Diâmetro médio (nm) ± DP	PdI ± DP	Potencial zeta (mV) ± DP
NPQS/TPP-cRGDfV-PEG 20/1	226,2 ± 3,14	0,438 ± 0,02	29,8 ± 0,693
NPQS/TPP- cRGDfK-01-PEG 20/1	238,5 ± 0,96	0,278 ± 0,02	23,1 ± 0,70
NPQS/P-cRGDfV-PEG 20/1	240,8 ± 3,14	0,458 ± 0,07	29,4 ± 0,584
NPQS/P-cRGDfK-PEG 20/1	248,0 ± 6,30	0,425 ± 0,09	29,5 ± 1,04

### 5.5.2. Avaliação da eficiência de associação do cRGDfV e cRGDfK nas nanopartículas

Para a determinação da quantidade de cRGDfV e cRGDfK nas nanopartículas, a eficiência de associação foi determinada por espectroscopia de ultravioleta a 562 nm utilizando o ensaio de BCA, onde o cRGDfV e cRGDfK livre foram separados das nanopartículas por ultracentrifugação 50,000 ×g durante 15 minutos usando um filtro Amicon Ultra15.

A fim de avaliar a eficiência de associação do cRGDfV e cRGDfK nas nanopartículas NPQS/TPP e NPQS/P, uma curva padrão foi construída a partir de uma solução estoque de 1 mg.mL<sup>-1</sup> de solução de BSA, utilizada como proteína padrão para determinação de outras proteínas.

A curva analítica foi construída nas concentrações de 10-80 µg.mL<sup>-1</sup> de BSA (Figura 45), e a partir da equação da regressão linear obtida, foi possível determinar a concentração de cRGDfV e cRGDfK livres no sobrenadante, que foi determinado pelo ensaio de proteína BCA a 562 nm (CHEN; ZHANG; HUANG, 2007).

**Figura 45** - Curva padrão de BSA, obtida por espectroscopia do UV-visível a 562 nm.

$$y = 0,0125 x + 0,0171; r^2 = 0,9993 \quad (\text{Eq. 5})$$

A Tabela 26 mostra os valores da eficiência de associação das nanopartículas calculados com base na equação 2.

**Tabela 26** - Avaliação da eficiência de associação (EA) do cRGDfV e cRGDfK nas nanopartículas.

Amostras	[peptideo] <sub>livre</sub> (µg.mL <sup>-1</sup> )	[peptideo] <sub>associada</sub> (µg.mL <sup>-1</sup> )	EA (%)
NPQS/TPP-cRGDfV	10,43	989,56	98,95
NPQS/TPP-cRGDfV-PEG 20/1	215,2	784,8	78,48
NPQS/P-cRGDfV	9,73	990,27	99,00
NPQSP-cRGDfV-PEG 20/1	158,4	841,6	84,16
NPQS/TPP-cRGDfK	315,7	684,3	88,43
NPQS/TPP-cRGDfK-PEG 20/1	219,9	780,80	78,08
NPQS/P-cRGDfK	237,5	762,5	86,25
NPQS/P-cRGDfK-PEG 20/1	230,9	769,1	76,91

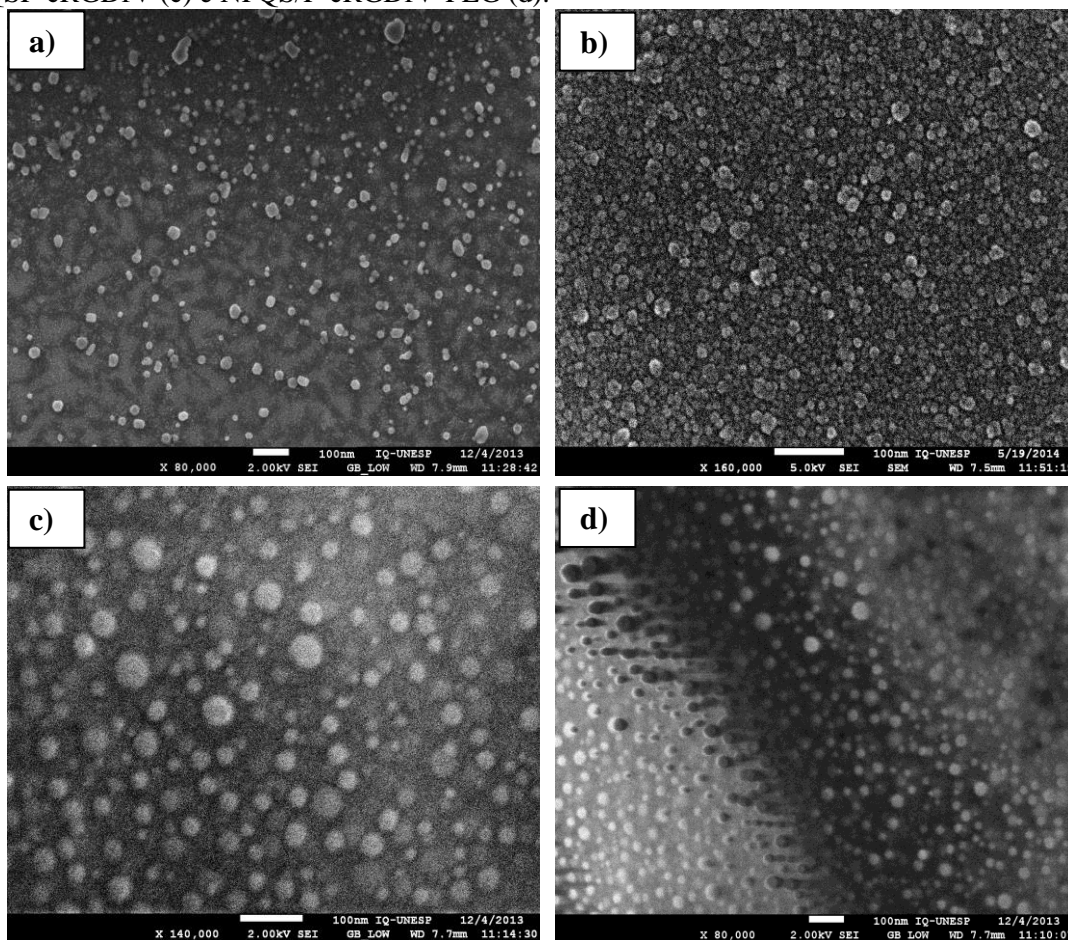
Os resultados obtidos para eficiência de associação neste trabalho variaram em torno de 76-99% para as nanopartículas de QS. Após a adição do PEG as nanopartículas, observamos que a eficiência de associação está em torno de 76-84%, esta diminuição pode ser atribuída as menores interações eletrostáticas entre os inibidores de integrinas com a quitosana devido a presença de PEG que interage com a quitosana, este fato pode ter

contribuído para a diminuição da eficiência de associação do cRGDfV e cRGDfK nas nanopartículas.

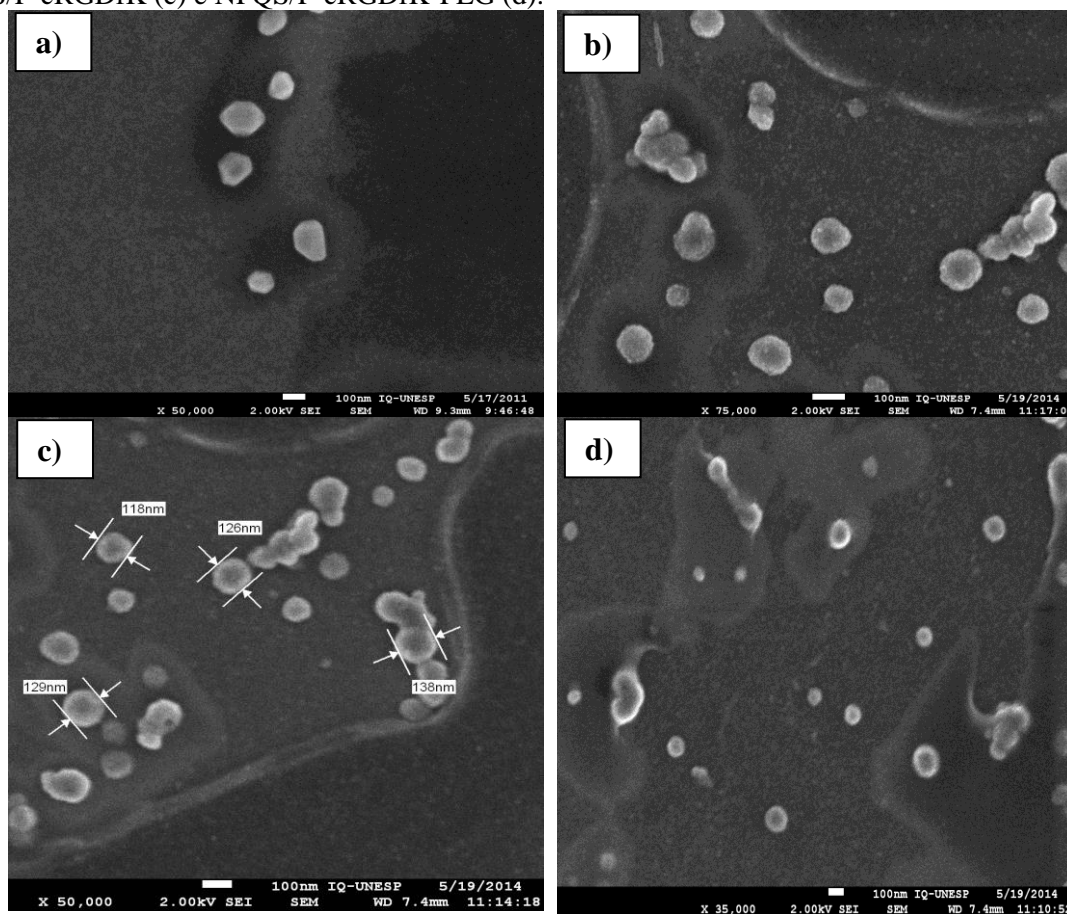
### 5.5.3. Morfologia das nanopartículas de quitosana sem e com modificação de PEG encapsuladas com cRGDfV e cRGDfK por MEV

A análise morfológica das nanopartículas com cRGDfV (Figura 46) e cRGDfK (Figura 47) sem e com PEG apresentaram-se com forma esférica.

**Figura 46** - Fotomicrografias das NPQS/TPP-cRGDfV (a), NPQS/TPP-cRGDfV-PEG (b), NPQSP-cRGDfV (c) e NPQS/P-cRGDfV-PEG (d).



**Figura 47** - Fotomicrografias das NPQS/TPP-cRGDfK (a), NPQS/TPP-cRGDfK-PEG (b), NPQS/P-cRGDfK (c) e NPQS/P-cRGDfK-PEG (d).



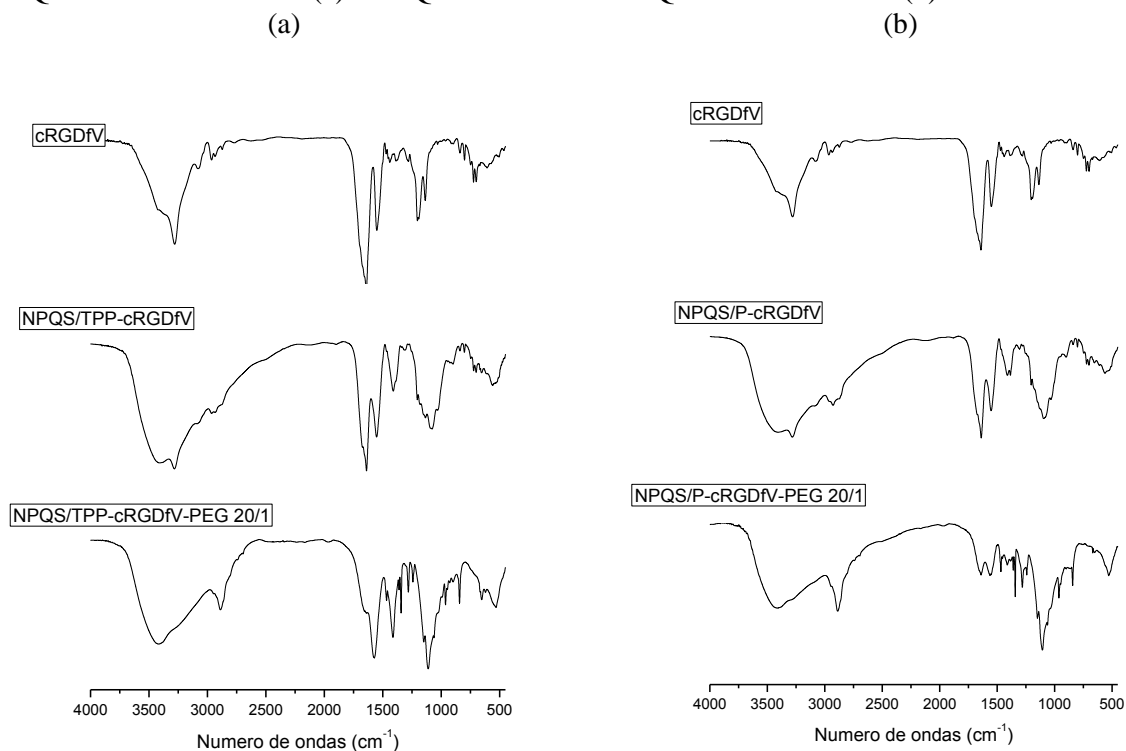
Pode-se concluir que a associação dos peptídeos com as nanopartículas não modificadas e modificadas com PEG não alterou a forma esférica das nanopartículas.

#### 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

Os espectros de nanopartículas de NPQS/TPP e NPQS/P com cRGDfV podem ser visualizados na Figura 48 (a, b), respectivamente. Observar-se que as bandas referentes às amidas da quitosana apresentaram deslocamento da banda de N-H que antes se apresentava em  $3444\text{ cm}^{-1}$  e, após encapsulação de cRGDfV, deslocou-se para  $3411\text{ cm}^{-1}$ , o que pode indicar ligações de hidrogênio intra e intermoleculares do peptídeo com grupamentos amino protonados da quitosana, devido a presença de bandas de amida I e II na estrutura do

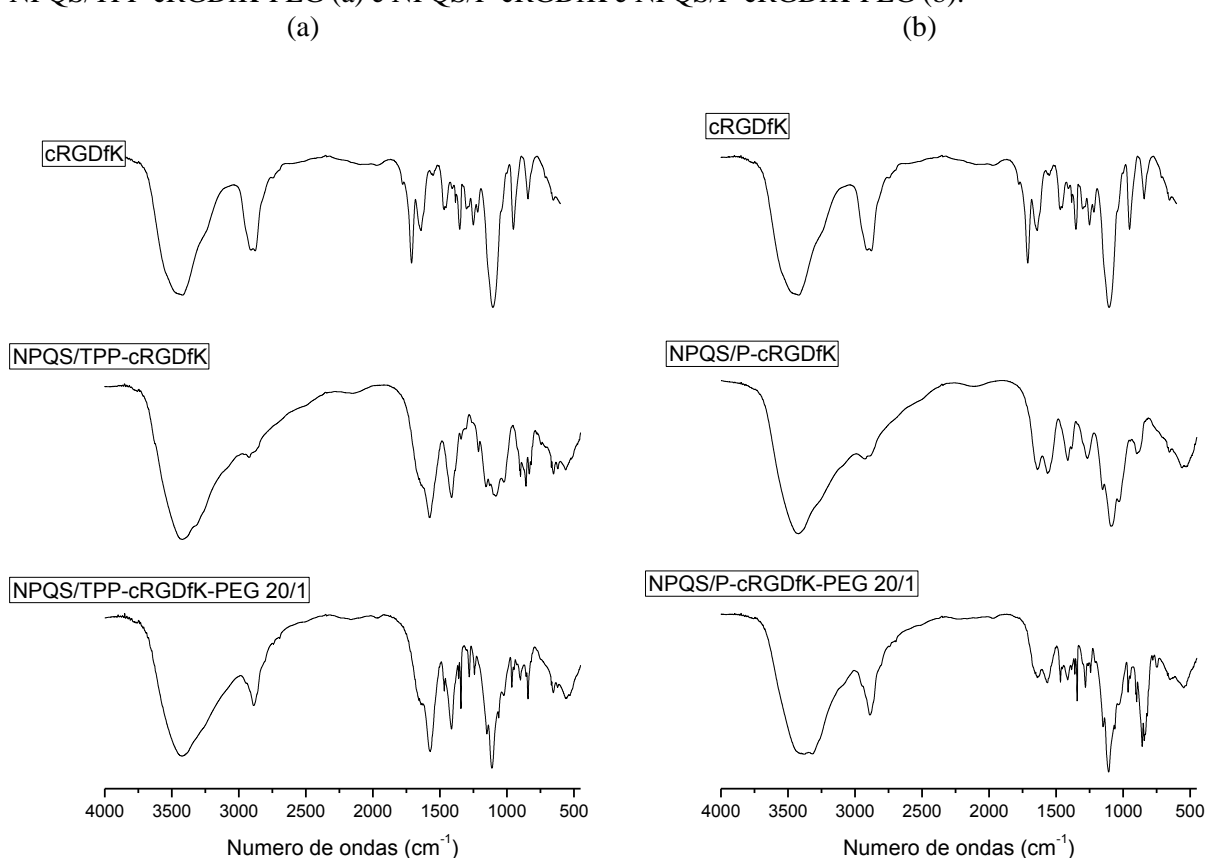
cRGDfV. A banda observada em  $1543\text{ cm}^{-1}$  que é característica de peptídeos cíclicos está relacionada com o estiramento C-N do cRGDfV, esta banda aparece em ambas as nanopartículas com TPP e PP sem e com PEG, o que pode indicar a presença do cRGDfV nas nanopartículas (JIANG; HAN, 1998; YIN et al., 2014).

**Figura 48** - Espectros de absorção na região do infravermelho da NPQS/TPP-cRGDfV e NPQS/TPP-cRGDfV-PEG (a) e NPQS/P-cRGDfV e NPQS/P-cRGDfV-PEG (b).



As nanopartículas com cRGDfK (Figura 49) também apresentaram um deslocamento relacionado ao estiramento do N-H, o que pode indicar ligações de hidrogênio intra e intermoleculares, possivelmente devido a presença de aminoácidos como a arginina, glicina e ácido aspartático presentes na estrutura da cRGDfK ou devido a presença de grupamentos N-H do grupo amino terminal presente no aminoácido lisina. A banda de amida I em  $1633\text{ cm}^{-1}$  está relacionada com o estiramento  $-\text{CONH}-$  do grupo amina e a banda em  $1392\text{ cm}^{-1}$  característico de banda de amida III (ALONSO et al., 1991; CSABA, KÖPING-HÖGGÅRD, ALONSO, 2009). Todas as bandas características da cRGDfK foram observadas nas nanopartículas de TPP e PP sem e com PEG, o que indica que cRGDfK está presente nas nanopartículas (BARTH, 2007; SUREWICZ; MANTSCH, 1988; STUART, 1997).

**Figura 49** - Espectros de absorção na região do infravermelho da NPQS/TPP-cRGDfK e NPQS/TPP-cRGDfK-PEG (a) e NPQS/P-cRGDfK e NPQS/P-cRGDfK-PEG (b).



Em ambos os espectros de NPQS/P com PEG foi observada uma diminuição da intensidade da banda em 1635-1560 cm<sup>-1</sup>, correspondente as bandas de amida I e II do peptídeo.

### 5.5.5. Avaliação da interação das nanopartículas de quitosana com a mucina

As propriedades mucoadesivas da QS e das nanopartículas foram avaliadas pelo monitoramento das interações destes sistemas com a glicoproteína mucina.

A interação entre a quitosana e a mucina é principalmente devido a forças eletrostáticas entre os grupos amino protonados (NH<sup>3+</sup>) do polímero e grupos carregados negativamente da mucina, tais como grupos carboxilato (COO<sup>-</sup>) ou sulfonato (SO<sup>-3</sup>) (ANDREWS, LAVERTY, JONES, 2009; SVENSSON, THURESSON, ARNEBRANT, 2008).

As nanopartículas NPQS/TPP, NPQS/TPP-PEG, NPQS/P e NPQS/P-PEG foram testadas quanto a sua capacidade de se ligar a mucina por meio de interações eletrostáticas entre polímero e mucina, o que pode contribuir para a interação com a mucosa nasal.

A Tabela 27 mostra que todas nanopartículas de quitosana apresentaram excelente habilidade em interagir com a mucina através de forças eletrostáticas formadas entre os grupamentos amina do polissacarídeo e os grupos negativamente carregados da glicoproteína, indicando seu potencial como carreadores mucoadesivos.

As nanopartículas de quitosana podem favorecer a permanência das nanopartícula na mucosa nasal o que pode melhorar a absorção da cRGDfK e do cRGDfV e facilitar a passagem por meio das vias nervosas olfativas que se localizam na porção superior da cavidade nasal, na região olfativa. Devido ao ambiente único do epitélio olfativo, é possível que inibidores de integrinas administradas por via nasal atinjam o SNC através de mecanismos de transporte ao longo dos nervos olfativos. 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 envolvem interação eletrostática entre cargas positivas da quitosana e cargas negativas da superfície endotelial, facilitando a passagem de moléculas proteicas pela BHE (HERVÉ; GHINEA; SCHERMANN, 2008; MAZZARINO et al., 2012).

Após a modificação da superfície das nanopartículas com o PEG, observamos uma redução não significativa nas interações com a mucina, portanto, utilizar estas nanopartículas peguiladas por via nasal ainda seria uma estratégia interessante devido a mucopenetração do PEG na cavidade nasal. As nanopartículas estericamente estabilizadas com PEG tem sido usadas como estratégia para a liberação de peptídeos/proteínas no cérebro (BASTARDO, CLAESSION, BROWN, 2002; WANG et al, 2008; ZHANG, ZHANG, WU, 2008).

**Tabela 27** - Eficiência de ligação das nanopartículas com a mucina.

Amostras	[mucina] <sub>livre</sub> ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	[mucina] <sub>ligada</sub> ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	EL (%)
NPQS/TPP	47,7	952,3	95,23
NPQS/TPP-PEG 20/1	91,5	908,5	90,85
NPQS/P	49,6	950,4	95,04
NPQS/P-PEG 20/1	124,4	875,6	87,56

As nanopartículas modificadas com PEG, com cRGDfV e cRGDfK, também foram avaliadas e os resultados da eficiência de interação estão apresentadas na Tabela 28.

**Tabela 28** - Avaliação da eficiência de ligação das nanopartículas com cRGDfV e cRGDfK com a mucina.

Amostras	[mucina] <sub>livre</sub> ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	[mucina] <sub>ligada</sub> ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	EL (%)
NPQS/TPP-cRGDfV	71,98	1428,02	95,20
NPQS/TPP-cRGDfV-PEG	129,04	1370,96	91,39
NPQS/P-cRGDfV	79,08	1420,92	94,72
NPQS/P-cRGDfV-PEG	126,77	1373,23	91,54
NQS/TPP-cRGDfK	129,31	1370,69	91,37
NPQS/TPP-cRGDfK-PEG	143,54	1356,46	90,43
NPQS/P-cRGDfK	128,48	1371,52	91,43
NPQS/P-cRGDfK-PEG	138,08	1361,92	90,79

Os resultados sugerem que as nanopartículas de quitosana após a encapsulação dos peptídeos continua interagindo com a mucina e esta interação pode estar associada as interações eletrostáticas da QS com a mucina, pois as nanopartículas apresentam carga positiva, enquanto que a mucina no pH testado apresenta-se com carga negativa. Quando PEG é adicionado às nanopartículas não há uma redução significativa da mucoadesão, a interpenetração das cadeias de PEG no muco pode ter contribuído para EL se manter alta mesmo após a adição de PEG. Portanto, o mecanismo de mucoadesão após adição de PEG está associado a sua capacidade de mucopenetração (LAI; WANG; HANES, 2009).

### 5.6. Avaliação do efeito citotóxico, *in vitro*, das nanopartículas de quitosana com e sem modificação de PEG encapsuladas com os peptídeos cRGDfV e cRGDfK sobre células de GBMs

Este estudo abordará os efeitos dos inibidores de integrinas cRGDfV e cRGDfK nas diferentes nanopartículas obtidas frente a citotoxicidade em células de GBMs. Além disso, outro parâmetro importante que será discutido é a internalização e competição com os receptores celulares (integrinas). Será avaliado a interação do cRGDfV e cRGDfK tanto na forma livre quanto em nanopartículas. Serão discutidas as diferenças em termos da

localização dos inibidores nas nanopartículas e quais os principais mecanismos de internalização celular que estão envolvidos nas nanopartículas com e sem modificação com PEG.

### 5.6.1. Avaliação das integrinas $\alpha_v\beta_3$ e $\alpha_v\beta_5$ expressas em células de glioma

Sabe-se que os peptídeos cRGDfV e cRGDfK integram com integrinas  $\alpha_v\beta_3$  e  $\alpha_v\beta_5$ , portanto o objetivo deste estudo é avaliar a expressão destas integrinas em diferentes linhagens de GBMs.

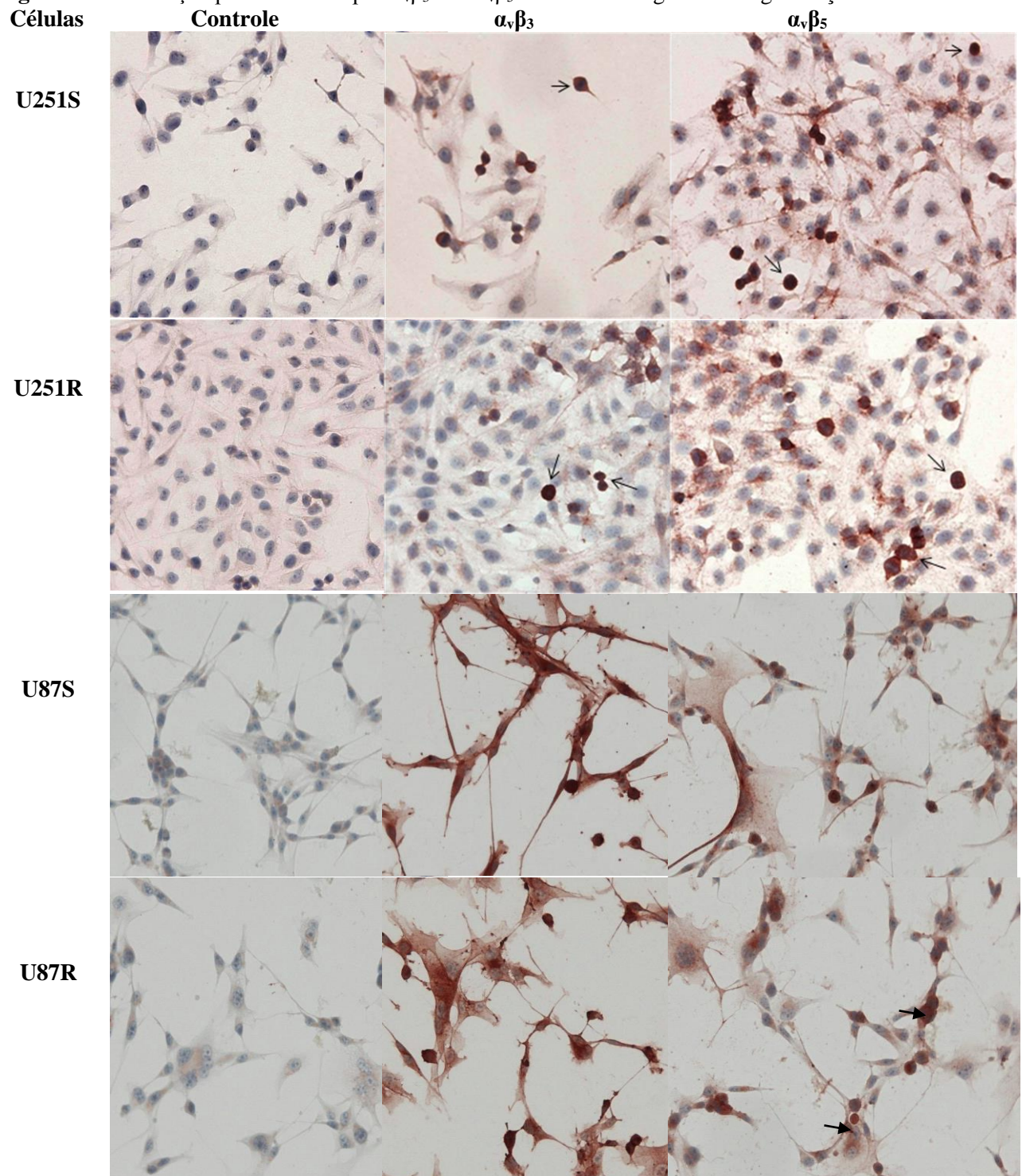
O foco nas integrinas da série  $\alpha_v$  é por conta da sua elevada expressão em glioblastoma. As integrinas são superexpressas na superfície das células tumorais facilitando o crescimento, sobrevivência e formação de novos vasos. Assim, bloquear a função das integrinas em células de gliomas usando cRGDfV e cRGDfK pode produzir um efeito anti-antitumoral pois ambos inibidores de integrinas se ligam e inibem as integrinas  $\alpha_v\beta_3$  e  $\alpha_v\beta_5$ .

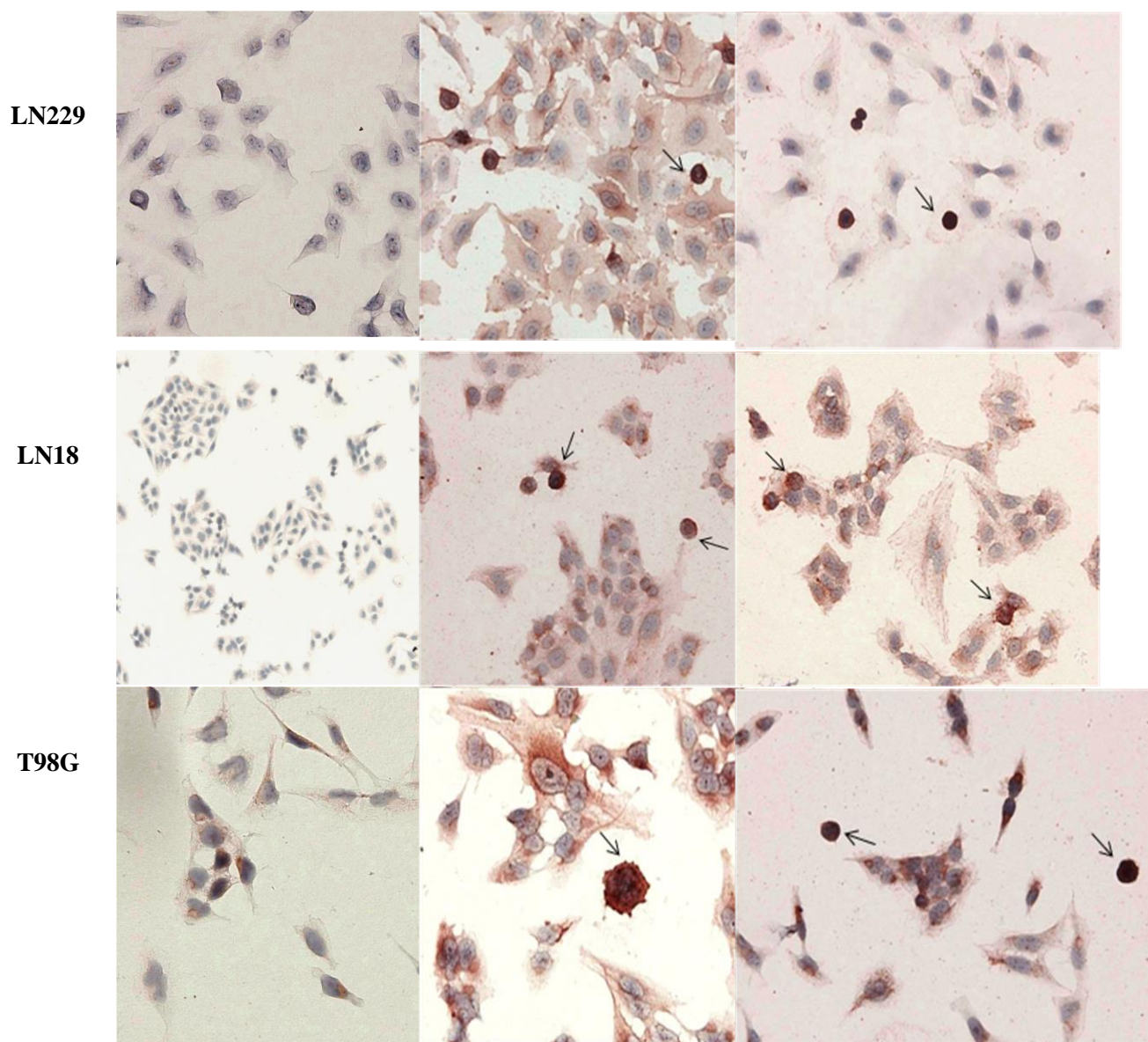
Para determinar a expressão das integrinas  $\alpha_v\beta_3$  e  $\alpha_v\beta_5$  em células de gliomas U251 and U87-sensível e resistente a temozolamida, LN229, LN18 e T98G (Figura 50), as células foram submetidas a coloração utilizando hematoxilina. A hematoxilina irá colorir o núcleo da célula, e a cor vermelha no citoplasma indica a presença das integrinas  $\alpha_v\beta_3$  and  $\alpha_v\beta_5$ .

Os resultados mostram que as células de glioma U-87-sensível e resistente, LN229 e T98G apresentaram alta expressão de  $\alpha_v\beta_3$  e  $\alpha_v\beta_5$  (Figura 50). As células U251-sensível e resistente, não apresentaram alta expressão de  $\alpha_v\beta_3$  integrina, porém apresentaram moderada expressão de  $\alpha_v\beta_5$ . As células LN18 não apresentaram expressão de ambas integrinas e pode ser considerada como negativa para expressão de  $\alpha_v\beta_3$  e  $\alpha_v\beta_5$ . As células sem o anticorpo primário  $\alpha_v\beta_3$  e  $\alpha_v\beta_5$  não apresentaram coloração vermelha, como era o esperado, pois são consideradas controle negativo.

Todas as células que apresentaram alta expressão de integrinas poderão ser utilizadas para os próximos experimentos *in vitro*. Entretanto, como este experimento foi realizado no laboratório de Patologia da University of Southern California, não foi possível utilizar todas as células para os experimentos *in vitro* de citotoxicidade e internalização realizados no Brasil, portanto optou-se por utilizar a célula U87 que tem uma elevada expressão de ambas as integrinas avaliadas e que são de interesse para a interação com cRGDfV e cRGDfK.

**Figura 50** - Coloração para os anticorpos  $\alpha_v\beta_3$  and  $\alpha_v\beta_5$  em células de glioma. Magnificação 20 $\times$ .





A Tabela 29 mostra a expressão das integrinas nas células de glioma baseado nas figuras acima.

**Tabela 29** - Intensidade de expressão de integrinas em células de gliomas.

Células	$\alpha_v\beta_3$	$\alpha_v\beta_5$
U215S	+	++
U251R	+	++
U87S	+++	+++
U87R	+++	+++
LN229	++	++
LN18	-	-
T98G	++	+++

Legenda: + fraca ; ++ moderada; +++ forte.

### 5.6.2. Avaliação da citotoxicidade, *in vitro*, das nanopartículas de quitosana sem e com modificação com PEG encapsuladas com cRGDfV em linhagens de células U87 utilizando método do MTT

A citotoxicidade das nanopartículas NPQS/P e NPQS/TPP encapsuladas com cRGDfV sem e com modificação com PEG foram avaliados somente em células U87.

A liberação seletiva e o direcionamento de biofármacos para o tumor é um grande desafio para uma efetiva terapia do câncer. A superexpressão de vários receptores sobre as células tumorais é uma característica estrutural e bioquímica que distingue as células tumorais das células normais. As integrinas são cruciais na adesão, sinalização, viabilidade e motilidade celular em células tumorais (AVRAAMIDES, GARMY-SUSINI, VARNER, 2008; BORNSTEIN, SAGE, 2002).

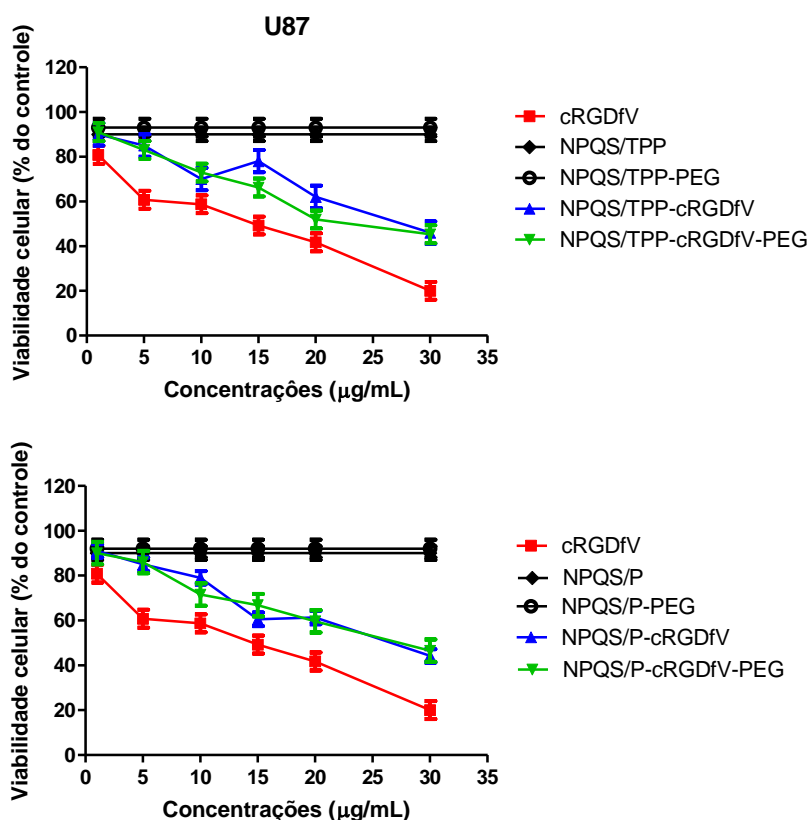
Sendo assim, os inibidores de integrinas cRGDfV e cRGDfK têm sido muito estudada como alternativa terapêutica no tratamento de glioblastoma com o objetivo de inibir a ação das integrinas expressas nas células do tumor, especialmente as integrinas  $\alpha_v\beta_3$  e  $\alpha_v\beta_5$ , inibindo assim a proliferação, a adesão e migração das células tumorais.

Os inibidores de integrinas cRGDfV e cRGDfK possuem a sequência adesiva RGD (arginina, glicina, ácido aspartático) através da qual se ligam especificamente as integrinas RGD-dependentes como as integrinas  $\alpha_v\beta_3$  e  $\alpha_v\beta_5$ , presente nas células do glioblastoma (AVRAAMIDES, GARMY-SUSINI, VARNER, 2008; KONSTANTOPOULOS; THOMAS, 2009; DESGROSELLIER; CHERESH, 2010).

Com o objetivo de avaliar a importância e especificidade da interação do cRGDfV e cRGDfK com as integrinas, o ensaio de citotoxicidade foi realizado utilizando células U87 que apresentam alta expressão da integrina  $\alpha_v\beta_3$  e  $\alpha_v\beta_5$  (CHATERJEE et al., 2000; MATTERN et al., 2005).

A Figura 51 apresenta os resultados com a célula U87 tratadas com cRGDfV em solução, NPQS/TPP e NPQS/P e ambas modificadas com PEG. É possível notar que quando os peptídeos estão em solução ocorreu um efeito citotóxico mais elevado para as maiores concentrações (20 e 30  $\mu\text{g/mL}$ ) quando comparado com os peptídeos encapsulados em nanopartículas. A análise estatística usando comparações múltiplas por Tukey's ( $p > 0,05$ ) demonstrou que há diferença significativa em relação ao peptídeo em solução e em nanopartículas para a maior concentração (30  $\mu\text{g/mL}$ ).

**Figura 51** - Viabilidade celular das células U87 após 24 horas de exposição ao MTT.



Em ambas as nanopartículas modificadas com PEG ou não, é possível observar que o cRGDfV em solução promoveu uma redução significativa da viabilidade celular em células U87 quando comparado com cRGDfV em nanopartículas. Entretanto, na análise estatística observou-se que o peptídeo na concentração de 5 µg/mL não obteve diferença significativa em relação as nanopartículas com concentração de 20 µg/mL de peptídeo encapsulado, concluindo que para as nanopartículas apresentarem um efeito semelhante ao peptídeo em solução é necessário uma dose maior de peptídeo encapsulado. O fato de não sabermos exatamente onde o cRGDfV e o cRGDfK estão localizados nas nanopartículas, pode ter interferido na ligação dos inibidores de integrinas com o motivo RGD das integrina levando a um menor efeito citotóxico. O mecanismo pelo qual as células tiveram uma redução maior na viabilidade celular com o peptídeo em solução pode ser devido a uma maior interação com as integrinas expressas nas células enquanto que o peptídeo em nanopartículas pode não estar disponível para interagir com as integrinas.

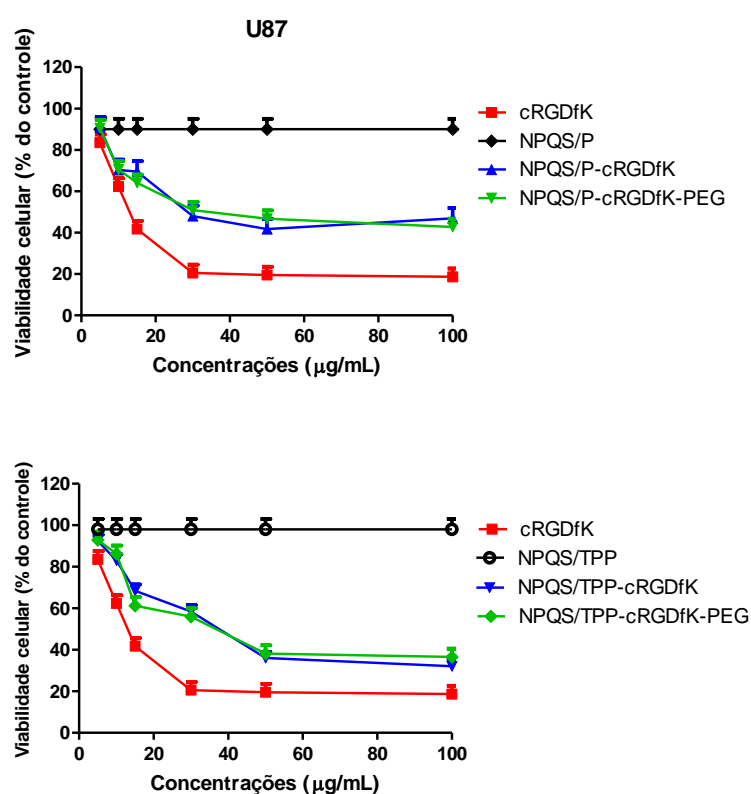
Entretanto não podemos esquecer que a administração de inibidores de integrinas terapêuticas é limitada principalmente pela sua baixa biodisponibilidade e susceptibilidade a degradação ácida e enzimática em fluidos biológicos, portanto, a associação destes inibidores de integrinas com as nanopartículas pode ser uma estratégia promissora principalmente porque têm como vantagens impedir a degradação nos fluidos biológicos mantendo a funcionalidade do cRGDfV e cRGDfK para interagir com as integrinas expressas nos GBMs. (DUDHANI; KOSARAJU, 2010; FUNDUEANU et al., 2004; GAVINI et al., 2006).

### **5.6.3. Avaliação da citotoxicidade, *in vitro*, das nanopartículas de quitosana sem e com modificação de PEG encapsuladas com cRGDfK em linhagem de célula U87 utilizando método do MTT**

A Figura 52 demonstra as diferenças de citotoxicidade em células U87 de glioma das nanopartículas de quitosana encapsuladas com cRGDfK com e sem modificação com PEG. É possível observar que o peptídeo cRGDfK em solução apresentou um efeito citotóxico significativo ( $P > 0,05$ ) nas menores concentrações comparado com o cRGDfK encapsulado nas nanopartículas. A análise estatística demonstrou que não há diferença significativa em relação ao peptídeo na concentração de 15 µg.mL<sup>-1</sup> de peptídeo em solução em relação a concentração de 50 µg.mL<sup>-1</sup> do peptídeo nas nanopartículas. O mesmo comportamento foi

observado para o cRGDfV, concluindo que há a necessidade de uma maior concentração de peptídeo encapsulado para obter uma citotoxicidade equivalente a menores concentrações do peptídeo em solução. Como já foi comentando acima, esta diferença pode estar relacionada com disponibilidade do motivo RGD do cRGDfK e a sua localização nas nanopartículas, reduzindo a interação com as integrinas. (NABORS, MIKKELSEN, ROSENFELD, 2007).

**Figura 52** - Viabilidade celular das células U87 após 24 horas de exposição ao MTT.



Podemos concluir que as nanopartículas de quitosana sem e com modificação com PEG encapsuladas com os peptídeos cRGDfV e cRGDfK foram citotóxicas para as células U87 e portanto, as ambas as nanopartículas podem ser exploradas para a administração nasal a fim de atingir o alvo que são os GBMs.

#### 5.6.4. Avaliação da captação das nanopartículas de quitosana sem e com modificação com PEG pelas células U87 por citometria de fluxo

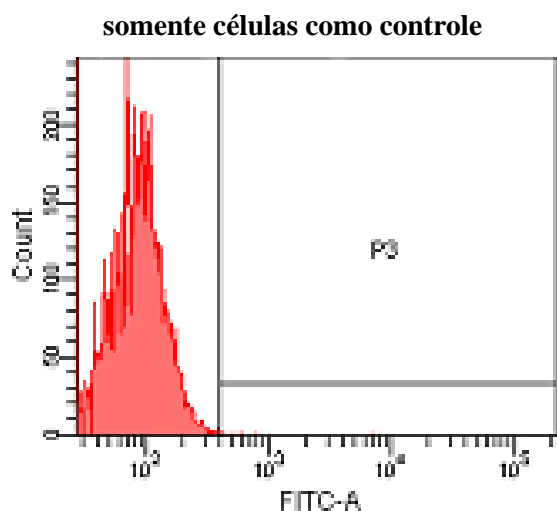
Os estudos de captação celular foram realizados com o objetivo de investigar as

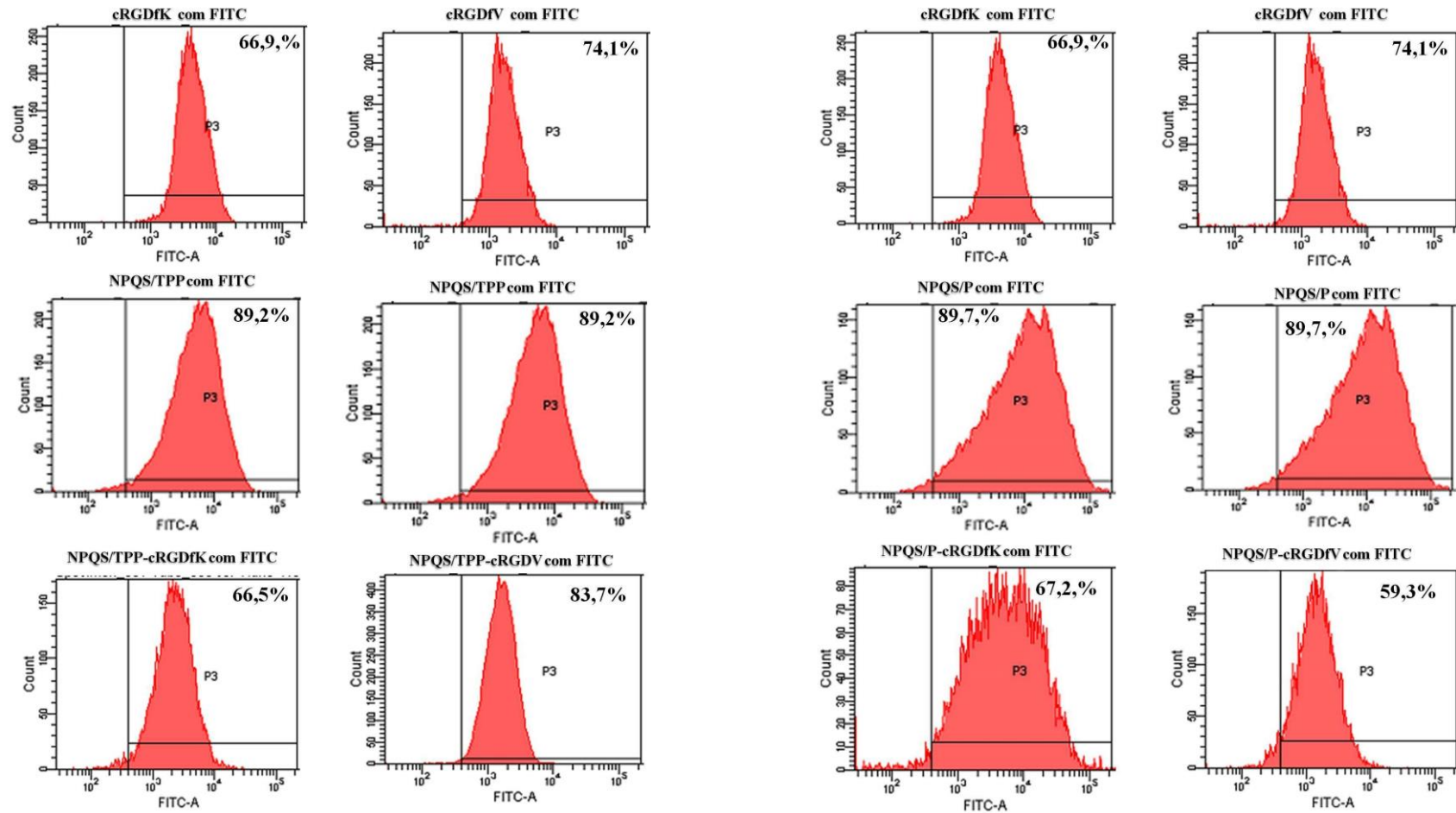
diferenças nos mecanismos de captação das nanopartículas sem e com modificação com PEG encapsuladas com cRGDfV e cRGDfK.

As células U87 foram incubadas durante 1 h com as diferentes formulações, de forma a avaliar se o peptídeo cRGDfV e cRGDfK encapsulados nas nanopartículas sofrem alteração na especificidade de interação com as integrinas  $\alpha_v\beta_3$  e  $\alpha_v\beta_5$  superexpressas em células U87 de glioma.

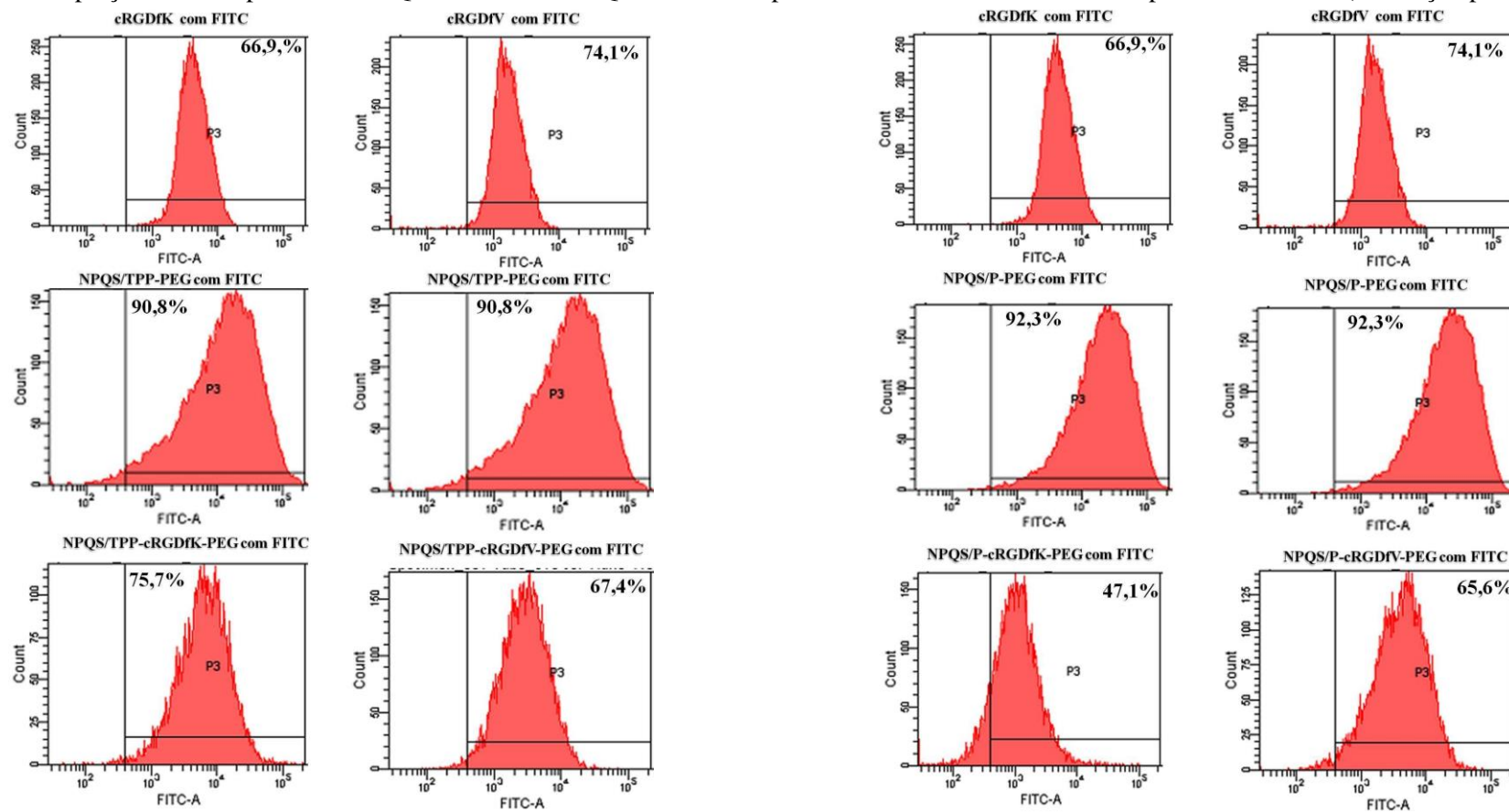
As Figuras 53 e 54 demonstram a associação e captação das nanopartículas NPQS/TPP, NPQS/P sem e com modificações com PEG. É possível observar que as nanopartículas NPQS/TPP e NPQS/P sem e com PEG sofrem a captação por mecanismos inespecíficos pois independente da presença do cRGDfV e cRGDfK, a porcentagem de células internalizadas se mantém a mesma.

**Figura 53** - Captação das nanopartículas NPQS/TPP e NPQS/P encapsuladas com cRGDfV e cRGDfK pelas células U87 (incubação por 1 hora).





**Figura 54** - Captação das nanopartículas NPQS/TPP-PEG e NPQS/P-PEG encapsuladas com cRGDFv e cRGDFk pelas células U87 (incubação por 1 hora).

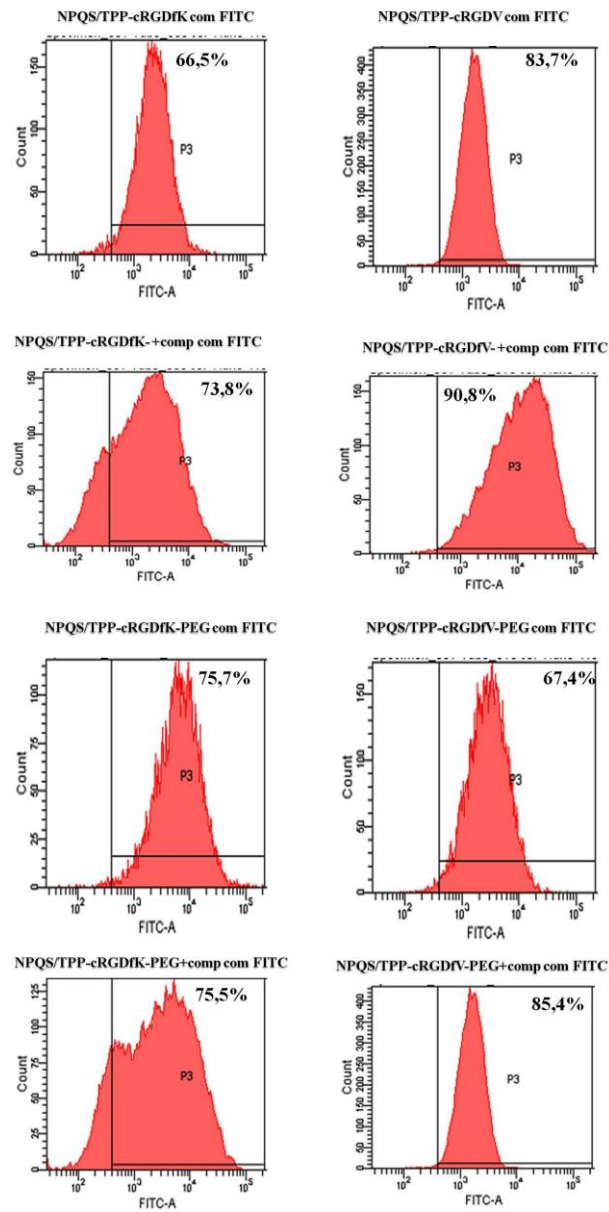


### **5.6.5. Estudos de competição dos peptídeos cRGDfV e cRGDfK encapsuladas em nanopartículas de quitosana (sem e com modificação de PEG) em células U87 por citometria de fluxo**

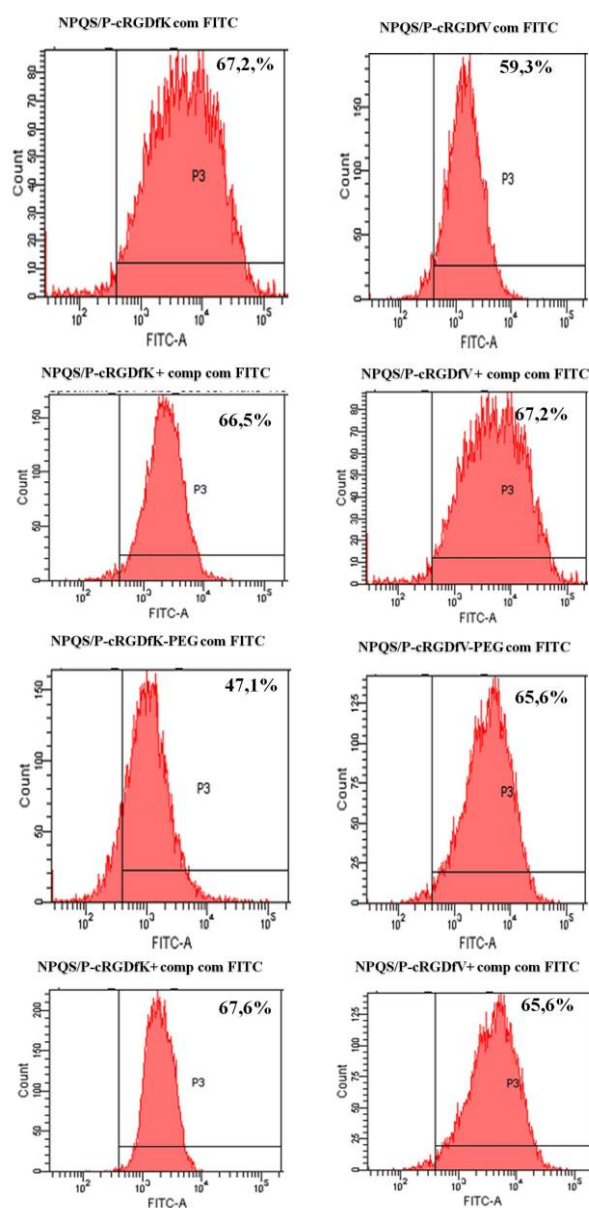
Os estudos de competição tiveram como objetivo confirmar se as nanopartículas NPQS/TPP, NPQS/P sem e com PEG encapsuladas com cRGDfV e cRGDfK competem pelo mesmo receptor de integrinas. Neste experimento um competidor de integrinas, o cRGDfC, foi incubado 2 horas antes da adição das nanopartículas encapsuladas com cRGDfV e cRGDfK para que haja saturação das integrinas expressas nas superfícies das células. Assim, será possível determinar se a interação das desintegrinas encapsuladas nas nanopartículas foi mediada pelas integrinas.

As Figuras 55 e 56 confirmam que as nanopartículas encapsuladas com cRGDfV e cRGDfK não sofre mecanismo de internalização mediado pelas integrinas. Observamos que mesmo na presença do competidor que saturou as integrinas, a internalização continua a ocorrer e as porcentagens de nanopartículas internalizadas continuam sendo equivalente ou até mesmo maiores aos do experimento de internalização em que não há presença do competidor.

**Figura 55** - Estudo de competição de NPQS/TPP e NPQS/TPP-PEG encapsuladas com cRGDFV e cRGDFK em células U87.



**Figura 56** - Estudo de competição de NPQS/P e NPQS/P-PEG encapsuladas com cRGDFV e cRGDFK em células U87.



### 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

Os resultados de citotoxicidade e efeito na internalização das nanopartículas de quitosana encapsuladas com cRGDFV e cRGDFK demonstraram que não há interação direta com as integrinas expressas na superfície das células de GBMs, entretanto, um efeito

citotóxico é observado quando as cRGDfV e cRGDfK estão encapsulados. Pensando em avaliar como seria o efeito dos inibidores de integrinas se não estivesse encapsulados nas nanopartículas, pensou-se em adotar outra estratégia que é a utilização das nanopartículas de quitosana funcionalizadas com cRGDfK. Esta estratégia pode promover um aumento da citotoxicidade e da interação com as integrinas expressas nos GBMs. Para isto foi proposto a funcionalização das nanopartículas com cRGDfK, este inibidor de integrina pode ser funcionalizado devido a presença do aminoácido lisina que apresenta um grupo amino terminal, diferentemente do cRGDfV que apresenta um aminoácido valina e um grupo metil terminal que não permite acoplá-lo à superfície das nanopartículas. As nanopartículas de quitosana serão modificadas por meio de interações covalente como polietilenoglicol e o cRGDfK será acoplado na superfície das nanopartículas. Serão abordados os parâmetros físico-químicos das diferentes nanopartículas de quitosana com TPP e PP que foram escolhidas no planejamento fatorial e serão funcionalizadas com cRGDfK. Pretende-se avaliar se o fato do cRGDfK estar na superfície das nanopartículas promove uma interação mais específica com as integrinas expressas nos GBMs e se este fator poderia promover diferenças nos efeitos citotóxicos e na internalização das nanopartículas nas células de GBMs.

Estas nanopartículas funcionalizadas com cRGDfK podem ser utilizadas como estratégia para aumentar a interação com as integrinas expressas nos GBMs e podem ser tanto exploradas para administração endovenosa, já que são modificadas covalentemente com PEGs promovem um aumento do tempo de residência na corrente sanguínea devido a diminuição do reconhecimento das nanopartículas pelo sistema fagocitário, além de promover um aumento da captação pelas células endoteliais do lúmen cerebral, por meio de mecanismos de transporte endocíticos.

### **5.7.1. Desenvolvimento e caracterização físico-química das nanopartículas de quitosana funcionalizadas com cRGDfK**

Como já foi descrito na revisão o cRGDfK tem demonstrado elevada especificidade pela integrina  $\alpha_v\beta_3$  e  $\alpha_v\beta_5$  que são altamente expressas em GBMs. Através de uma reação química entre as amina reativas do cRGDfK, foi possível a conjugação das nanopartículas de

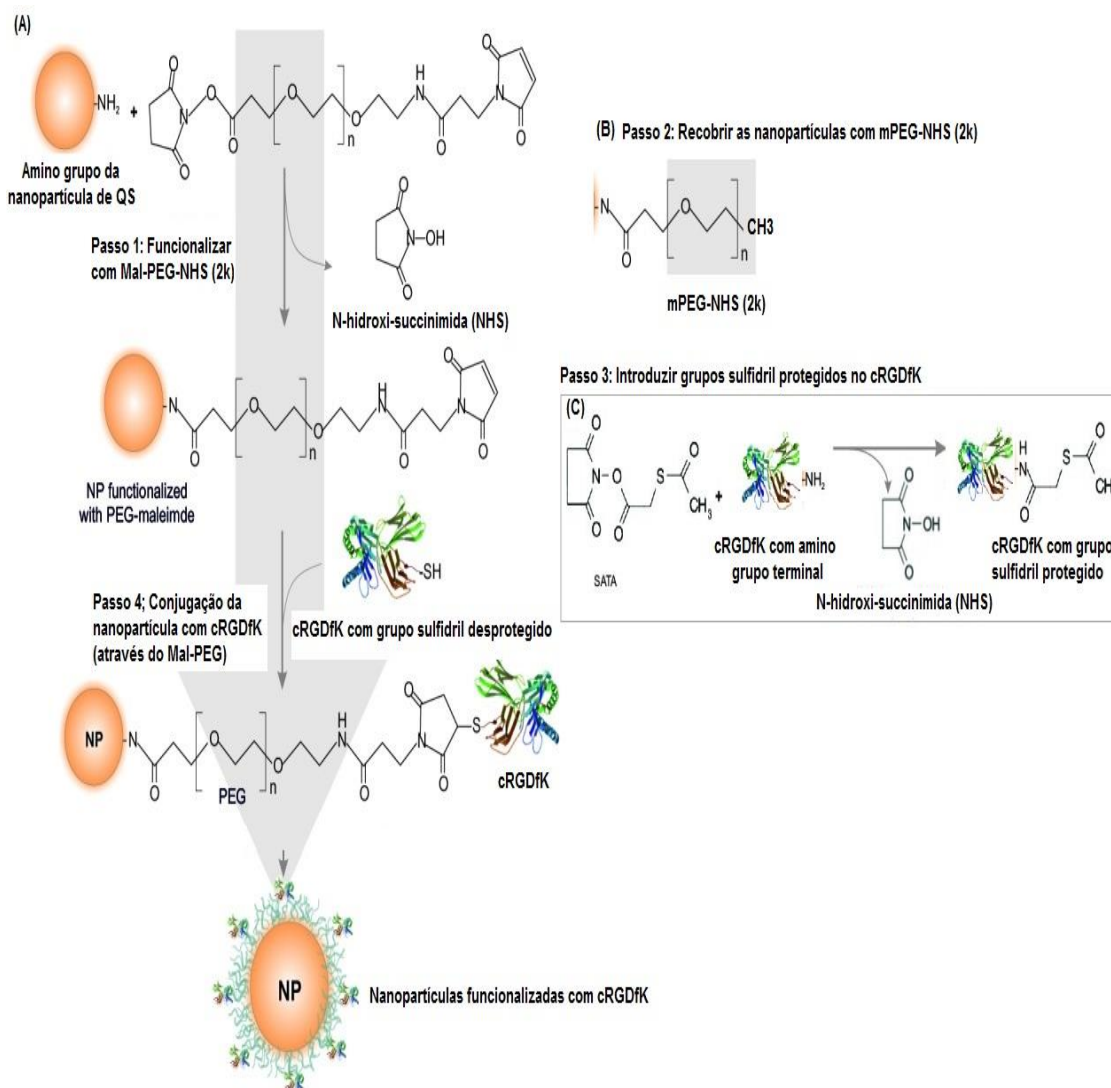
quitosana de forma covalente com o PEG. O objetivo desta metodologia é desenvolver nanopartículas com o cRGDfK acoplado na superfície das nanopartícula e demonstrar que ele mantém a sua funcionalidade. O objetivo de acoplamento do cRGDfK na superfície das nanopartículas será o aumento do acúmulo das nanopartículas no tumor por meio de interações específicas com as integrinas e promover um aumento da ação anti-tumoral por meio da inibição das integrinas  $\alpha_v\beta_3$  e  $\alpha_v\beta_5$ . Essas nanopartículas funcionalizadas com cRGDfK podem ser posteriormente utilizadas para a encapsulação de fármacos ou agentes de contraste para serem usado no diagnóstico por imagem.

A modificação da superfície das nanopartículas de QS foram desenvolvidas utilizando o metoxil-PEG (2k) e o maleimida-PEG (2k), ambos com um grupamento N-hidroxisuccinimida (NHS), o maleimida-PEG foi utilizado para a bioconjugação do cRGDfK na superfície das nanopartículas (KIM et al., 2008, MALHOTRA, TOMARO-DUCHESNEAU, PRAKASH, 2013; PATIL, GAIKWAD, 2011).

Inicialmente as nanopartículas de QS não funcionalizadas, foram peguiladas por meio de uma reação com o metoxil-PEG-NHS (mPEG-NHS), os grupamentos NHS reagem com as aminas primárias desprotonadas da QS por ataque nucleofílico e o NHS é liberado como é demonstrado na Figura 57.

A etapa seguinte foi o desenvolvimento das nanopartículas funcionalizadas com cRGDfK por meio de interações com o grupamento maleimida do maleimida-PEG-NHS (Mal-PEG-NHS). A reação ocorreu como mostra a Figura 58. Na etapa 1, as nanopartículas foram incubadas durante 2 horas com um excesso de Mal-PEG-NHS, após este período, o mPEG-NHS foi adicionado nas nanopartículas e a reação foi incubada por mais 2 horas. A adição de mPEG-NHS revestiu toda a superfície das nanopartículas já que Mal-PEG-NHS foi usado em concentração menores e irá participar da bioconjugação do cRGDfK na superfície das nanopartículas (MALHOTRA, TOMARO-DUCHESNEAU, PRAKASH, 2-013).

**Figura 57** - Nanopartículas de quitosana covalentemente modificadas com PEG e funcionalizadas com cRGDfK.



Fonte: BARAR; OMIDI, 2014

O diâmetro médio, índice de polidispersão e potencial zeta das nanopartículas não funcionalizadas e funcionalizadas com cRGDfK foram determinadas pela técnica de espalhamento dinâmico de luz.

Os resultados estão demonstrados na Tabela 30, observa-se que há um aumento do diâmetro médio das nanopartículas após a funcionalização com o cRGDfK. Este aumento pode ser associado a presença de dois tipos de PEG que recobrem a superfície das nanopartículas, levando ao aumento do diâmetro devido à cadeia de PEG que se estende na

superfície das nanopartículas. Todas as nanopartículas se apresentaram com PDI abaixo de 0,4, indicando um sistema bastante homogêneo.

O potencial zeta das nanopartículas também foi avaliado, observamos que todas as nanopartículas apresentam uma diminuição do potencial zeta devido a presença de PEG, apesar dessa diminuição as nanopartículas ainda apresentam boa estabilidade física, pois não foi observado a presença de agregados.

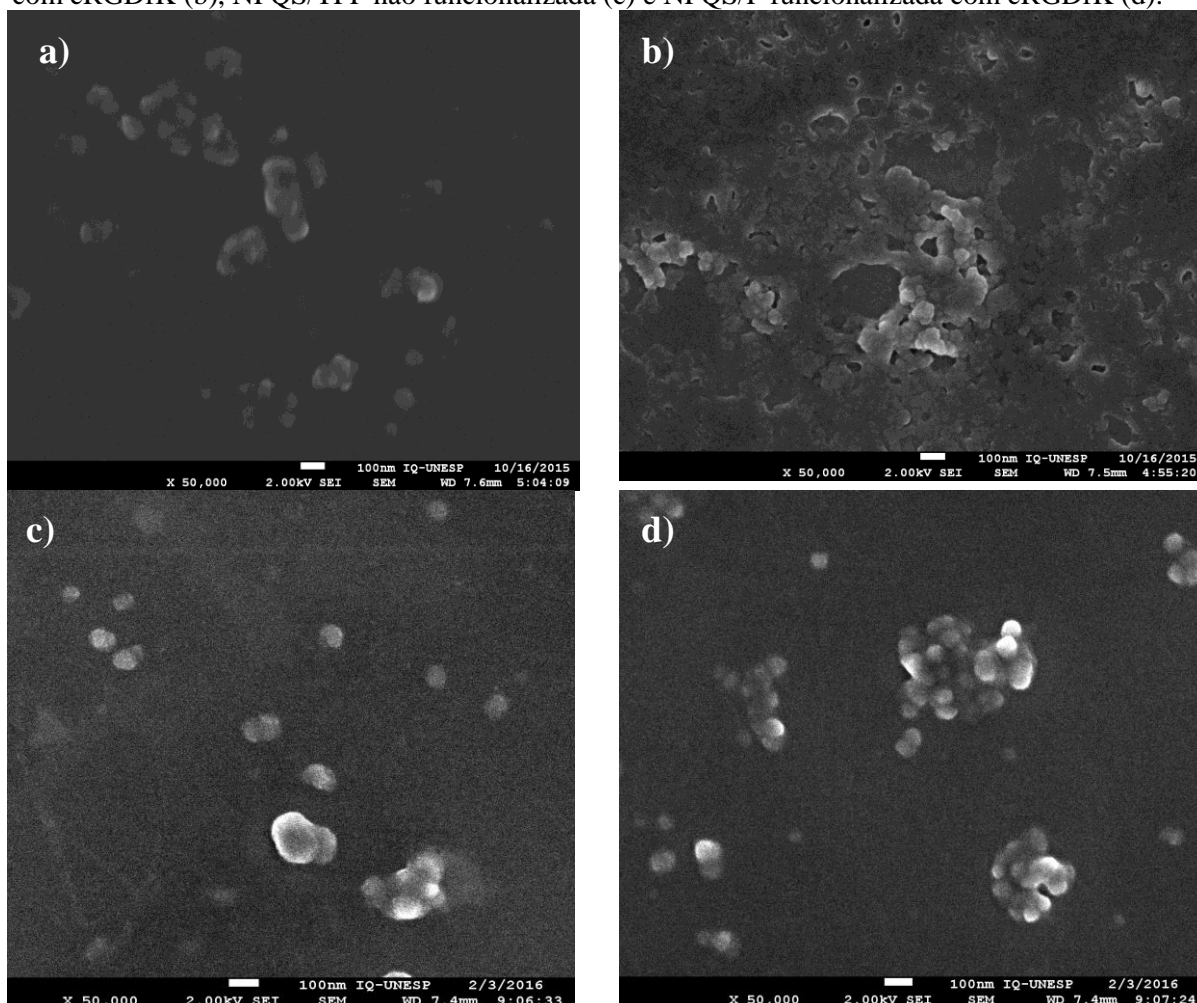
**Tabela 30** - Diâmetro médio, índice de polidispersão e potencial zeta das nanopartículas não funcionalizadas (NF) e funcionalizadas (F) com cRGDfK.

Amostras	Diâmetro Médio (nm) ± DP	Potencial	
		zeta (mV) ± DP	PDI
NPQS/TPP-NF	176,8 ± 2,99	28,30 ± 0,30	0,24 ± 0,02
NPQS/TPP-F-cRGfK	237 ± 5,4	22,64 ± 1,04	0,35 ± 1,84
NPQS/P-NF	215 ± 1,27	29,58 ± 0,09	0,27 ± 0,04
NPQS/P-F-cRGDfK	249 ± 1,6	23,09 ± 0,34	0,38 ± 0,63

### 5.7.2. Morfologia das nanopartículas de quitosana funcionalizadas com cRGDfK

A análise morfológica das nanopartículas não funcionalizadas (Figura 58 a,c) e funcionalizadas com cRGDfK (Figura 58 b,d) apresentaram-se com forma esférica e uma distribuição de diâmetro entre 30-100 nm. Esta discrepância entre o espalhamento dinâmico de luz e o MEV pode ser relacionada ao fato da técnica de espalhamento ter sido realizado em ambiente aquoso e nos forneceu o raio hidrodinâmico das nanopartículas, enquanto que o SEM nos fornece o diâmetro da forma em estado liofilizado. Adicionalmente, alguns agregados podem ser observados e podem ser referentes ao processo de liofilização das nanopartículas.

**Figura 58** - Morfologia das nanopartículas NPQS/P não funcionalizada (a), NPQS/P funcionalizada com cRGDfK (b), NPQS/TPP não funcionalizada (c) e NPQS/P funcionalizada com cRGDfK (d).



### 5.7.3. Caracterização das nanopartículas funcionalizadas com cRGDfK por espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier

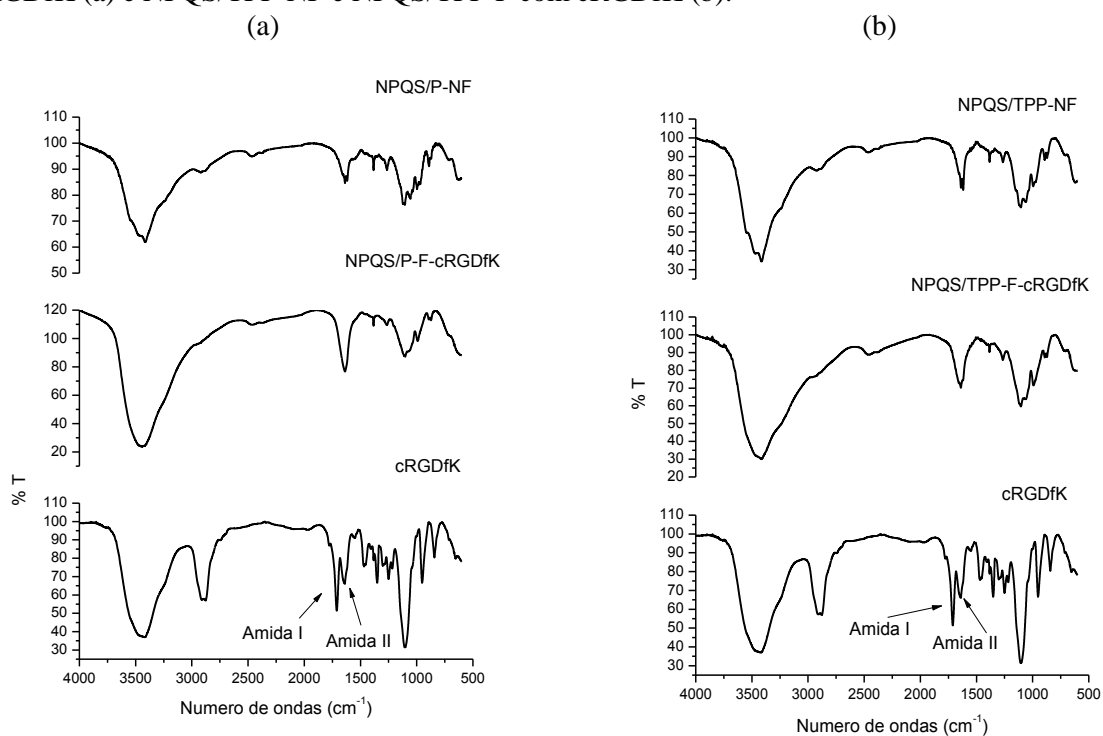
Os espectros de nanopartículas de NPQS/P e NPQS/TPP não funcionalizadas e funcionalizadas com cRGDfK podem ser visualizados na Figuras 59.

No espectro da NPQS/P e NPQS/TPP as bandas apresentadas nas Figuras 30 e 31, mostraram uma banda de N-H que é de  $3427\text{ cm}^{-1}$  e  $3411\text{ cm}^{-1}$ . Após a peguilação com mPEG apresentadas na Figura 59 (a,b), essas bandas apresentaram um deslocamento para valores maiores, em  $3458\text{ cm}^{-1}$  e  $3421\text{ cm}^{-1}$  que pode indicar a formação de ligações de hidrogênio entre os mPEG e O-H da QS presente nas nanopartículas. As bandas de amida

para NPQS/P e NPQS/TPP aparecem em  $1643\text{ cm}^{-1}$  e  $1650\text{ cm}^{-1}$ , respectivamente, após a adição dos PEGs há um deslocamento das bandas para valores menores em  $1636\text{ cm}^{-1}$  e  $1621\text{ cm}^{-1}$ , indicando ligações entre as bandas de amida I com os grupos NHS de ambos os PEGs (BHATTARAI et al., 2005).

Nos espectros de nanopartículas funcionalizadas com cRGDfK (Figura 59 a,b), as bandas de amida I após o acoplamento do peptídeo nas nanopartículas, deslocou-se para valores maiores em  $1650\text{ cm}^{-1}$  e  $1636\text{ cm}^{-1}$  para NPQS/P-F e NPQS/TPP-F demonstrando que este deslocamento pode ser associado as novas interações intermoleculares entre o cRGDfK e os PEGs atribuídos a ligações de hidrogênio que alteram a frequência de oscilação das bandas de O-H e amida I mostrando que o acoplamento a superfície foi realizado com sucesso (BHATTARAI et al., 2005; JIANG; HANG, 1998).

**Figura 59** - Espectros de absorção na região do infravermelho da NPQS/P-NF, NPQS/P-F com cRGDfK (a) e NPQS/TPP-NF e NPQS/TPP-F com cRGDfK (b).

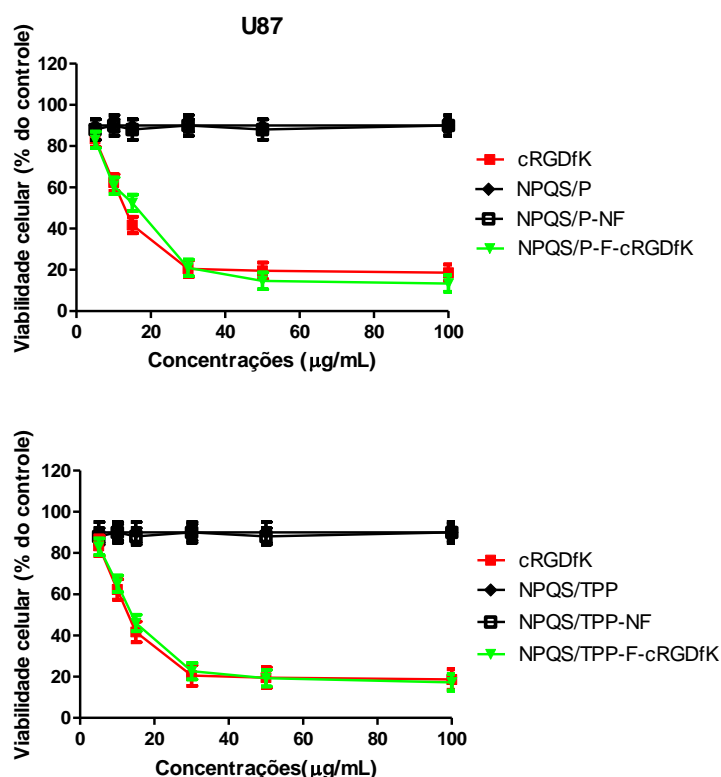


#### **5.7.4. Avaliação da citotoxicidade, *in vitro*, das nanopartículas de quitosana funcionalizadas com cRGDfK em linhagem de célula U87 utilizando método do MTT**

O peptídeo cRGDfK tem sido muito explorado para o diagnóstico e também para terapêutica em GBMs pois a funcionalização das nanopartículas com cRGDfK pode promover uma interação e interanálise específica via integrinas, o que pode aumentar a eficácia de fármacos e agentes de diagnóstico encapsulados nas nanopartículas, pois serão direcionados diretamente para o ambiente tumoral.

A Figura 60 demonstra o efeito citotóxico do cRGDfK em solução e acoplado a superfície das nanopartículas. Observamos que o fato do cRGDfK estar na superfície das nanopartículas promove uma interação específica e elevada com as integrinas. A citotoxicidade das nanopartículas funcionalizadas e do cRGDfK em solução é bastante semelhante, assim, podemos concluir que para uma maior citotoxicidade do cRGDfK é preciso que ele esteja na superfície das nanopartículas.

**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.



Assim com o objetivo de desenvolver as nanopartículas para serem utilizadas para a terapia e diagnóstico por imagem de GBM, as nanopartículas funcionalizadas com o cRGDfK parecem ser interessantes pois poderão promover uma interação específica com as integrinas promovendo um efeito mais citotóxico nas células de GBMs.

#### 5.7.4.1. Avaliação da captação das nanopartículas funcionalizadas com cRGDfK pelas células U87 por citometria de fluxo

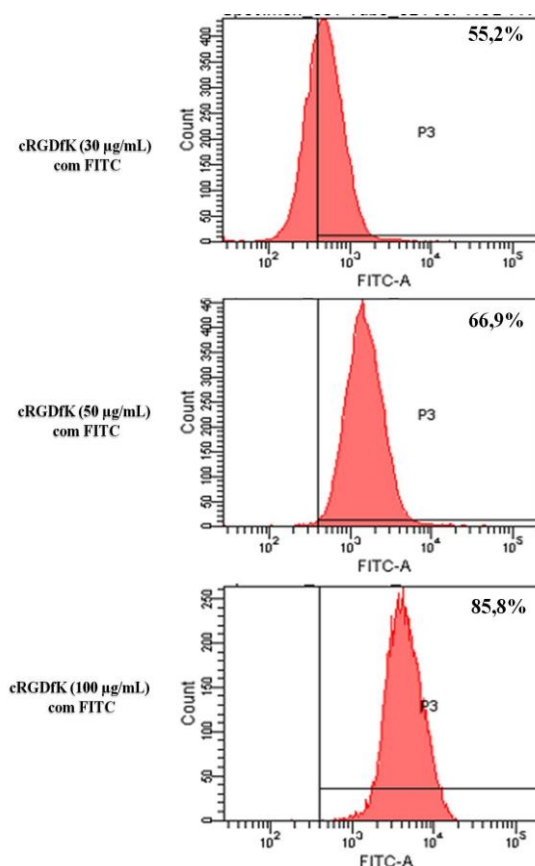
Os estudos de captação celular foram realizados com o objetivo de investigar as diferenças nos mecanismos de captação do cRGDfK em solução e das nanopartículas funcionalizadas com o cRGDfK na superfície.

As células U87 foram incubadas durante 1 h com as diferentes formulações, de forma a avaliar se a presença do cRGDfK ou cRGDfK na superfície das nanopartículas altera a especificidade de interação com as integrinas  $\alpha_v\beta_3$  e  $\alpha_v\beta_5$  superexpressas em células U87 de

glioma.

Com o objetivo de demonstrar o aumento da afinidade do cRGDfK pelas integrinas, a Figura 61 demonstra que com o aumento da concentração do peptídeo há um aumento progressivo na captação possivelmente mediada pelas integrinas.

**Figura 61** - Avaliação da captação do cRGDfK pelas células U87 em função do aumento da concentração.



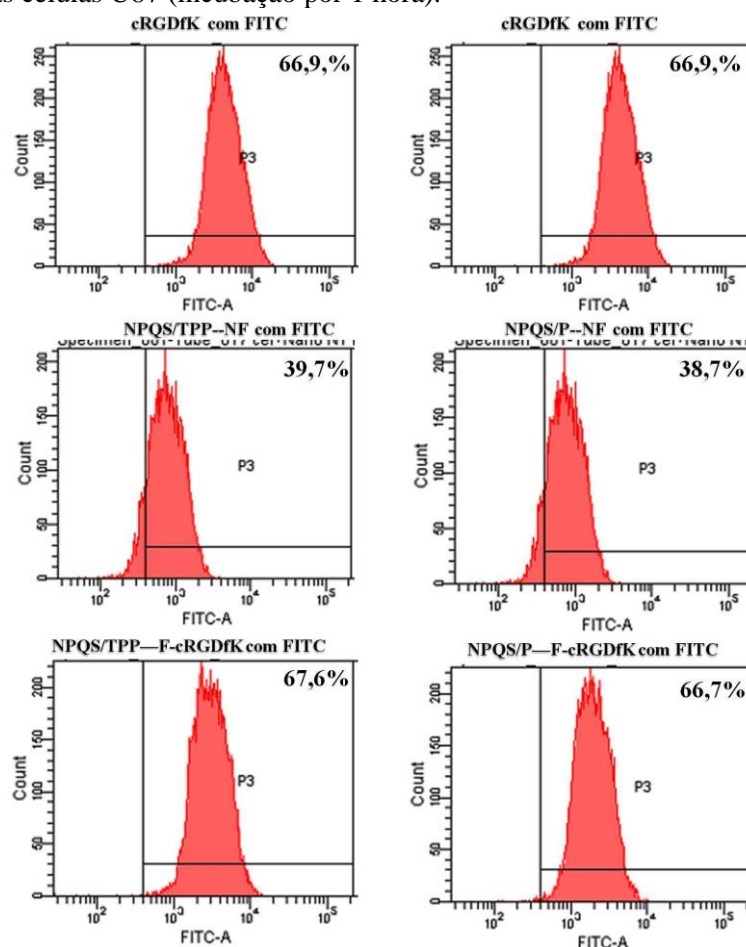
Os resultados seguintes da Figura 62 tem o objetivo de confirmar se NPQS/P-NF e NPQS/TPP-NF tem uma captação menos elevada do que as nanopartículas funcionalizadas com cRGDfK. Também será possível avaliar se o peptídeo consegue manter a afinidade pelas integrinas  $\alpha_v\beta_3$  e  $\alpha_v\beta_5$  após o acoplamento a superfície das nanopartículas.

Ambos os sistemas não-funcionalizadas e funcionalizadas com cRGDfK podem chegar ao tumor através do efeito EPR, porém o mecanismo de internalização ativo pelas células tumorais só ocorre quando o cRGDfK está na superfície das nanopartículas. A

vantagem de usar um sistema funcionalizado que direciona as nanopartículas para o tumor é que tanto fármacos antitumorais, quanto agentes de imagem para uso em diagnóstico podem ser encapsulados nas nanopartículas e liberados diretamente no tumor promovendo um aumento tanto da eficácia terapêutica quanto do diagnóstico por imagem. Além disso, nanopartículas que interagem especificamente com as integrinas podem promover um aumento da citotoxicidade, o que foi demonstrado em experimentos com as células U87, onde as nanopartículas funcionalizadas com o cRGDfK foram mais citotóxicas.

Na Figura 62 é possível observar que a captação das nanopartículas não funcionalizadas é diminuída, enquanto que as nanopartículas funcionalizadas com cRGDfK sofrem uma maior captação intracelular. Nota-se que há uma aumento da captação quando o cRGDfK está na superfície das nanopartículas e esta captação pode ser mediada pela interação com as integrinas expressas na superfície das células de GBMs.

**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).

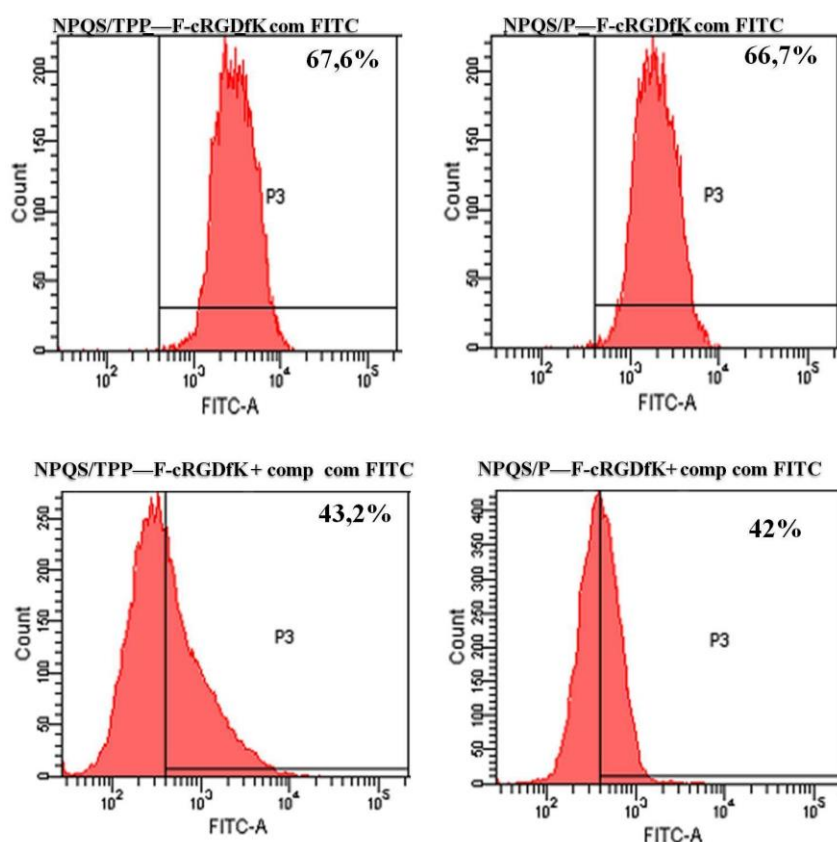


#### 5.7.4.2. Estudo de competição das nanopartículas funcionalizadas com cRGDfK em células U87 por citometria de fluxo

Os estudos de competição tiveram como objetivo confirmar se as nanopartículas funcionalizadas com cRGDfK compete com o inibidor através da interação com as integrinas.

Os estudos de competição para as nanopartículas funcionalizadas demonstram que quando há presença do competidor, conseqüentemente há uma diminuição da internalização das nanopartículas (Figura 63). Podemos concluir que o competidor e o cRGDfK presente na superfície das nanopartículas funcionalizadas competem pelo mesmo sítio de ligação que é o motivo RGD das integrinas, assim conclui-se que o principal mecanismo de internalização destas nanopartículas é mediado pela interação com as interginas superexpressas na superfície das células das células de glioma.

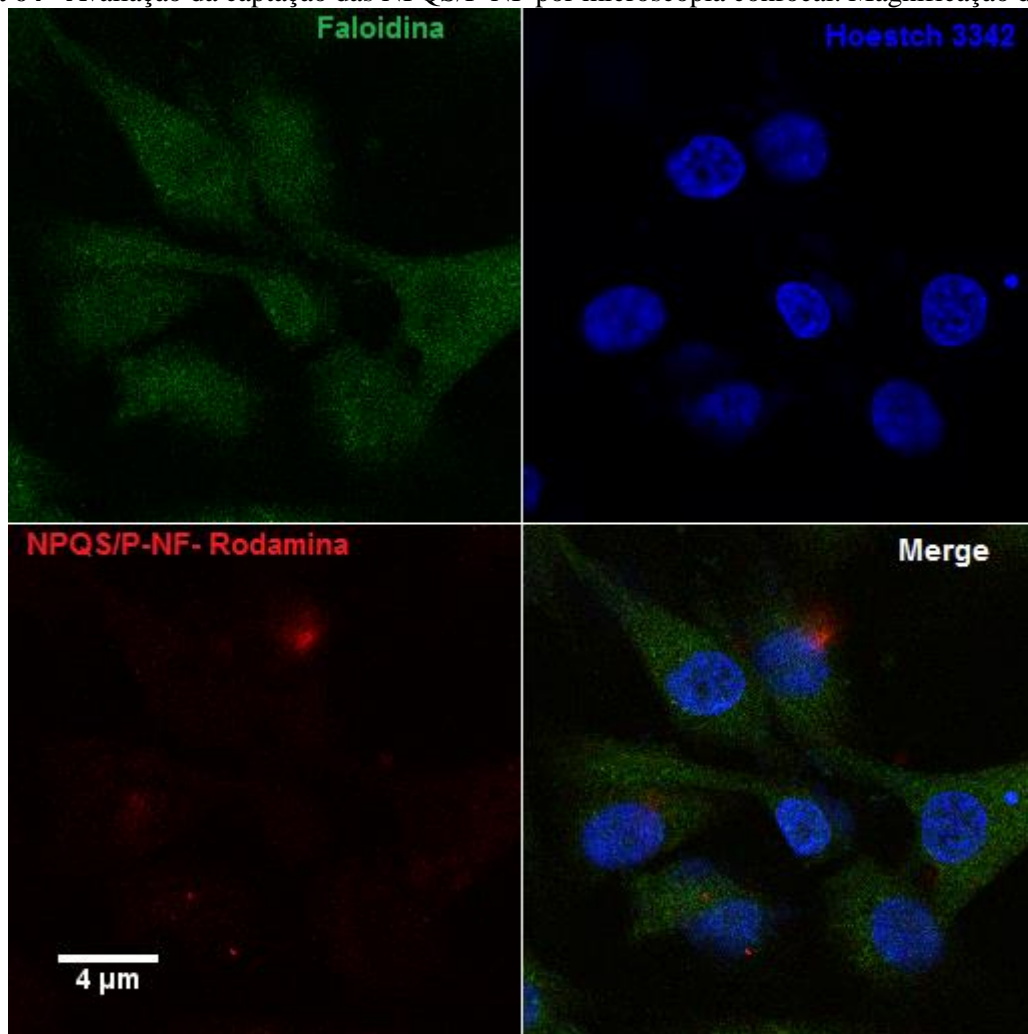
**Figura 63** - Estudo de competição de NPQS/TPP e NPQS/P funcionalizadas com cRGDfK em células U87.



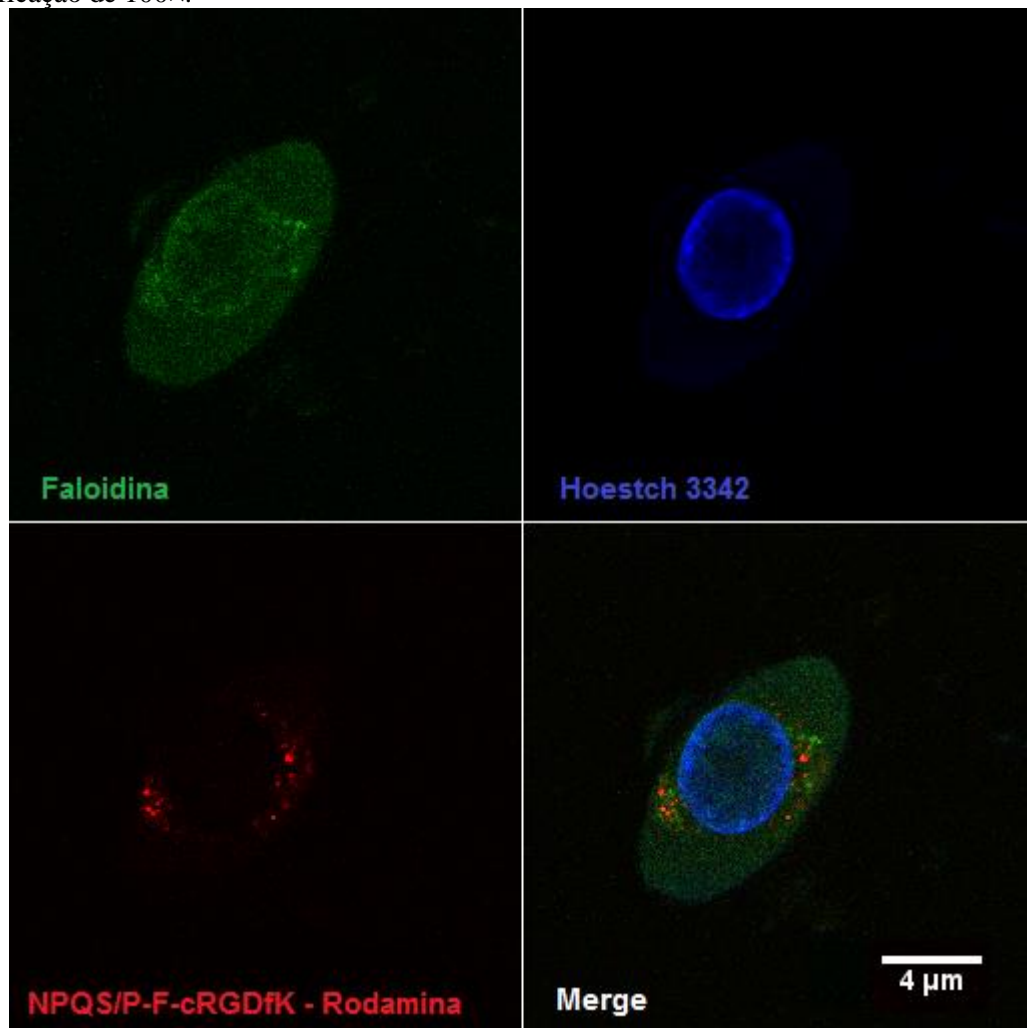
### 5.7.5. Avaliação da captação das nanopartículas de quitosana funcionalizadas com cRGDfK por microscopia confocal

As Figuras 64-67 mostram as diferenças de internalização das nanopartículas não funcionalizadas e funcionalizadas com cRGDfK. Ambas as nanopartículas estão marcadas com Rodamina e que apresentam-se na imagem em vermelho, o citoplasma está marcado com faloidina e o núcleo da célula foi corado com Hoestch 3342 apresentando-se em azul. É possível visualizar a presença das nanopartículas no interior das células no citoplasma celular e próximas ao núcleo.

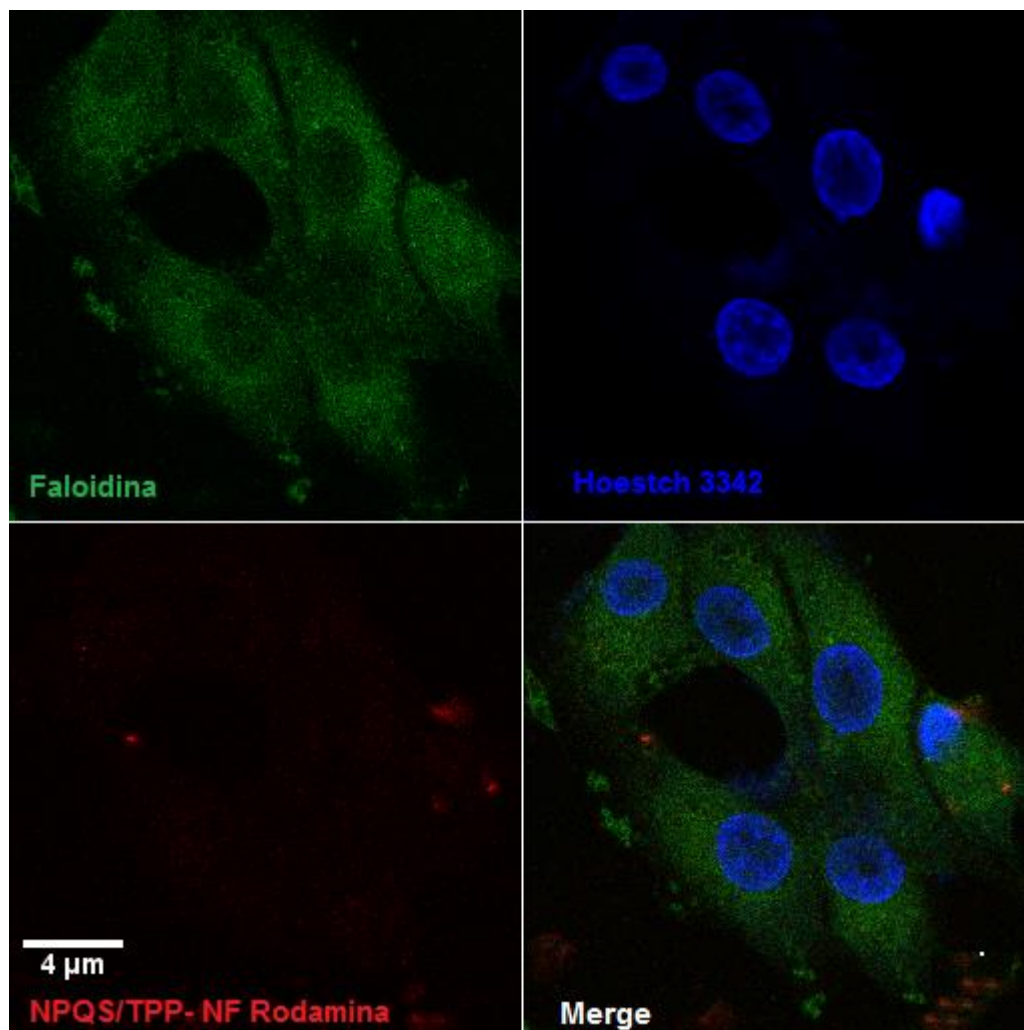
**Figura 64** - Avaliação da captação das NPQS/P-NF por microscopia confocal. Magnificação de 100 $\times$ .



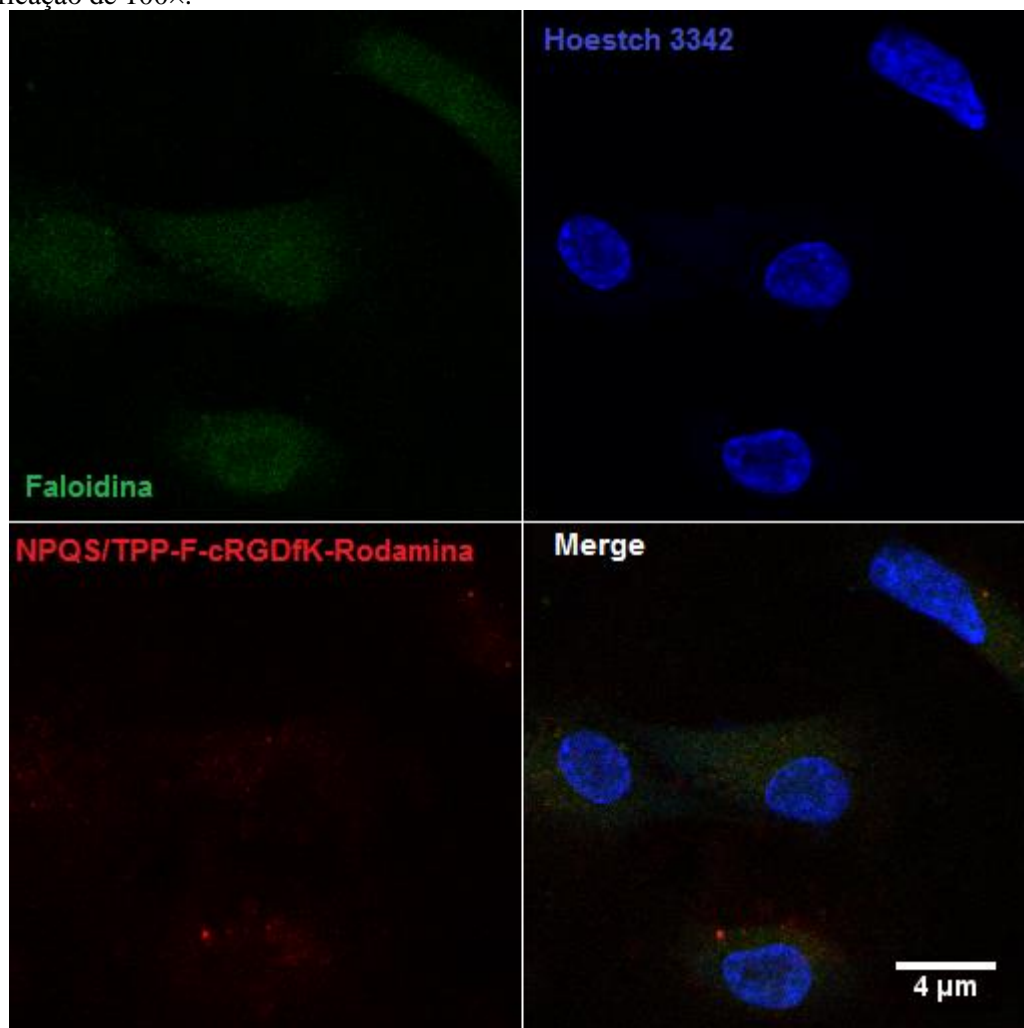
**Figura 65** - Avaliação da captação das NPQS/P-F com cRGDFK por microscopia confocal. Magnificação de 100 $\times$ .



**Figura 66** - Avaliação da captação das NPQS/TPP-NF por microscopia confocal. Magnificação de 100 $\times$ .



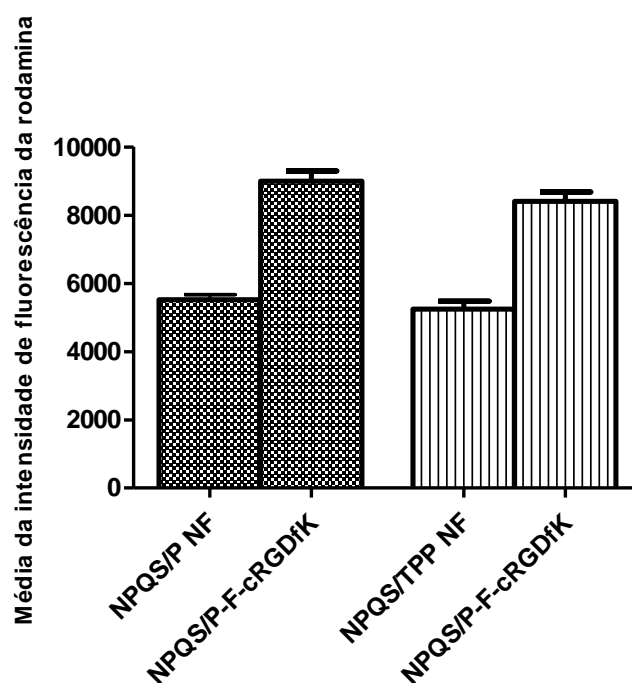
**Figura 67** - Avaliação da captação das NPQS/TPP-F com cRGDfK por microscopia confocal. Magnificação de 100×.



As fotomicrografias demonstram que as nanopartículas NPQS/P e NPQS/TPP funcionalizadas com cRGDfK apresentaram uma maior internalização intracelular do que as nanopartículas não funcionalizadas com este inibidor de integrina. A Figura 68 expressa a média da intensidade de fluorescência (somente para a rodamina), assim é possível visualizar a intensidade de fluorescência das diferentes nanopartículas e analisar qual obteve uma maior internalização, a análise foi realizada com o auxílio do software ImageJ®.

A análise estatística (ANOVA e Tukey's) revelou que ambas as nanopartículas funcionalizadas com cRGDfK apresentaram um aumento significativo ( $P > 0,05$ ) da internalização, o qual foi 1.6 vezes maior que as nanopartículas sem a presença do cRGDfK.

**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®. Resultados expressos para um total de 20.000 células (ANOVA,  $P > 0,05$ ).



Com os resultados obtidos é possível concluir que a presença de cRGDfK na superfície das nanopartículas promove um aumento da captação e internalização pelas células U87 devido a elevada expressão da integrinas  $\alpha_v\beta_3$  e  $\alpha_v\beta_5$ . Estes sistemas podem ser potenciais sistemas de liberação de fármacos antitumorais para terapia e diagnóstico nos GBMs.

### **5.8. Desenvolvimento de nanopartículas de carboximetilquitosana encapsuladas com Gd-DTPA como estratégia para a terapia e diagnóstico por imagem utilizando ressonância magnética de imagem**

Este item irá tratar do desenvolvimento e caracterização de nanopartículas de carboximetilquitosana encapsuladas com gadolínio-ácido dietilamino penataacético (DTPA) e funcionalizadas com a desintegrina vicrostatin como estratégia para o diagnóstico por imagem utilizando ressonância magnética de imagem. Serão abordadas as diferenças de tamanho de cadeia dos espaçadores de polietilenoglicol usados para acoplar a desintegrina

vicrostatin, e como este tamanho de cadeia pode influenciar na internalização das nanopartículas pelas células de glioma. Além disso, serão apresentadas as diferenças em termos de internalização quando esta desintegrina está presente na superfície das nanopartículas comparado com as nanopartículas que foram peguiladas mas não foram funcionalizadas com vicrostatin. Estes estudos foram realizados em colaboração com a University of Southern California, Los Angeles,. Os resultados não são muito detalhados porque são parte de uma patente que está em elaboração nos Estados Unidos.

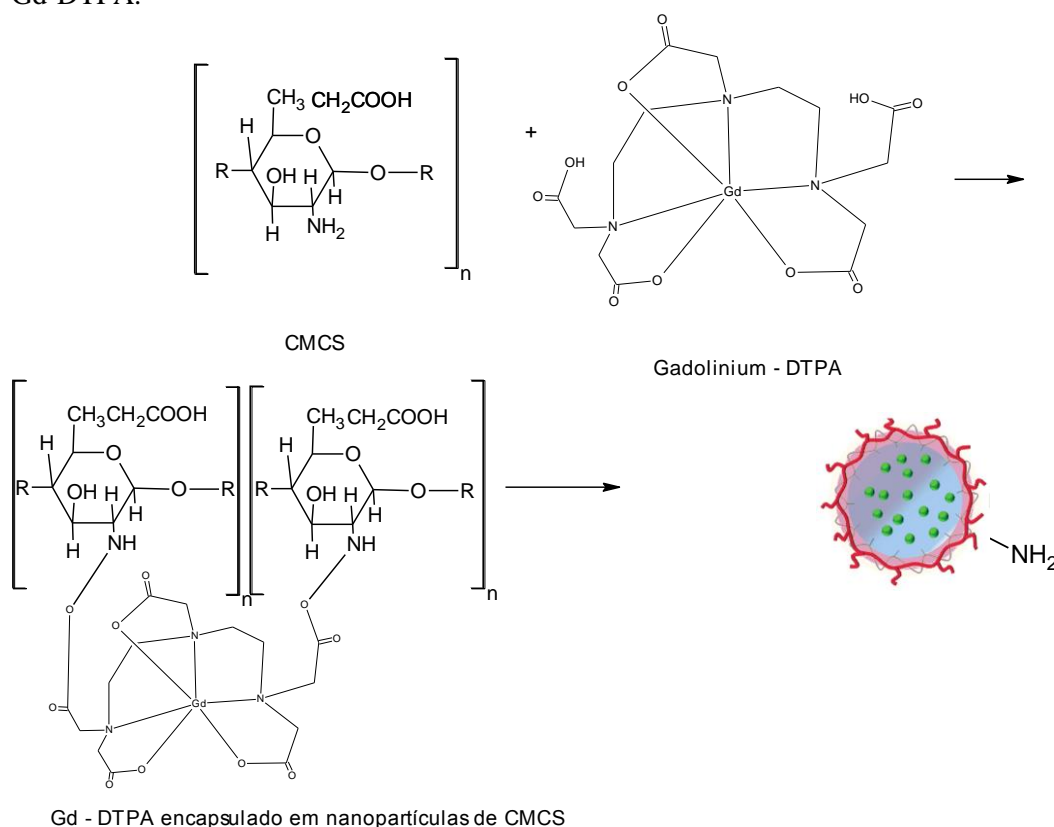
### **5.8.1. Desenvolvimento das nanopartículas de carboximetilquitosana encapsuladas com gadolínio-DTPA**

Nos últimos anos o uso de agentes de contraste para diagnóstico por imagem utilizando ressonância magnética de imagem (RMI) tem aumentado drasticamente na área de pesquisa e na prática clínica. O principal agente de contraste utilizado na clínica é o Magnevist® (469 mg.mL<sup>-1</sup> of Gd-DTPA-dimeglumina e 69 mg.mL<sup>-1</sup> de puro gadolínio), o qual tem sido administrado e mais de 20 milhões de pacientes nos últimos 10 anos de uso clínico.

É uma agente de contraste bastante estável, entretanto a sua forma convencional apresenta algumas limitações que são a rápida eliminação da circulação sanguínea e a não transposição de barreiras e o baixo acúmulo no tumor. Na tentativa de minizar esses problemas, o presente estudo teve como objetivo o desenvolvimento de nanopartículas de carboximetilquitosana (CMQS) encapsuladas com gadolínio-DTPA-dimeglumina (Gd-DTPA). Com o objetivo de aumentar a meia-vida do gadolínio e promover um aumento da internalização pelas células tumorais de GBMs, as nanopartículas de CMQS foram peguiladas como descrito no item 4.2.2, e serão funcionalizadas com a desintegrina vicrostatin. O objetivo é promover uma maior interação do sistema funcionalizado com as integrinas promovendo um aumento da internalização mediada por integrinas, esta estratégia pode levar ao um aumento da concentração do gadolínio no tumor levando a um aumento da sensibilidade e resolução do diagnóstico por RMI. Esta é uma estratégia promissora para ser usada como terapia e como diagnóstico por imagem em GBMs.

CMQS que é um polímero derivado da QS contém grupamentos carboxil e amino em sua estrutura, e é solúvel em pH fisiológico. Estas vantagens fizeram com que este polímero fosse escolhido para o desenvolvimento das nanopartículas com gadolínio-DTPA, uma vez que este agente de contraste deve ser administrado pela via endovenosa e apresenta-se estável somente em pH fisiológico. Estes grupamentos amino e carboxil foram explorados para o desenvolvimento das nanopartículas por meio de interações eletrostáticas dos grupamentos amino da CMQS com os grupos carboxílicos do Gadolínio-DTPA-dimeglumina. (INOUE et al., 1997; INOUE; YOSHIZUKA; OHTO, 1999), como é demonstrado na Figura 69.

**Figura 69** - Esquema da formação das nanopartículas e interação eletrostática entre CMQS e Gd-DTPA.



Fonte: Próprio Autor.

As nanopartículas de CMQS encapsuladas com Gd-DTPA apresentaram elevada encapsulação de gadolínio comparado com o Magnevist<sup>®</sup> utilizado na clínica. Enquanto que o Magnevist<sup>®</sup> apresenta 69 mg.mL<sup>-1</sup> de puro gadolínio, as nanopartículas de CMQS

apresentaram  $89 \text{ mg.mL}^{-1}$  de puro gadolínio, correspondendo a um aumento de 1,3 vezes a quantidade de puro gadolínio encapsulado. Estes resultados podem ser vantajosos, pois uma maior concentração de gadolínio pode promover um aumento das quantidades do agente de contraste no ambiente tumoral permitindo um aumento da sensibilidade do diagnóstico por RMI.

O diâmetro médio das nanopartículas de CMQS não encapsuladas e encapsuladas com Gd-DTPA foi analisado por espalhamento dinâmico de luz e os valores obtidos demonstraram que as nanopartículas apresentaram um diâmetro médio de aproximadamente 150-200 nm e um PDI de 0,35, o que indica uma homogeneidade na distribuição das nanopartículas.

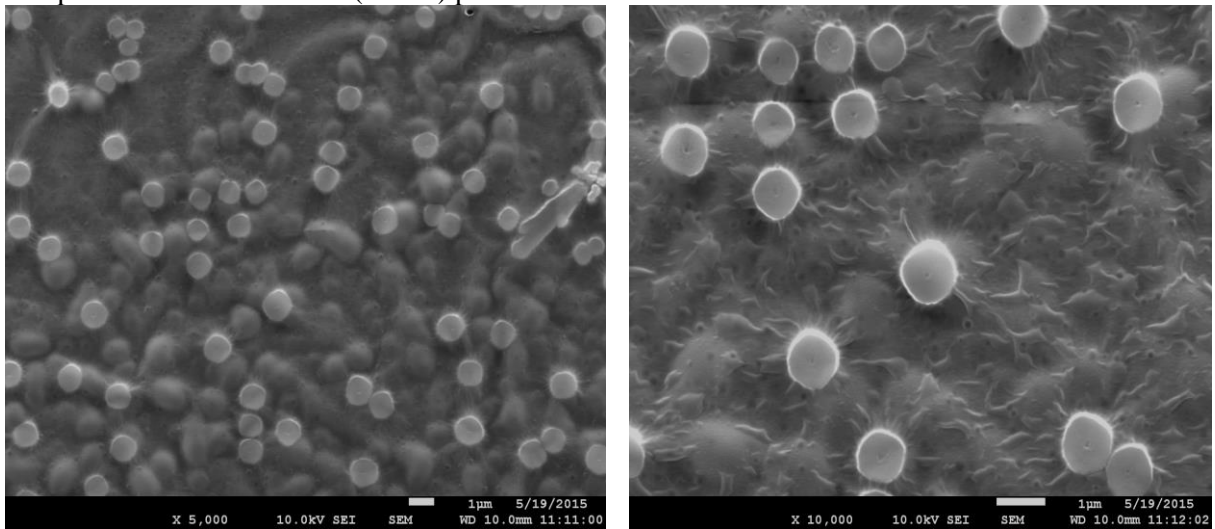
Este aspecto é de extrema importância para o tipo de vetorização que se pretende alcançar, uma vez que é geralmente aceito um intervalo entre 70 nm a 300 nm para sistemas coloidais vetorizados (JIANG et al., 2008). De fato, as nanopartículas com diâmetro inferior a 70 nm são rapidamente removidas da circulação sanguínea ao extravasarem pelos vasos sanguíneos, enquanto que as de diâmetro superior a 200 nm são sujeitas a mecanismos inespecíficos de filtração esplênica (DARRAS et al., 2010; KORKUSUZ et al., 2013; LIM et al., 2014).

Alguns estudos (DARRAS et al., 2010; KORKUSUZ et al., 2013; LIM et al., 2014) demonstraram que nanopartículas encapsuladas com Gd-DTPA que apresentaram diâmetro médio entre 100-300 nm obtiveram um aumento de 4 vezes na taxa de internalização pelo tumor e o aumento do acúmulo no ambiente tumoral levou a um aumento da sensibilidade da imagem por RMI e um aumento da eficiência terapêutica.

### **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)**

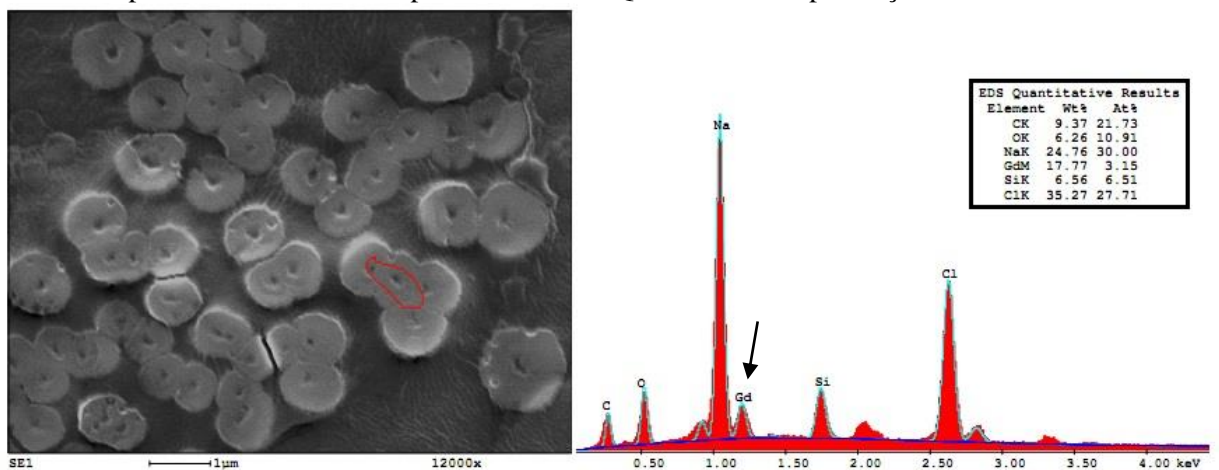
A morfologia das nanopartículas de CMQS e nanopartículas de CMQS encapsuladas com Gd-DTPA foram determinadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV), como mostrado na Figura 70. Observa-se que as nanopartículas são bastante monodispersas e apresentam-se com forma esférica.

**Figura 70** - Morfologia das nanopartículas de CMQS (esquerda) e nanopartículas de CMQS encapsuladas com Gd-DTPA (direita) por MEV.



A técnica de EDS foi utilizada para a análise elementar da presença de Gd nas nanopartículas de CMQS. Esta técnica utiliza um feixe de elétrons para ejetar elétrons das camadas internas da amostra, promovendo a exposição dos elétrons para as camadas exteriores na forma de raios X. A energia dos raios X liberados é específico para determinados elementos. A Figura 71 demonstra que o Gd está presente nas nanopartículas de CMQS.

**Figura 71** - Espectro de EDS das nanopartículas de CMQS mostrando a presença de Gd.

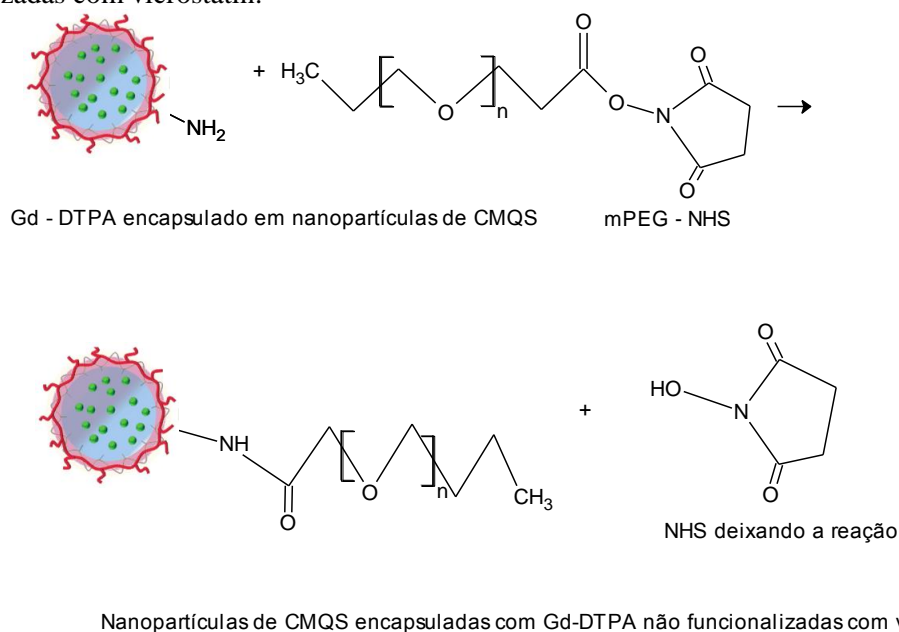


### 5.8.3. Desenvolvimento das nanopartículas de CMQS encapsuladas com Gd-DTPA não funcionalizadas e funcionalizadas com vicrostatin e análise do diâmetro médio das nanopartículas

A modificação da superfície das nanopartículas de CMQS encapsuladas com Gd-DTPA foram desenvolvidas utilizando o metoxil-PEG (2k e 5k) e o maleimida-PEG (2k e 5k), o grupamento N-hidroxissuccinimida (NHS) do maleimida-PEG será utilizado para bioconjugação do vicrostatin na superfície das nanopartículas.

Inicialmente foram desenvolvidas as nanopartículas de CMQS com Gd-DTPA não funcionalizadas. Essas nanopartículas foram desenvolvidas por uma reação com o metoxil-PEG-NHS (mPEG-NHS), em que os grupamentos NHS reagiram com amins primárias desprotonados da CMQS por ataque nucleofílico e o NHS foi liberado na forma como é demonstrado na Figura 72.

**Figura 72** - Desenvolvimento de nanopartículas de CMQS encapsuladas com Gd-DTPA não funcionalizadas com vicrostatin.

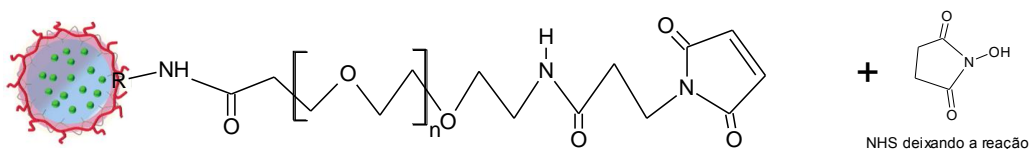
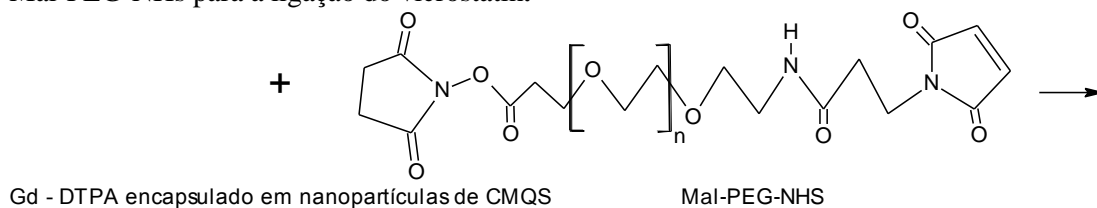


Fonte: Próprio Autor.

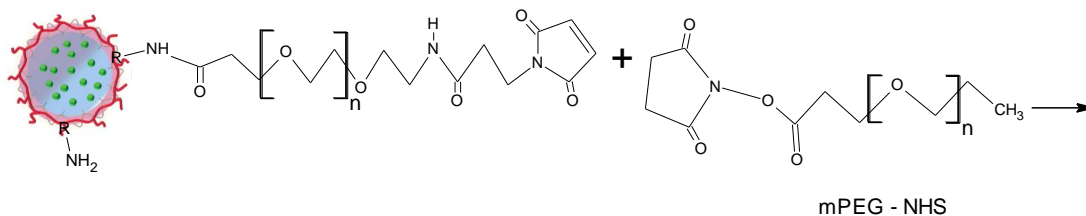
A segunda etapa foi o desenvolvimento das nanopartículas funcionalizadas com vicrostatin por meio de interações com os grupos maleimida do maleimida-PEG-NHS (Mal-PEG-NHS). A reação ocorreu como mostra a Figura 73. Primeiramente, as

nanopartículas foram incubadas durante 2 horas com um excesso de Mal-PEG-NHS, e após este período, o mPEG-NHS foi adicionado nas nanopartículas e incubado por mais 2 horas. Os grupamentos NHS do mPEG-NHS também irão reagir com grupamentos amino livres das nanopartículas.

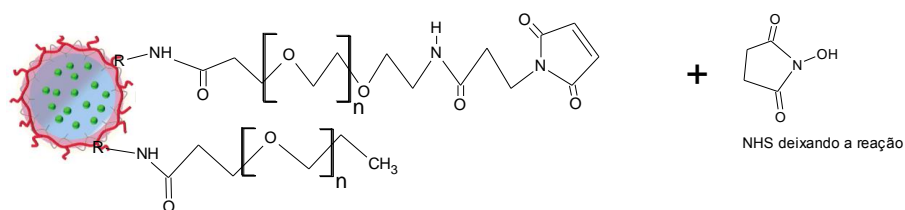
**Figura 73** - Funcionalização da superfície das nanopartículas de CMQS-Gd-DTPA com Mal-PEG-NHs para a ligação do microstatin.



Funcionalização das nanopartículas de CMQS- Gd-DTPA com Mal-PEG-NHS



Nanopartículas de CMQS- Gd-DTPA funcionalizadas com Mal-PEG-NHS



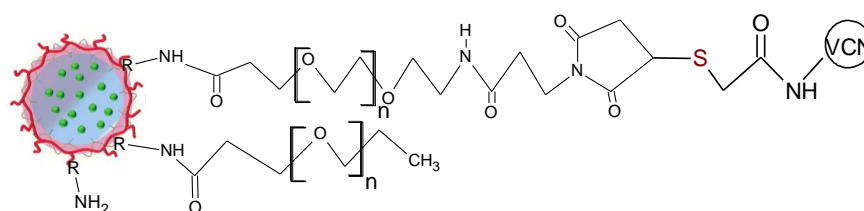
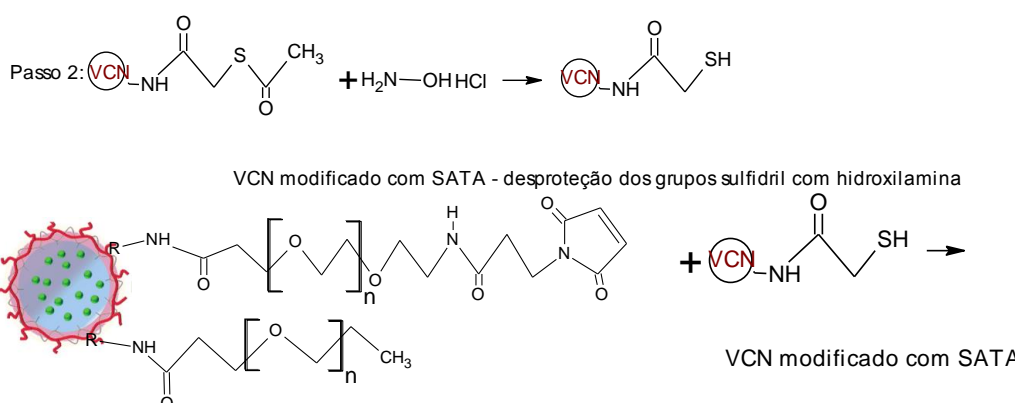
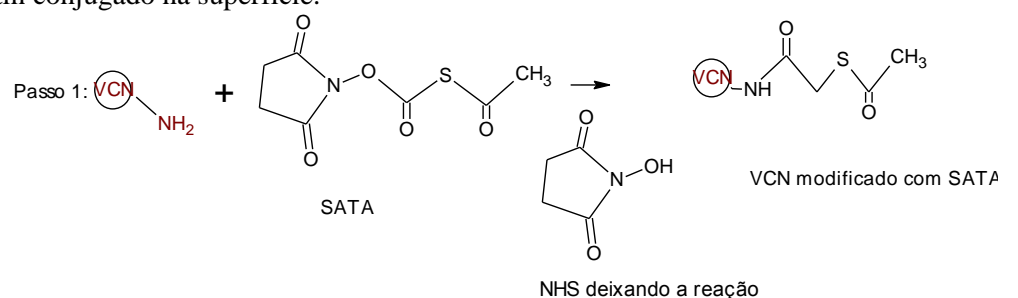
Nanopartículas de CMQS- Gd-DTPA funcionalizadas com Mal-PEG-NHS e mPEG-NHS

Fonte: Próprio Autor.

Após a modificação da superfície das nanopartículas com Mal-PEG-NHS e mPEG-NHS, o microstatin foi modificado com N-succinimidil S-acetiltioacetato (SATA), e os

grupos NHS terminais do SATA reagiram com grupamentos amino da desintegrina formando uma ligação amida estável. O vicrostatin que foi modificado com o SATA passou a ter grupos sulfidril protegidos, que foram desprotegidos com hidroxilamina. O acoplamento do vicrostatin ocorreu entre os grupos maleimida do Mal-PEG-NHS nas nanopartículas com os grupos sulfidril da cisteína (aminoácido terminal) formando uma ligação covalente estável como é mostrado na Figura 74.

**Figura 74** - Modificação do vicrostatin com SATA e funcionalização das nanopartículas com vicrostatin conjugado na superfície.

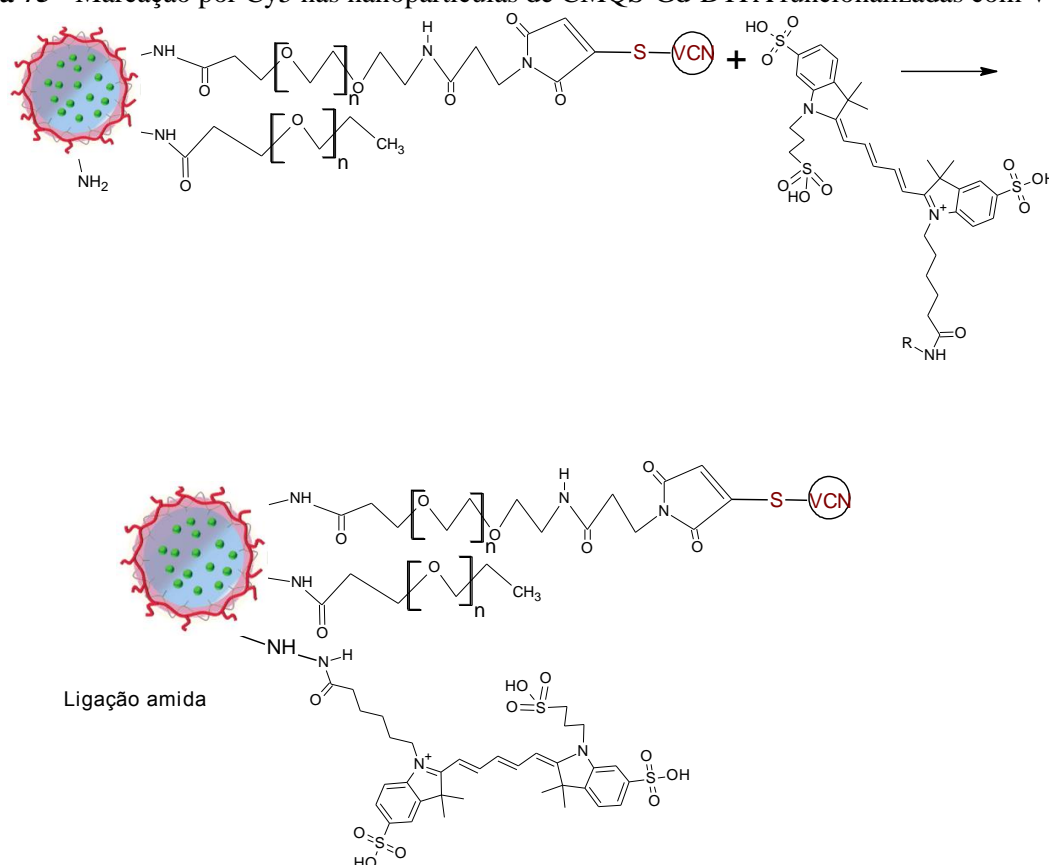


Passo 5: Nanopartículas de CMQS-Gd-DTPA funcionalizadas com VCN

Fonte: Próprio Autor.

A última etapa de modificação das nanopartículas não funcionalizadas e funcionalizadas com VCN foi a marcação com cianina-5-NHS (Cy5), que é um marcador de fluorescência amino reativa e também reage com grupos aminos por meio de ataque nucleofílico formando uma ligação estável. A Figura 75 mostra a reação entre as nanopartículas funcionalizadas com VCN e a Cy-5.

**Figura 75** - Marcação por Cy5 nas nanopartículas de CMQS-Gd-DTPA funcionalizadas com VCN.



Passo 6: Marcação com Cy5 nas nanopartículas de CMQS-Gd-DTPA funcionalizadas com VCN

Fonte: Próprio Autor.

O diâmetro médio das nanopartículas não funcionalizadas e funcionalizadas com VCN foram avaliados pela técnica de espalhamento dinâmico de luz. Os resultados estão demonstrados na Tabela 31. Após a funcionalização das nanopartículas os diâmetros médios ficaram entre 200-250 nm, observa-se que houve um aumento no diâmetro comparado com as nanopartículas de CMQS iniciais. O tamanho da cadeia de PEG (2k e 5k) parece ter

influência na distribuição granulométrica das nanopartículas. As nanopartículas funcionalizadas com PEG 2k obtiveram populações com menor diâmetro médio, o que poderá estar relacionado com o seu menor peso molecular (GREF et al., 1995).

**Tabela 31** - Determinação do diâmetro médio das nanopartículas não-funcionalizadas e funcionalizadas com VCN.

VCN (mg)	Mal-PEG-NHS	mPEG-NHS	Diâmetro médio (nm) ± DP	PdI
5,5	2k (30% of 20-fold)	2k (70% of 20-fold)	220 ± 1,4	0,41 ± 1,1
5,0	5k (30% of 20-fold)	5k (70% of 20-fold)	245 ± 1,2	0,43 ± 0,4
—	—	2k (100% of 20-fold)	214 ± 2,7	0,40 ± 1,9
—	—	5k (100% of 20-fold)	229 ± 3,1	0,42 ± 1,6

O diâmetro das nanopartículas se mostrou adequado para vetorização do sistema, o diâmetro é de extrema importância para conseguir atravessar a barreira hematoencefálica e se ligar aos receptores que são as integrinas expressas nos glioblastomas levando a um aumento da captação e internalização das nanopartículas pelos GBMs (KIM et al., 2008; MASSERINI, 2013; OLIVIER, 2005).

#### **5.8.4. Avaliação da captação das nanopartículas de carboximetilquitosana funcionalizadas com vicrostatin em células U87 e U251 por citometria de fluxo**

A fim de obter uma estimativa quantitativa da captação das nanopartícula pelas células U87 e U251 e avaliar as diferenças na captação de nanopartículas não funcionalizadas e funcionalizadas com VCN, a internalização das nanopartículas foi analisada por citometria de fluxo. As células U87 e U251 foram incubadas com VCN-Cy5, com nanopartículas não funcionalizadas e funcionalizadas com VCN e marcadas com Cy5.

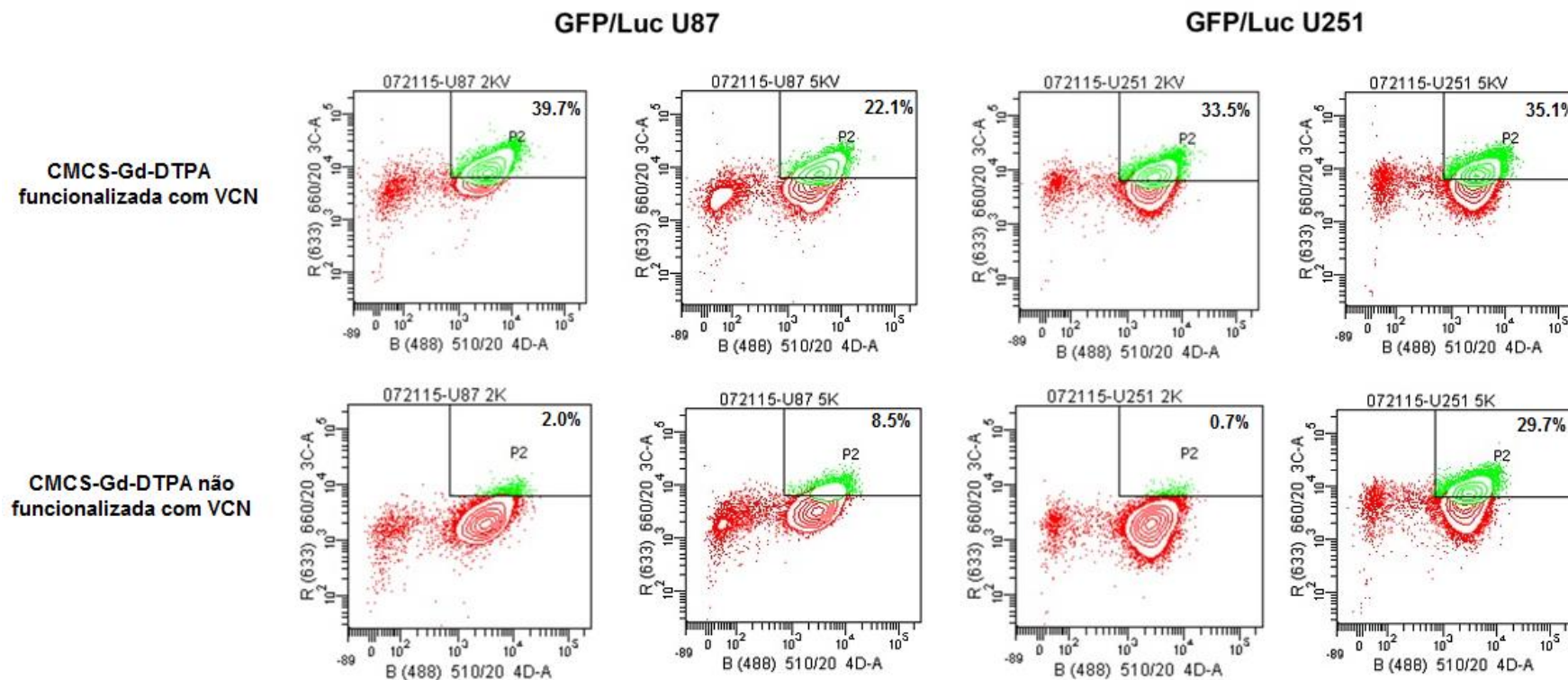
Na Figura 76 é possível observar que em ambas as células de GBMs a captação das nanopartículas peguiladas com PEG de alto peso molecular é diminuída, enquanto que as nanopartículas peguiladas com PEG de baixo peso molecular sofrem uma maior captação. Em relação as nanopartículas funcionalizadas com VCN, nota-se que há uma aumento da

captação quando o VCN está na superfície das nanopartículas e esta captação pode ser mediada pela interação com as integrinas expressas na superfície das células de GBMs.

Outra característica que deve ser levada em consideração é a diferença de tamanho das nanopartículas não funcionalizadas com PEG 2k e 5k, esta diferença pode ter contribuído para uma diminuição da captação e internalização intracelular das nanopartículas com PEG 5k, este fato pode ser devido a limitação na capacidade de difusão das nanopartículas através das células (GREF et al., 2000).

Porém, ao contrário das nanopartículas não funcionalizadas, as nanopartículas funcionalizadas com PEG 2k e 5k, apesar das diferenças de diâmetro, mostraram uma boa captação e internalização via endocitose. Ao analisarmos as diferentes linhagens e os diferentes pesos moleculares do PEG, notamos que as células U87 teve uma maior captação e internalização intracelular e que nanopartículas com PEG 2k nestas linhagens também apresentaram maior captação e internalização quando comparado com células U251, sugerindo que neste caso a maior internalização pelas células U87 pode ser devido a maior expressão das integrinas  $\alpha_v\beta_3$  e  $\alpha_v\beta_5$  nestas células que estão mediando o processo de internalização.

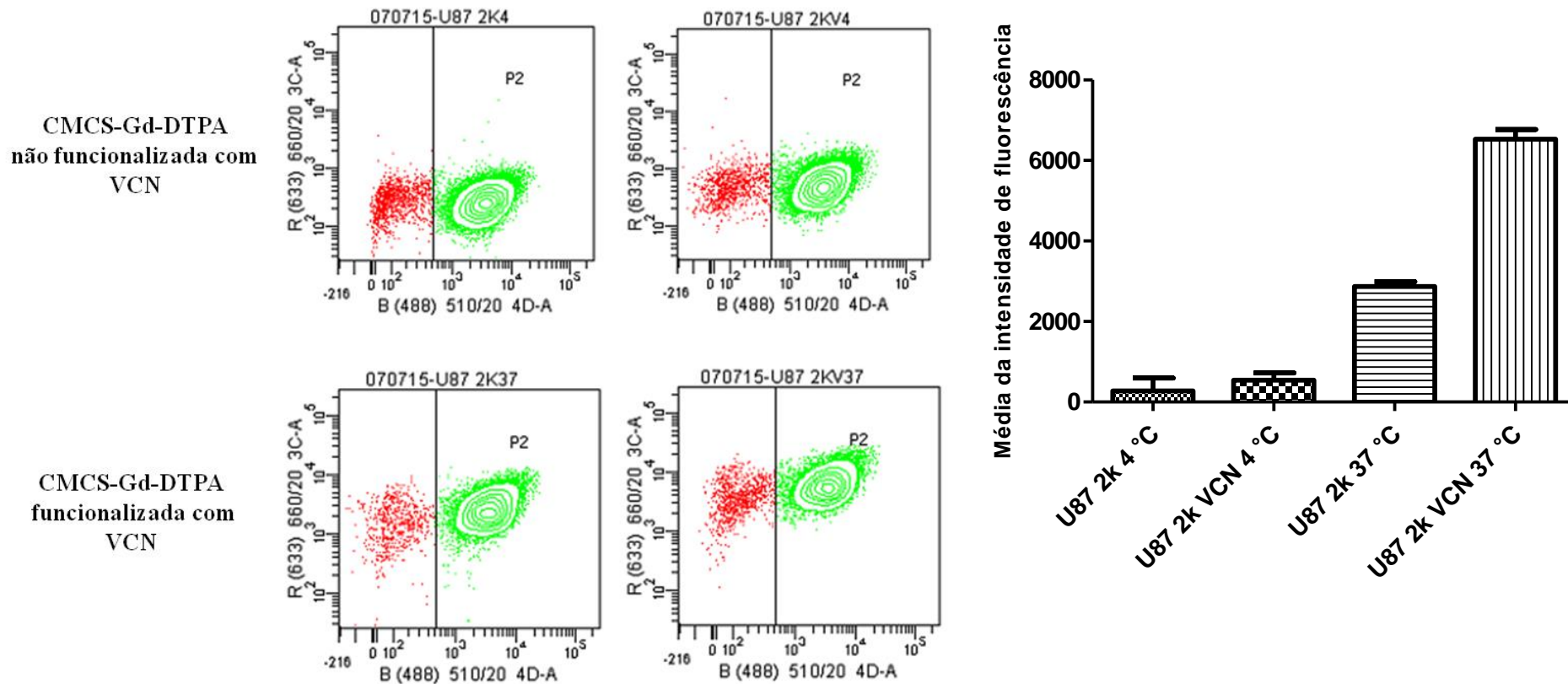
Figura 76 - Estudo de captação por citometria de fluxo em células U87 e U251 GFP/Luc.



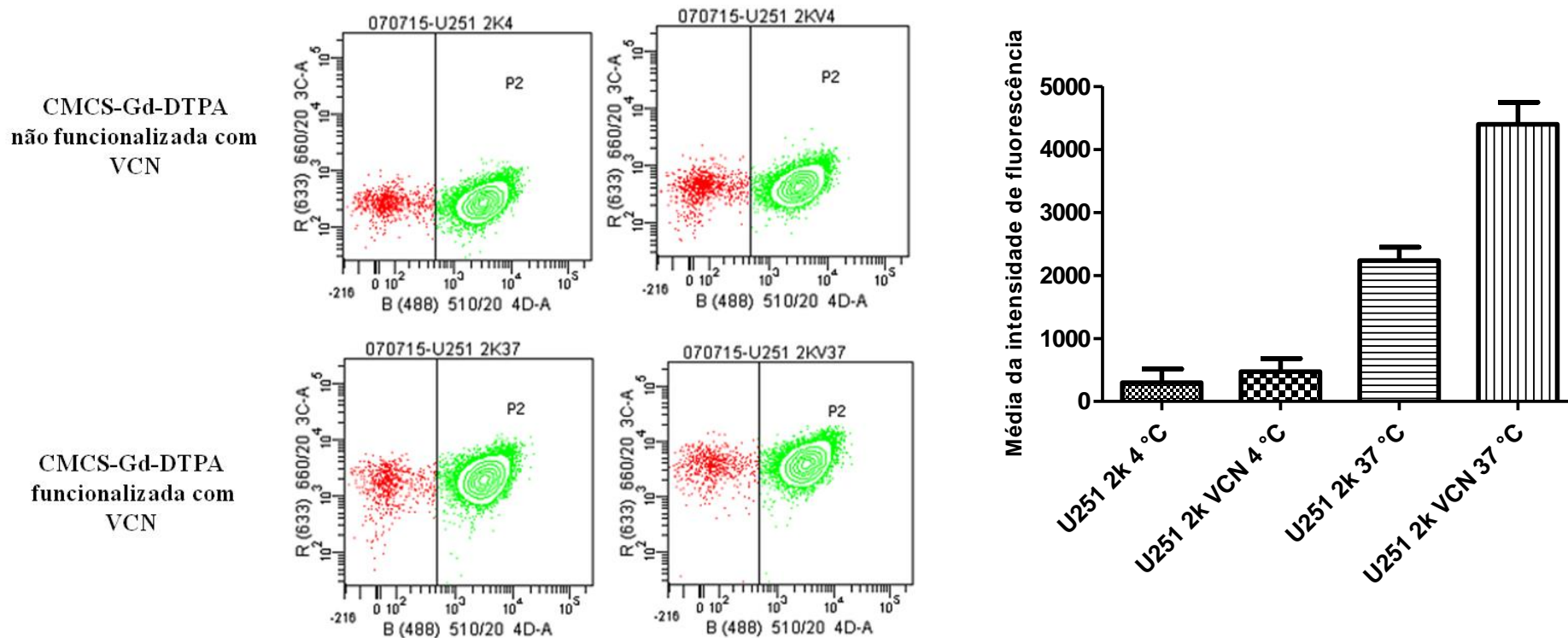
Os experimentos seguintes tem o objetivo de demonstrar que a endocitose é um processo dependente de energia, os experimentos de captação e internalização intracelular foram realizados a 4 °C e comparados com as células mantidas a 37 °C. Ao analisarmos as Figuras 77 e 78 que comparam a internalização a 4 °C e 37 °C observamos que a média de intensidade de fluorescência das nanopartículas não funcionalizadas diminuiu em torno de 7× para as células U251 e 10 vezes para as células U87 quando mantidas a 4 °C. O mesmo padrão pode ser observado para as nanopartículas funcionalizadas com VCN, quando mantidas a 4 °C a captação e a internalização diminui em 9× para as células U251 e 12 vezes para as células U87, esta diferença também pode ser associada ao padrão de expressão das integrinas  $\alpha_v\beta_3$  e  $\alpha_v\beta_5$  que são expressas em maior quantidade nas células U87 fazendo com que ocorra uma diminuição maior da captação que é mediada pelo receptor.

Com estes resultados podemos concluir que o processo de captação e internalização intracelular das nanopartículas que é mediado por integrinas é um processo dependente da temperatura e que a presença de VCN na superfície das nanopartículas promove um aumento de até 2,5× na captação das nanopartículas pelas células U251 e U87 comparado com as nanopartículas não funcionalizadas.

**Figura 77** - Estudo de captação em células U87 das nanopartículas não funcionalizadas e funcionalizadas com VCN em função da temperatura. Total de 20,000 células. (ANOVA,  $P > 0,05$ ).



**Figura 78** - Estudo de captação em células U251 das nanopartículas não funcionalizadas e funcionalizadas com VCN em função da temperatura. Total de 20,000 células (ANOVA,  $P > 0,05$ ).



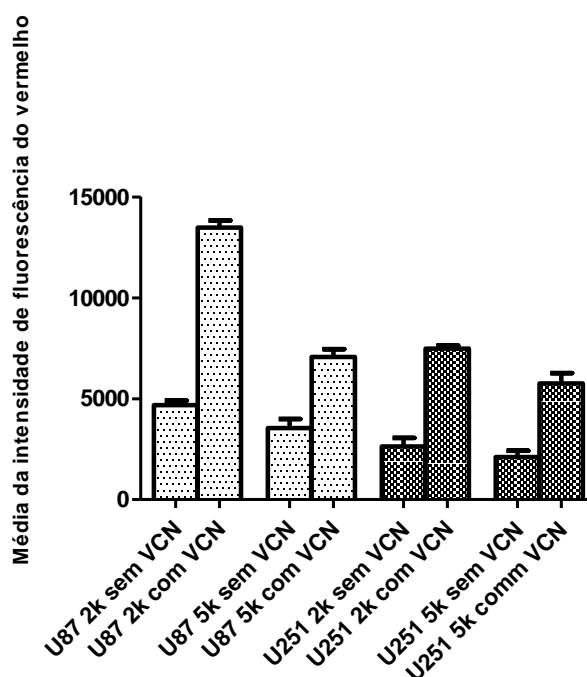
### 5.8.5. Avaliação da captação das nanopartículas de carboximetilquitosana funcionalizadas com vicostatina em células U87 e U251 por microscopia confocal

A Figura 79 mostra as diferenças de internalização das nanopartículas não funcionalizadas e funcionalizadas com VCN. Ambas as nanopartículas estão marcadas com Cy5 e desta forma apresentam-se na imagem em vermelho, o citoplasma está em verde devido a presença da proteína verde fluorescente (GFP) e o núcleo da célula foi corado com DAPI apresentando-se em azul. As imagens foram obtidas com aumento de 100 $\times$ .

Através das fotomicrografias pode-se observar que, aparentemente as amostras contendo VCN em ambas as células foram internalizadas em maior quantidade que aquelas que não continham a desintegrina. A Figura 79 expressa a média da intensidade de fluorescência (somente para o vermelho) sendo possível a visualização desses resultados de maneira mais clara, a intensidade de fluorescência foi obtida com auxílio do software ImageJ<sup>®</sup>.

Uma análise estatística (ANOVA e Tukey's) revelou que ambas as nanopartículas funcionalizadas com VCN apresentaram um aumento significativo ( $P > 0,05$ ) da internalização que foi 2 $\times$  maior que as nanopartículas sem a presença da desintegrina (Figura 80).

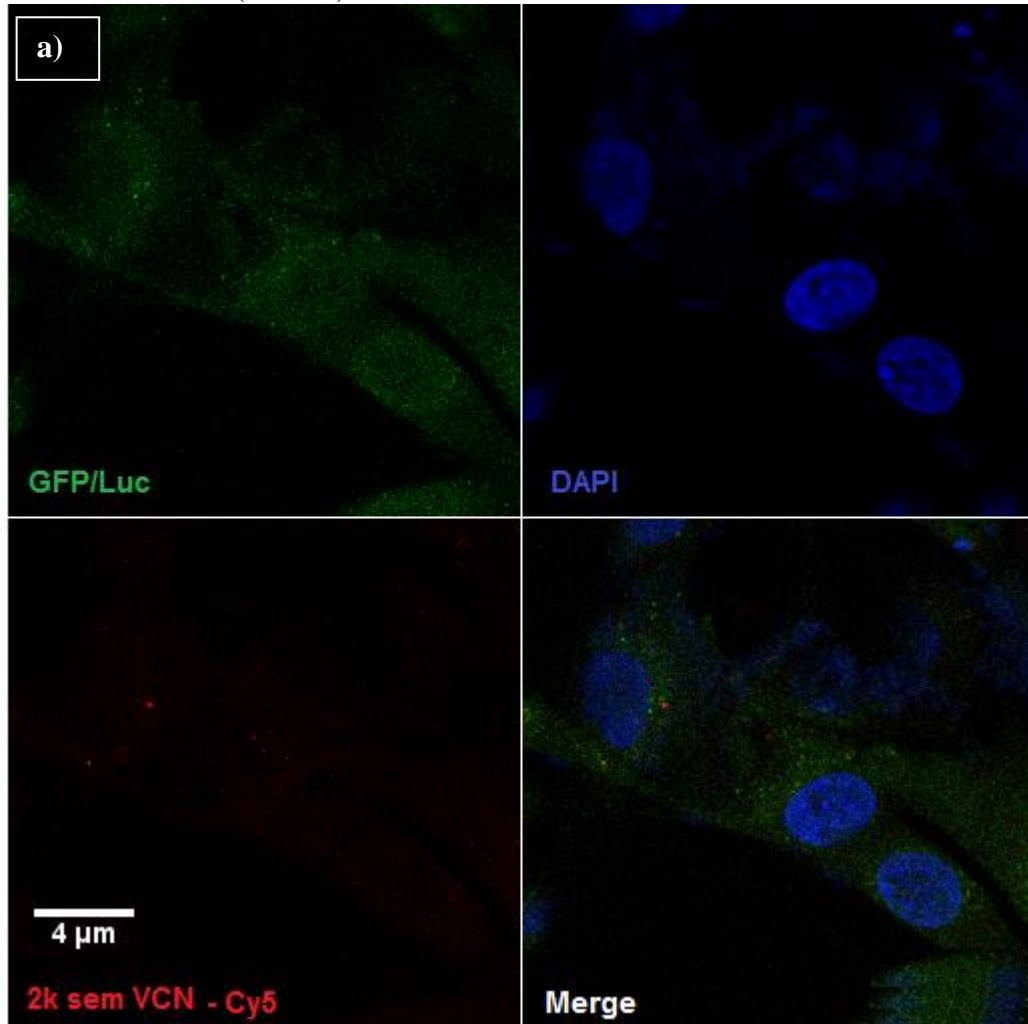
**Figura 79** - Comparação da captação das nanopartículas não funcionalizadas e funcionalizadas com VCN através da média de intensidade de fluorescência (vermelho) com auxílio do software ImageJ<sup>®</sup>. (ANOVA,  $P > 0,05$ ).

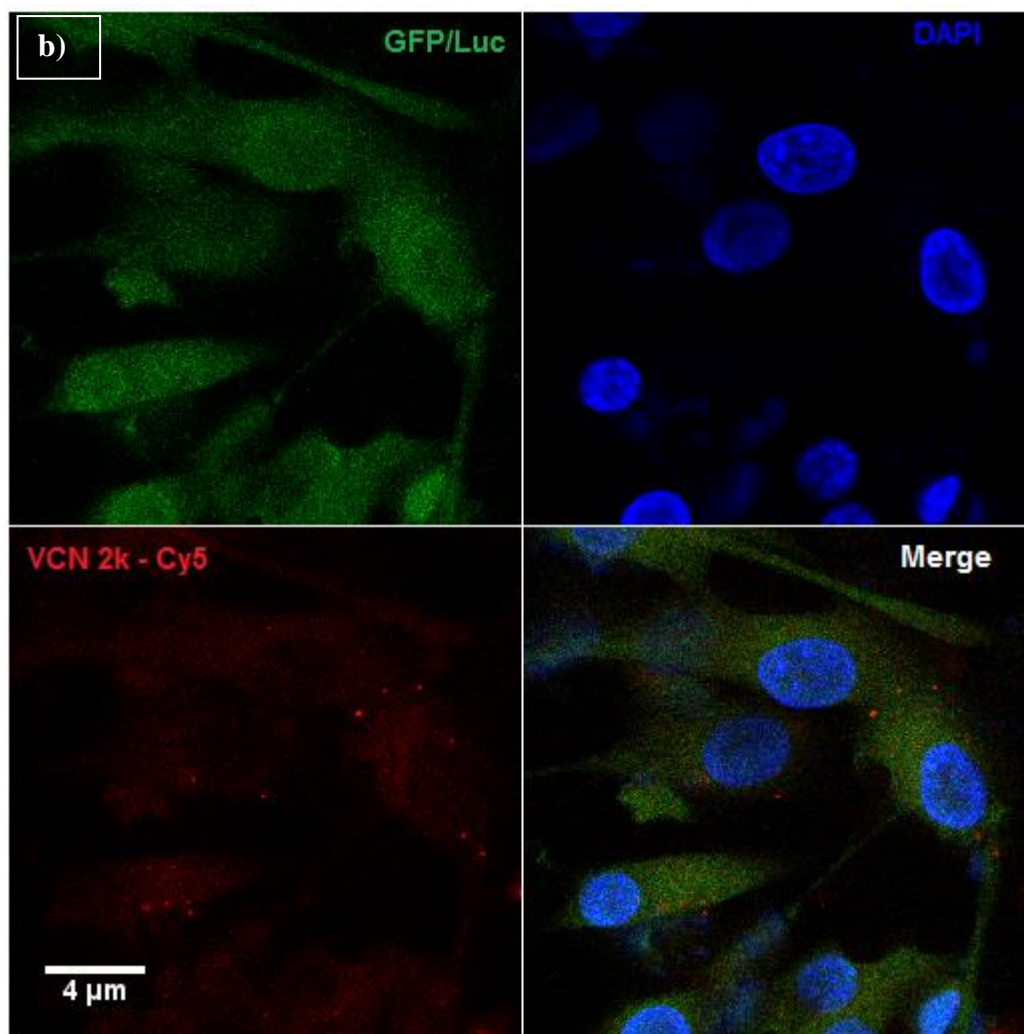


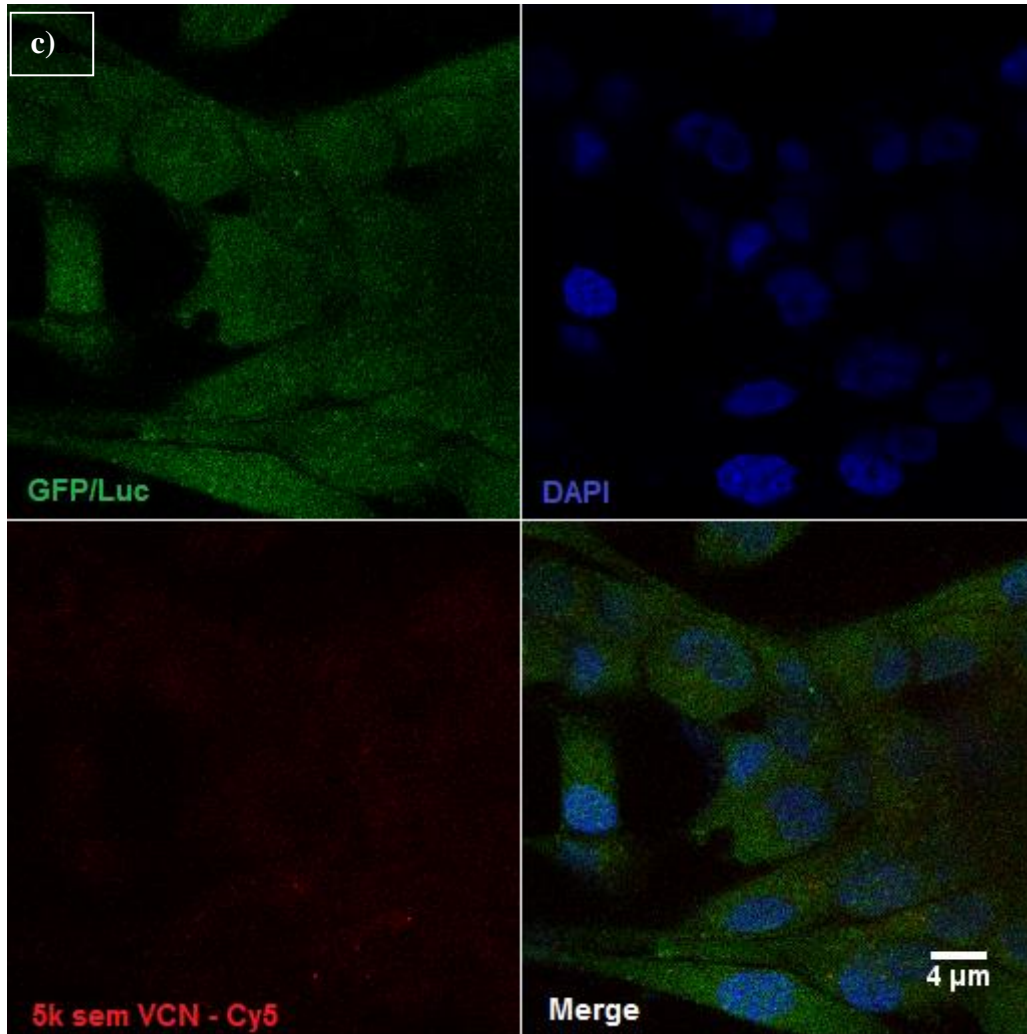
Na Figura 80 é possível visualizar a presença das nanopartículas não funcionalizadas e funcionalizadas com VCN no interior das células, presentes no citoplasma celular e próximo do núcleo. De acordo com os resultados obtidos, notamos que o tamanho da cadeia de PEG (2k e 5K) presente em ambas as nanopartículas parece ser essencial para a captação e aumento da internalização, esses resultados estão de acordo com os dados obtidos por citometria de fluxo onde observamos uma maior internalização das nanopartículas com PEG 2k tanto pelas células U87 quanto pelas células U251 quando comparadas com as nanopartículas funcionalizadas com PEG de maior cadeia (5k).

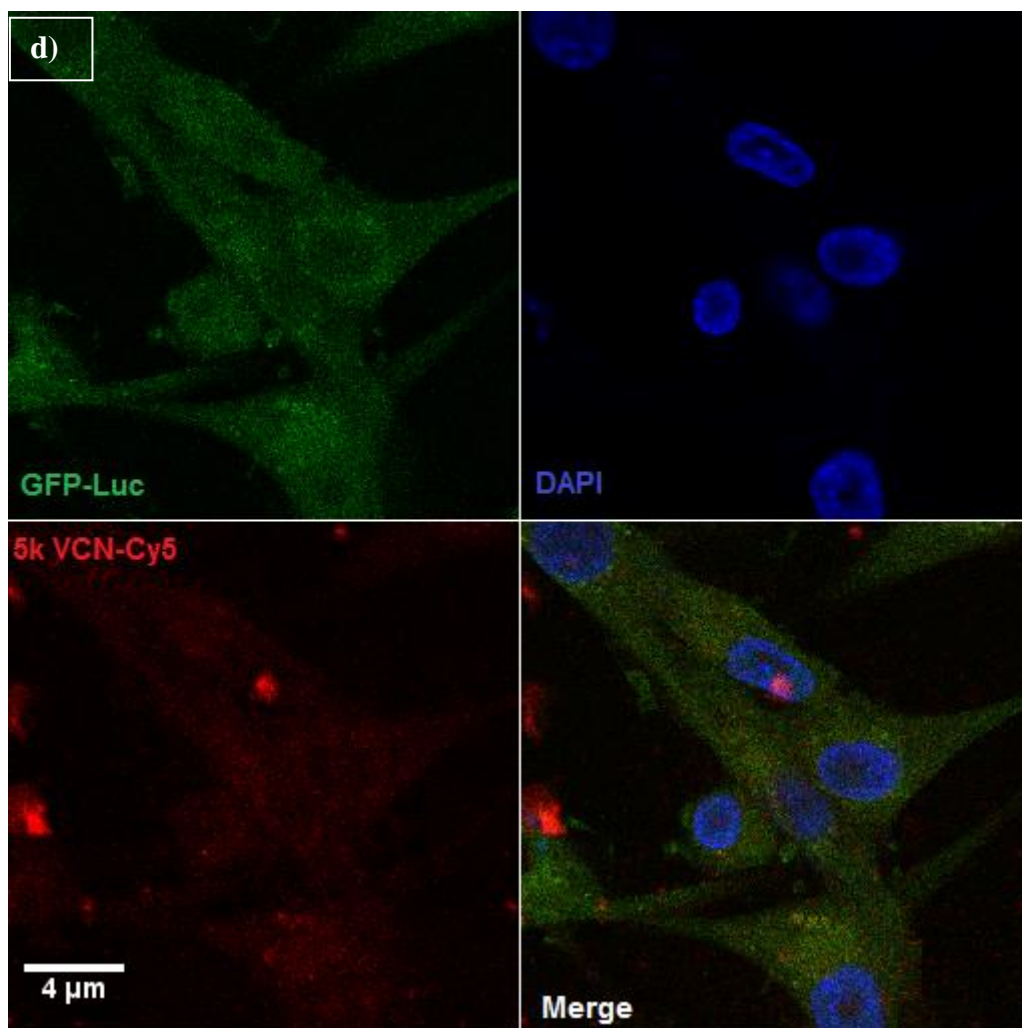
Uma vez que as nanopartículas de CMQS funcionalizadas com cRGDfK são promissoras candidatas como carreadores de fármacos ou agentes de contraste usados em ressonância magnética, um requisito mínimo para estas e outras aplicações biológicas é a capacidade destas estruturas de entrar e permanecer nas células sem serem reconhecidas e degradadas. Para avaliar a presença das nanopartículas internalizadas nas células U87 e U251, a microscopia confocal foi empregada.

**Figura 80** - Avaliação da captação das nanopartículas não funcionalizadas e funcionalizadas com VCN em células U87 e U251. a) nanopartículas CMQS-Gd-DTPA não funcionalizadas (PEG 2k); b) nanopartículas CMQS-Gd-DTPA funcionalizadas com VCN (PEG 2k); c) nanopartículas CMQS-Gd-DTPA não funcionalizadas (PEG 5k) e d) nanopartículas CMQS-Gd-DTPA funcionalizadas com VCN (PEG 5k).









Portanto, conclui-se que as nanopartículas de CMQS funcionalizadas com VCN que foram modificadas com PEG de menor cadeia (2k) apresentaram um aumento da captação e internalização mediado por integrinas quando comparado com as nanopartículas com PEG de maior cadeia (5k). Ambos os sistemas funcionalizados com vicrostatin podem ser potenciais sistemas de entrega do Gd-DTPA para o ambiente tumoral quanto pode ter sua captação aumentada pelos vasos devido a elevada expressão da integrina  $\alpha_v\beta_3$  nos novos vasos formados nos GBMs, principalmente porque é um tumor altamente vascularizado e a angiogênese é elevada. Esta estratégia pode promover um aumento da concentração do Gd-DTPA nos GBMs e nos vasos próximos ao tumor promovendo um aumento da eficácia e sensibilidade do diagnóstico por meio de RMI.

## 6. DISCUSSÃO

O desenvolvimento de nanopartículas multifuncionais, que combinam vários componentes visando desempenhar diferentes funções no meio biológico, tem sido amplamente discutido na literatura. Uma estratégia que vem ganhando projeção no campo da nanotecnologia é o delineamento racional de sistemas multifuncionais de liberação de fármacos em que na concepção do sistema a função biológica é levada em consideração. O objetivo é a obtenção de sistemas capazes de desempenhar funções específicas para que contribua com a resposta biológica. Neste contexto, as respostas farmacológicas ou farmacodinâmicas podem ser devido ao conjunto de fármaco e sistemas, que de forma modulada podem melhorar a eficiência da terapia. Sistemas teranósticos, por exemplo, combinam a função diagnóstica e terapêutica em uma única plataforma.

O delineamento do sistema de liberação multifuncional constitui um grande desafio da nanobiotecnologia nos dias atuais. Em nanoescala os fenômenos físicos e o comportamento desses sistemas sofrem diversas influências e interações químicas e biológicas até atingir o alvo desejado. Assim, o conceito de delineamento racional associando as questões de nano-biointerface na obtenção de sistemas de liberação multifuncionais que apresentam propriedades de interesse tem sido amplamente utilizado. Por outro lado, a busca por síntese de sistemas que possam apresentar características estruturais adequadas para atingir a resposta biológica almejada é bastante desafiadora. Ao considerar esta proposição, devemos buscar associar por meio de hipóteses as propriedades que serão controladas no sistema de liberação com as funções desejadas. Adicionalmente, o desenvolvimento de sistemas contendo peptídeos ou proteínas impõe obstáculos ainda maiores, não só do ponto de vista de estabilidade estrutural como também do efeito terapêutico.

No caso do delineamento racional de nanopartículas multifuncionais para terapia antitumoral encapsuladas e/ou acoplados inibidores de integrinas RGD proposto nesta tese, há a necessidade de uma abordagem mais criteriosa em relação à estabilidade e a função biológica que podem limitar a ação terapêutica dessas macromoléculas. Essa limitação está diretamente relacionada à natureza dinâmica das interações não covalentes que mantém a integridade da estrutura dos peptídeos/proteínas importante para a função biológica. A alteração dessas interações pode significar a diminuição ou perda da atividade devido à diminuição da afinidade ou interação com o receptor. Assim, o entendimento sobre

fundamentos físico-químicos característicos das interações não covalentes pode ajudar no desenvolvimento racional das nanopartículas multifuncionais.

Com essa linha de raciocínio em mente, fica evidente que se utilizarmos o delineamento racional no desenvolvimento de nanopartículas multifuncionais, tanto os aspectos tecnológicos para que elas tenham características físico-químicos desejáveis quanto os aspectos biológicos devem ser facilmente compreendidos e otimizados, para que as nanopartículas mantenham sua funcionalidade até atingirem o alvo desejado.

No caso da via nasal, proposta como rota de administração neste trabalho, o grande desafio é o delineamento de nanopartículas multifuncionais que após a administração sejam capazes de alcançar o cérebro. A transposição de barreiras biológicas é desafiadora, pois o muco se tornará o primeiro obstáculo para as nanopartículas. É essencial que as nanopartículas delineadas fiquem aderidas ao muco o tempo suficiente para que sejam capazes de transpor essa barreira e atingir o cérebro até chegar no alvo, neste caso, os GBMs.

A via nasal tem recebido especial atenção como rota promissora para liberação de fármacos ou peptídeos no cérebro devido a possibilidade de tratamento de doenças complexas como os GBMs (AULTON, 2005; ILLUM, 2003; MAINARDES et al., 2006). O reconhecimento do potencial da via nasal tem conduzido a um grande aumento nas pesquisas neste campo nas últimas duas décadas. A lista de produtos no mercado ou em vários estágios de desenvolvimento pré-clínico e clínico está sempre em crescimento. Há uma ampla gama de peptídeos administrados por via nasal no mercado como calcitonina (Miacalcin, Novartis e Fortical, Unigene), desmopressina (Desmospray, Ferring), buserelina (Suprecur, Sanofi-Aventis), nafarelina (Synarel, Pharmacia), oxitocina (Syntocinon, Unites Pharmacies UK) e muitos estudos envolvendo insulina, interferon, glucagon e vacinas contra influenza, sarampo e poliomielite têm sido realizados (UGWOKE et al., 2005; ILLUM, 2012).

A via nasal tem sido amplamente estudada como estratégia para atingir o sistema nervoso central. Apesar dos mecanismos envolvendo o transporte direto cavidade nasal-cérebro não serem completamente entendidos, resultados experimentais sugerem que estão envolvidos com as conexões dos nervos olfatório e trigeminal. Essa abordagem vem consolidando a via nasal como uma rota alternativa para evitar a barreira hematoencefálica (BHE). Estudos demonstram que os fármacos administrados por via nasal atingem o SNC por meio das vias nervosas olfativas que se localizam na porção superior da cavidade nasal, na região olfativa. Devido ao ambiente único do epitélio olfativo, é possível que fármacos

administrados por via nasal atinjam o SNC através de mecanismos de transporte ao longo dos nervos olfativos (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 medicamentos 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 em que o fármaco é transportado com fluidos dos canais perineurais e atinge o SNC em questão de minutos (RAPOPORT, WINNER, 2006; TALEGAONKAR, MISHRA, 2004). Assim, estudos nessa área abrem uma vertente para o tratamento de patologias que acometem o SNC, como o GBMs.

A transposição de barreiras biológicas complexas é um dos maiores alvos dos cientistas envolvidos com desenvolvimento de sistemas de liberação. O conhecimento das particularidades anatômicas e fisiológicas envolvidas na BHE é de fundamental importância para o entendimento dos mecanismos de interação com as nanopartículas. A partir desse conhecimento, podem ser elaborados sistemas mais adequados, visando-se interações favoráveis que sejam capazes de melhorar a resposta biológica almejada. A BHE, apesar de possuir uma extensão bem menor em relação a outras barreiras biológicas, constitui-se um dos maiores obstáculos existentes para o transporte das nanopartículas. Essa barreira atua como uma potente estrutura seletora de substâncias que adentram o cérebro. Portanto, o tratamento de doenças que afligem o sistema nervoso central (SNC), como os GBMs, representa um grande obstáculo.

A existência de um epitélio com grande área superficial e um grande número de microvilosidades somados à presença de uma camada subepitelial altamente vascularizada podem facilitar a absorção de proteínas e peptídeos por via nasal. Apesar do potencial da via nasal como rota para a administração de fármacos e peptídeos/proteínas, fatores relacionados aos mecanismos de depuração mucociliar, o qual remove rapidamente a formulação da cavidade nasal, limitam a absorção dos fármacos, peptídeos ou proteínas (MAINARDES et al., 2006). A fim de contornar esse problema e, conseqüentemente, retardar a remoção da formulação pela depuração mucociliar, a propriedade mucoadesiva do sistema é uma função importante para facilitar o acesso ao SNC por meio da via nasal.

O objetivo principal do trabalho foi desenvolver nanopartículas multifuncionais contendo inibidores de integrinas, que estão superexpressas em células de GBMs promovendo uma diminuição da proliferação celular. Neste trabalho as nanopartículas mucoadesivas baseadas em QS, as quais tem a finalidade de aumentar o contato entre a formulação e o local de absorção na cavidade nasal, foram desenvolvidas. Moléculas catiônicas como a QS 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 a base do mecanismo proposto para polímeros catiônicos, cuja mucoadesão é estabelecida pelas interações eletrostáticas com os grupos siálicos da mucina presente no muco (BRAVO-OSUNA et al., 2007). Mazzarino e colaboradores (2014) observaram, em ensaios *in vitro*, que as nanopartículas de policaprolactona decoradas com QS na superfície das nanopartículas foi fundamental para promover a mucoadesão com a mucina por meio de interações com grupamentos amino da QS e cargas negativas atribuídas aos grupos siálicos da mucina.

Na primeira etapa, o planejamento fatorial foi empregado como ferramenta para o desenvolvimento racional de nanopartículas de QS, as interações supramoleculares entre os componentes das nanopartículas foram avaliados a fim de obter nanopartículas com diâmetro médio entre 50-250 nm, estes parâmetros, presença de QS e tamanho, são importantes para que as partículas tenham como função a mucoadesão, para que permaneçam mais tempo na cavidade nasal, aumentando assim sua capacidade de transpor a rota naso-cerebral.

Neste estudo, nanopartículas multifuncionais baseadas em QS foram desenvolvidas pela técnica de gelificação ionotrópica utilizando dois diferentes agentes reticulantes, o TPP e polifosfato de sódio, contendo inibidores de integrinas RGD encapsulados ou acoplados na superfície das nanopartículas. O planejamento fatorial foi empregado como uma estratégia para o desenvolvimento racional de nanopartículas nos quais têm como alvo as integrinas superexpressas em GBMs. Os parâmetros como tamanho e carga superficial foram avaliados já que a carga superficial é capaz de interagir com o muco após administração nasal e aumentar o tempo de permanência.

Foram preparadas nanopartículas com diâmetros médios de até 250 nm e potencial zeta elevado (acima de +30 mV), parâmetros teóricos descritos por Barua, Mitragotri, 2014 como sendo diâmetros adequados para interagir com a mucosa nasal e auxiliar no acesso ao SNC.

As nanopartículas de QS com os diferentes fosfatos foram caracterizadas por RMN a fim de avaliar o modo de formação das nanopartículas baseados nas diferenças estruturas entre o TPP, em que fosfato estão dispostos em cadeia linear e o polifosfato que é um fosfato de cadeia cíclica. Os dados de RMN de fósforo revelaram que o polifosfato foi hidrolisado durante a formação das nanopartículas, portanto houve uma predominância das unidades de fosfato terminais ( $\text{PO}_4^- = \text{Q}^1$ ), enquanto que a formação das nanopartículas de QS com TPP ocorreu por interações com as unidades do fosfato do meio de cadeia, as espécies do tipo  $\text{Q}^2$ , formadas pelas unidades de pirofosfato ( $\text{P}_2\text{O}_7^{4-}$ ).

Em virtude dessas nanopartículas de QS encapsuladas com os inibidores de integrinas cRGDFV e cRGDFK terem sido desenvolvidas para serem administradas por via nasal, é importante que ocorra interação entre elas e a mucina, a qual é responsável por promover a mucoadesão das nanopartículas de QS. Nesse estudo, os resultados apresentados na Tabela 27 e 28 mostraram que o objetivo foi atingido, e alta eficiência de interação com a mucina (87-95%) foi observada. Em estudos de mucoadesão realizados por Barbi e colaboradores (2015), as nanopartículas de QS reticuladas com TPP apresentaram-se mucoadesivas tanto em experimentos *in vitro*, utilizando dispersões de mucina, e em modelo *ex vivo*, utilizando mucosa nasal suína. Pedreiro (2015) desenvolveu nanopartículas de QS reticuladas com ftalato de hidroxipropilmetilcelulose e realizou estudos de adsorção com mucina e estudos *in vitro* com células Caco-2. Nos estudos de adsorção com mucina foi observado que o aumento do reticulante promoveu um aumento da adsorção das nanopartículas de QS com a mucina, levando a uma maior mucoadesão. Nos estudos *in vitro* com células Caco-2, o pré-tratamento das nanopartículas de QS incubadas com mucina, promoveu um aumento da interação das nanopartículas com as células Caco-2.

O desenvolvimento de sistemas de liberação com propriedades bio(muco)adesivas tem avançado consideravelmente dentro do campo da tecnologia farmacêutica nas últimas décadas. O conhecimento adquirido pelos pesquisadores vem proporcionando o delineamento mais racional de nanopartículas construídas a partir de polímeros mucoadesivos. Por exemplo, nesse estudo a QS foi selecionada por sua habilidade de interagir com a mucina. Por outro lado, também é possível a modificação da superfície das nanopartículas de QS com polímeros hidrofílicos tais como o PEG, que favorecem a interpenetração das nanopartículas nas camadas mais profundas do muco devido a baixa interação do PEG com componentes do muco, permitindo, assim, que as nanopartículas contendo os peptídeos possam acessar o SNC

pela via nasal. Um estudo realizado por Malhorra e colaboradores (2013) desenvolveram nanopartículas de QS modificadas com PEG para liberação de iRNA no cérebro após administração nasal. Foi observado que a presença de PEG promove uma maior interpenetração das nanopartículas de QS no muco. Além disso, observou-se que após 4 horas da administração intranasal em camundongos, as nanopartículas modificadas com PEG e incorporadas com iRNA foram detectadas no cérebro dos camundongos. O mecanismo pelo qual as nanopartículas conseguiram ser chegar no cérebro está associado com a passagem pelo nervo olfatório que liga a cavidade nasal ao cérebro.

Portanto, após o desenvolvimento das nanopartículas de QS, a superfície dessas nanopartículas foram modificadas com PEG, tanto por meio de interações supramoleculares quanto por ligações covalentes, sendo a última necessária para o acoplamento do peptídeo cRGDFK na superfície das nanopartículas com o objetivo de direcioná-las para o ambiente tumoral. A partir dessas diferenças no tipo de ligação (supramolecular e covalente) foi possível estudar a influência dos inibidores de integrinas encapsulados ou acoplados na superfície da nanopartícula em relação às respostas biológicas tais como a mucoadesão, citotoxicidade e mecanismos de captação em células de GBMs.

Nesse estudo, observou-se que a modificação da superfície das nanopartículas de QS com PEG por interação supramolecular não promoveu uma diminuição significativa da interação com a mucina (Tabela 28). A pegulação das nanopartículas pode aumentar a difusão do sistema através do muco, promovendo a mucoadesão por meio da formação de ligações de hidrogênio com a mucina (ENSIGN; CONE; HANES, 2012), as nanopartículas contendo PEG apresentem características importantes. Estudos realizados por Mokarram e Alonso (2006) também mostraram que as nanopartículas de QS modificadas com PEG por interação supramolecular promoveu um aumento do tempo de residência das nanopartículas na mucosa nasal, além disso, essas nanopartículas foram capazes de atravessar a mucosa nasal após administração intranasal e promoveram liberação sustentada de um antígeno contra difteria toxóide, sendo considerado um possível sistema de imunização por via nasal.

Nos estudos de citotoxicidade e captação em células de U87 de GBMs, as nanopartículas de QS e as nanopartículas de QS modificadas com PEG por ligação supramolecular e encapsuladas com os inibidores de integrinas não foram internalizadas por endocitose, além de não apresentarem interações específicas com as integrinas expressas na superfície das células de GBMs. Observamos que os peptídeos encapsulados apresentaram

menor efeito citotóxico que os peptídeos em solução, ou seja, a encapsulação dos peptídeos diminuiu a citotoxicidade sobre as células de GBMs. Na avaliação da captação e nos estudos de competição das nanopartículas de QS e das nanopartículas de QS modificadas supramolecularmente com PEG, observou-se que ambas as nanopartículas encapsuladas com os cRGDfV e cRGDfK sofreram internalização mediada por mecanismos passivos. A presença do PEG na superfície das nanopartículas promoveu uma diminuição da captação pelas células de GBMs (Figura 54). A confirmação do mecanismo de captação foi determinada por meio do estudo de competição, em que as integrinas expressas pelas células GBMs foram previamente saturadas com o competidor cRGDfC, foi observado que a internalização das nanopartículas não foi reduzida (Figuras 55 e 56). Os resultados em conjunto sugerem que a encapsulação dos inibidores de integrinas RGD apesar de apresentarem vantagens como a proteção dos peptídeos, apresentou uma desvantagem em relação aos parâmetros biológicos que foi a diminuição da interação com as integrinas expressas na superfície das células de GBMs e a diminuição tanto da citotoxicidade quanto da internalização. Uma segunda estratégia foi adotada para que o objetivo proposto nesta tese fosse alcançado.

A segunda etapa utilizou as nanopartículas de QS selecionadas a partir do planejamento fatorial para serem modificadas por ligações covalentes com metoxil-PEG e maleimida-PEG para funcionalização com cRGDfK na superfície. O objetivo é aumentar a especificidade de interação do cRGDfK com as integrinas superexpressas nas células de GBMs a fim de conferir uma maior seletividade e direcionamento dessas nanopartículas para o ambiente tumoral.

A funcionalização de nanopartículas com biomoléculas como os inibidores de integrinas RGD representam uma estratégia interessante. O acoplamento destas biomoléculas na superfície das nanopartículas pode promover um maior direcionamento das nanopartículas para interagir de forma mais específica com as integrinas superexpressas na superfície dos GBMs, aumentar a captação das nanopartículas pelas células de GBMs e promover um efeito citotóxico mais elevado que irão promover uma diminuição da proliferação celular nos GBMs. O peptídeo cRGDfK foi escolhido para ser acoplado a superfície das nanopartículas de QS devido as suas características estruturais como a presença de um grupamento amino terminal do aminoácido lisina que permite sofrer modificações químicas para ser acoplado a

superfície das nanopartículas. O peptídeo cRGDfV conta somente com um grupamento metila terminal que não permite modificações químicas.

A funcionalização das nanopartículas também devem ser delineadas de forma racional pois o acoplamento do peptídeo cRGDfK apresenta alguns obstáculos que podem ter impactos significativos sobre a eficácia terapêutica, uma vez que essas macromoléculas podem alterar a carga de superfície, tamanho e a polaridade das nanopartículas. Outro grande desafio é a manutenção da estabilidade das nanopartículas durante o processo de conjugação com as biomoléculas. Portanto, a escolha de uma estratégia de acoplamento de forma racional depende da estabilidade da nanopartícula, dos grupos funcionais, das condições de bioconjugação (pH e temperatura), já com relação ao cRGDfK é importante controlar sua orientação para assegurar que este permaneça ativo após a conjugação com as nanopartículas e interaja com as integrinas na superfície dos GBMs.

As nanopartículas de QS foram funcionalizadas covalentemente com PEG e conjugadas com o peptídeo cRGDfK em sua superfície. Neste caso o PEG foi empregado como espaçadores heterobifuncionais, ou seja, eles foram inseridos na superfície das nanopartículas. Os espaçadores heterobifuncionais de PEG foram usados para conjugar o cRGDfK por meio da formação de uma ligação covalente entre a biomolécula e a superfície da nanopartícula por reações com grupos N-hidrosuccinamida (NHS), que reage por ataque nucleofílico com grupos amina do cRGDfK e da nanopartícula. O acoplamento do cRGDfK de forma covalente fornecerá uma maior estabilidade de ligação com as nanopartículas além de melhorar a afinidade do peptídeo com as integrinas (WANG et al., 2008). A bioconjugação através de ligação covalente com PEG é mais complexa que a peguilação empregada de forma supramolecular, mas pode resultar em conjugados com melhor especificidade.

Os resultados *in vitro* de citotoxicidade em células U87 de GBMs demonstraram que a presença do cRGDfK na superfície apresentou um efeito equivalente ao peptídeo em solução, o que demonstra que o acoplamento foi efetivo e a importância do cRGDfK estar na superfície para interagir com as integrinas expressas nas células de GBMs e promover um efeito citotóxico elevado. Nos experimentos de captação por citometria de fluxo, os resultados indicam que a presença do cRGDfK na superfície das nanopartículas promoveu um aumento do direcionamento e captação pelas células U87 de GBMs, os resultados condizem com os experimentos de citotoxicidade pois o cRGDfK apresenta alta afinidade por

integrinas que estão na superfície das células tumorais, inibindo e bloqueando a sua função nas células.

Recentes avanços em nanotecnologia têm expandido nossa habilidade para desenvolver nanopartículas multifuncionais que combinem especificidade e funções terapêuticas e de diagnóstico em um único complexo nanoestruturado. Estes materiais, chamados de "teranósticos", têm se mostrado interessantes para diversas aplicações, principalmente no diagnóstico precoce e tratamento de doenças como câncer.

Na terceira etapa foi proposto o desenvolvimento de nanopartículas teranósticas de um derivado de quitosana (CMQS) encapsuladas com o agente de contraste, o gadolínio, e modificadas por ligações covalentes com metoxil-PEG e maleimida-PEG para funcionalização com a desintegrina vicrostatin na superfície com o mesmo objetivo de promover um maior direcionamento das nanopartículas teranósticas e assim, promover uma maior eficácia no diagnóstico por RMI. O agente de contraste paramagnético Gd-DTPA tem sido muito utilizado em imagiologia por ressonância magnética de imagem (RMI), no entanto, este agente tem algumas limitações que fazem dele um candidato para ser encapsulado em nanopartículas. 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 baixa sensibilidade de diagnóstico em RMI.

As nanopartículas de CMQS foram desenvolvidas por interações eletrostáticas entre a CMQS e o agente de contraste. Essas nanopartículas encapsuladas com Gd-DTPA foram peguiladas covalentemente com PEG 2k e 5K e a desintegrina vicrostatin foi acoplado na superfície das nanopartículas a fim de promover um direcionamento para o ambiente tumoral, por meio de interações com as integrinas. A desintegrina vicrostatin foi escolhida devido a suas potentes propriedades anti-tumorais, antiangiogênicas e pró-apoptóticas em células de GBMs que já vem sendo estudadas desde o ano 2000 pelo grupo de pesquisa do Dr. Markland e Minea da University of Southern California (MINEA et al., 2010).

A caracterização físico-química das nanopartículas de CMQS demonstrou que foi possível obter nanopartículas com tamanhos entre 100-250 nm, apresentando uma morfologia esférica e homogênea, com essas propriedades também foi confirmado a presença de gadolinio nas nanopartículas pela técnica de EDS (Figura 70).

A peguilação das nanopartículas de CMQS com diferentes tamanhos de PEG (2k e 5k) levou a uma diferença na internalização das nanopartículas de CMQS encapsuladas com Gd-DTPA. As nanopartículas desenvolvidas com PEG de menor cadeia (2k) obtiveram um aumento significativo da internalização pelas células U87 e U251 quando comparadas com as nanopartículas desenvolvidas com PEG 5k. A diferença de tamanho entre o PEG 2k e 5k pode ter contribuído para uma diminuição da captação e internalização intracelular das nanopartículas com PEG 5k, este fato pode ser devido a limitação na capacidade de difusão das nanopartículas através das células (GREF et al., 2000).

Nos resultados obtidos por microscopia confocal, foi possível confirmar que a presença do vicrostatin na superfície das nanopartículas promoveu um aumento da captação e internalização pelas células de GBMs. Estes estudos de captação e internalização podem indicar que as nanopartículas de CMQS funcionalizadas com vicrostatin podem ser utilizadas como potenciais sistemas teranósticos para a entrega direcionada de Gd-DTPA nos GBMs, devido a elevada expressão de integrinas no tumor, por outro lado, o aumento da quantidade de gadolínio levará a uma maior especificidade no diagnóstico por RMI.

A partir dos resultados expostos, podemos concluir que as nanopartículas de QS e CMQS funcionalizadas com os inibidores de integrinas na superfície se mostraram mais promissoras em relação as nanopartículas de QS encapsuladas com os inibidores de integrinas, sendo assim, estas nanopartículas funcionalizadas podem ser exploradas como carreadores de outros fármacos antitumorais promovendo um efeito sinérgico nos GBMs, pois além do efeito sobre a diminuição da proliferação celular via interação com integrinas, podemos obter um efeito citotóxico mais elevado e direcionado para o ambiente tumoral.

O delineamento racional das nanopartículas para tratamento de GBMs foi feito baseando-se em ações que as nanopartículas deve desempenhar nas barreiras e nos alvos. Os três tipos de nanopartículas foram sintetizadas e caracterizadas em relação às suas propriedades coloidais e sempre tendo como foco sua funcionalidade para que essas nanopartículas atingissem o alvo desejado por meio das interações com as integrinas superexpressas nos GBMs.

## 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-ARAÚJO, 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. Virostatin - 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.