UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”

INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

RAQUEL BESTER LISZBINSKI

TRANSPORTE DE 5-FLUOROURACIL POR NANOPARTÍCULAS DE OURO FUNCIONALIZADOS COM ANTICORPOS CONTRA RECEPTORES DE FATORES DE CRESCIMENTO EPIDÉRMICO (EGFR E HER2)

Botucatu, SP

2018

RAQUEL BESTER LISZBINSKI

TRANSPORTE DE 5-FLUOROURACIL POR NANOPARTÍCULAS DE OURO FUNCIONALIZADOS COM ANTICORPOS CONTRA RECEPTORES DE FATORES DE CRESCIMENTO EPIDÉRMICO (EGFR E HER2)

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Instituto de Biociências de Botucatu da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Ramon Kaneno

Co-orientadora: Graziela Gorete Romagnoli Castilho

Botucatu, SP

2018

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Liszbinski, Raquel Bester.
Transporte de 5-fluorouracil por nanopartículas de ouro funcionalizados com anticorpos contra receptores de fatores de crescimento epidérmico (EGFR e HER2) / Raquel Bester Liszbinski. - Botucatu, 2018

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu
Orientador: Ramon Kaneno
Coorientador: Graziela Gorete Romagnoli Castilho
Capes: 90300009

1. Fluoruracila. 2. Cólon (Anatomia) - Câncer. 3. Anticorpos monoclonais. 4. Nanotecnologia. 5. Nanomedicina. 6. Nanopartículas.

Palavras-chave: 5-fluorouracil; Câncer colorretal; anticorpos monoclonais; nanocarreadores; nanopartículas de ouro.

Dedico esse trabalho a Deus, que em sua infinita sabedoria me guiou até aqui. Aos meus amados pais Mauro e Marli e minha irmã Rita, que mesmo longe, se fizeram presentes e ao meu avô Luis (*in memoriam*). Agradeço por estarem ao meu lado, apoiando minhas escolhas. Acima de tudo, pelo exemplo de vida e dedicação que são para mim.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, autor do meu destino, por mais esta conquista que me permitiu alcançar, pela força e coragem que me concedeste, meu refúgio e porto seguro nos momentos de angústia, obrigada pela Tua proteção e bênção.

Agradeço aos meus pais Mauro e Marli, que nunca mediram esforços para me proporcionar este sonho. Por abrirem mão de seus próprios sonhos e ajudar com minha formação, pelas geadas que enfrentaram no inverno gelado do Rio Grande do Sul, tirando da lavoura o nosso sustento, por cada palavra de apoio e conforto. Amo muito vocês!

À minha irmã Rita, uma criança tão doce e carinhosa, mesmo sem entender muito toda essa distância, me traz conforto nos momentos de saudade. Te amo minha princesinha!

Ao meu avô Luis Bester (in memoriam), que permanece vivo em meu coração, pelo incentivo desde pequena a buscar os meus sonhos e estudar.

Ao Murilo Marques, por todo o incentivo, força e coragem que me deste nos momentos difíceis. Obrigada pelo companheirismo, compreensão, amizade e carinho. Agradeço por toda a mudança que trouxeste para minha vida, tenho certeza que sem tudo isso, não teria chegado até aqui.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro prestado através da concessão de bolsa de estudos processo 2015/26729-2.

À professora Dra. Luciana Maria Fontanari Krause, pelos ensinamentos e pela oportunidade de buscar novos horizontes.

Agradeço especialmente ao meu orientador Professor Dr. Ramon Kaneno, por me receber em seu laboratório, pela acolhida, dedicação, paciência e incentivo durante o período de orientação, por todos os ensinamentos, pelo exemplo de professor e pesquisador que és... Não tenho palavras para expressar a minha gratidão. Obrigada por tudo Ramon!

À co-orientadora deste trabalho, Graziela G. R. Castilho, por transmitir seus conhecimentos, pela ajuda na busca de outros docentes nas adversidades que surgiram neste trabalho, pela paciência e dedicação no desenvolvimento desta dissertação. Grá, muito obrigada pela inspiração e profissionalismo, não teria conseguido sem você!

Ao grupo Imunologia de tumores, em especial as gurias: Sophia Sartori, Carolina Gorgulho, Angélica Ferreira, Flávia Sardela, Graziela Romagnoli, Carla Fogolin e Bruna Sanrromão pela ajuda tanto nos experimentos, quanto pela amizade, por tornarem minha estadia em Botucatu mais alegre e divertida, por serem minha família paulista. Também aos guris Edson Comparetti, Jofer Ramirez e ao orientador do grupo Ramon Kaneno, todos indispensáveis para a realização deste trabalho.

Ao meu colaborador Edson J. Comparetti, por todo o auxílio com a nanotecnologia.

À doutoranda Carolina Gorgulho, pela colaboração, paciência e ensino da citometria de fluxo, também pela amizade e incentivo nessa trajetória.

A doutoranda Caroline Basso, por transmitir seus conhecimentos sobre as nanopartículas utilizadas nesse estudo.

A mestranda Sophia Sartori, pelas discussões teóricas sobre nanotecnologia e suas interações, experimentos intermináveis na madrugada, pela amizade, companheirismo e incentivo nessa jornada.

Aos professores Dra. Margarida Saeki e Dr. Valber de Albuqueque Pedrosa pelos seus ensinamentos e contribuições, indispensáveis para a realização deste trabalho.

Ao laboratório do Professor Rodrigo Hernandes, em especial a Regiane Bitencort, que gentilmente nos cedeu a linhagem celular Caco-2.

Aos colegas biomédicos e amigos Fernando Sulczewski e Tatiele Milke pela amizade de longa data, companheirismo e incentivo em mais esta etapa.

À minha amiga carioca Isabella Docek, que nos momentos difíceis sempre esteve ao meu lado, pelos conselhos, por ter um lugar para se chamar de lar em Botucatu.

Ao laboratório de Eletroquímica do Instituto de Química da USP- São Carlos, em especial aos professores Dr. Valdecir A. Paganin e Dra. Joelma Perez.

Ao laboratório de Nanomedicina e Nanotoxicologia do Instituto de Física da USP- São Carlos, em especial ao professor Dr. Valtencir Zucolotto e ao doutorando Edson Comparetti.

Ao técnico do Laboratório de Caracterização Estrutural (LCE) da UFSCar, Vitor Mendes, pelo auxílio com a Microscopia Eletrônica de Transmissão.

Agradeço a secretária do departamento Ana Acerra, pelo café, caronas e desabafos.

Aos técnicos administrativos Aline Missio e Rafael Capra pela organização do laboratório, Luiz Alquati pela amizade e a Larissa Ragozzo (citometria).

Ao Instituto de Biociências (IB) e a Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (UNESP), pela oportunidade de realizar o curso.

À professora voluntária Teruê Sadatsune, pela amizade.

Agradeço, de forma muito especial, os professores do programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e aos professores do Departamento de Micro e Imunologia da UNESP.

E a todos os amigos e familiares que direta ou indiretamente contribuíram para a elaboração desse trabalho.

Muito obrigada!

"O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo.
Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos,
no mínimo fará coisas admiráveis."

José de Alencar

Resumo

O câncer colorretal (CCR) é o terceiro tipo mais prevalente de câncer no mundo, com frequentes complicações metastáticas muitas vezes associadas ao desenvolvimento de resistência adquirida aos fármacos. Uma das estratégias terapêuticas utilizadas no tratamento de pacientes que não respondem bem à quimioterapia convencional é a imunoterapia baseada na aplicação de anticorpos monoclonais cetuximab ou panitumumab, ambos dirigidos ao receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR). Em alguns casos observa-se associação da resistência aos anticorpos com a superexpressão de HER2, outro membro da família do EGFR. Assim, esta dissertação foi elaborada para testar a hipótese de que o uso conjunto de anticorpos anti-EGFR e anti-HER será capaz de reduzir o escape das células tumorais e que a associação com fármacos antitumorais tornará mais efetiva sua eliminação. Com esse propósito, nosso objetivo foi utilizar nanopartículas ouro (AuNP) para o transporte de 5-fluorouracil (5FU), endereçando esses nanocarreadores para as células de câncer colorretal recobrindo-os com anticorpos contra os receptores para fator de crescimento epidérmico EGFR (ErbB-1) e HER2 (ErbB-2). Os nanocarreadores foram testados *in vitro* quanto a sua interação por células de câncer colorretal HCT-116 e Caco-2 por citometria de fluxo, sua capacidade de induzir apoptose/necrose e seu efeito sobre a atividade proliferativa das células testadas. Nossos dados indicam que as AuNP produzidas e funcionalizadas com as moléculas de interesse possuem estrutura esférica, no entanto, algumas formulações apresentaram aglomeração devido a incorporação das moléculas orgânicas. Os ensaios biológicos mostraram que a AuNP 5FU EGFR teve efeito significativo na atividade citotóxica pela via apoptótica recente quando as células foram expostas à maior concentração testada, independentemente do tempo de exposição. Consequentemente, a proliferação celular foi cessada neste mesmo tratamentos e ambos os fenômenos foram observados de forma mais evidente na linhagem Caco-2, inclusive demonstrando efeito superior ao quimioterápico na forma livre.

Palavras-chave: Câncer colorretal, 5-fluorouracil, nanopartículas de ouro, nanocarreadores, anticorpos monoclonais.

Abstract

Colorectal cancer (CRC) is the third most prevalent type of cancer in worldwide and is frequently associated with metastatic complications. Therapeutic strategies to treat those patients who do not respond to conventional chemotherapy is based on the application of monoclonal antibodies cetuximab or panitumumab, both directed targeting the epidermal growth factor receptor (EGFR). However, in some cases resistance is associated with an overexpression of HER2, another receptor belonging to the EGFR family. Therefore, this dissertation was designed to test the hypothesis that the combination of anti-EGFR and anti-HER antibodies will be able to reduce the escape of tumor cells, and that their association with antitumor drugs could improve the elimination of tumor cells. Then, our goal was to use gold nanoparticles (AuNP) for transporting 5-fluorouracil (5FU), addressing them to colorectal cancer cells by coating them with antibodies against the receptors of epidermal growth factor EGFR (ErbB-1) and HER2 (ErbB-2). Nanocarriers were tested *in vitro* by flow cytometry for their interaction and internalization by the colorectal cancer cell line HCT-116 and Caco-2, their ability to induce apoptosis/necrosis and stop cell proliferation. Our results show that AuNP produced and functionalized with the molecules of interest have spherical structure, however, some formulations showed agglomeration due to the incorporation of organic molecules. Biological assays showed that AuNP 5FU EGFR had a significant effect on cytotoxic activity by the recent apoptotic pathway when cells were exposed to the highest concentration tested independently of the time of exposure. As a result, cell proliferation was stopped at this same treatment and both phenomena were observed most clearly in the Caco-2 cell line, including demonstrating superior effect to chemotherapy in free form.

Keywords: Colorectal cancer, 5-fluorouracil, gold nanoparticles, nanocarries, monoclonal antibodies.

Lista de abreviaturas e siglas

5-FdUMP - monofosfato de fluorodesoxiuridina

5-FdUTP - 5-fluorodesoxiuridina-trifosfato

5FU - 5-fluorouracil

5FUTP - trifosfato de fluorouridina

7-AAD – 7-aminoactinomicina D

ANOVA – Análise Estatística de Variância

Anti-EGFR – Anticorpo contra Receptor de Fator de Crescimento Epidérmico

Anti-ftl – anticorpo anti-VEGFR-2

Anti-HER – Anticorpo contra Receptor Epidérmico Humano

Au – Ouro

AuNP – Nanopartículas de ouro

APC – Aloficocianina

BRAF – Proto-oncogene B-Raf

BSA – Albumina de Soro Bovino

CAAE – Certificação Apresentada para Apreciação Ética

CCR – Câncer Colorretal Humano

CEA – Antígeno Carcinoembriônico

C-myc – Gene regulador que codifica fator de transcrição

C-terminal – Carboxi-terminal

DNA – Ácido Desoxirribonucleotídeo

DOX – Doxorrubicina

EDC – 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida hidroclorido

EGFR – Receptor de Fator de Crescimento Epidérmico

EpCAM - Molécula Epitelial de Adesão Celular

ERK – Quinases Reguladoras de Sinal Extracelular

FACS – Fluorescence –Activated Cell Sorting

FDA - *Food and Drug Administration*

FITC – Fluorocisteína

FOLFIRI – 5FU associado ao ácido fólico e ao irinotecan

FOLFOX – 5FU associado a oxaliplatina

LSPR – Ressonância plasmônica de superfície localizada

$HAuCl_4$ – ácido tetracloroáurico

HCT-116 – Linhagem celular de Carcinoma colorretal Humano

HEPES – 4-(2-hidroxietil)-1- ácido piperazinoetanossulfônico

HER ou ErbB – Receptor Epidérmico Humano

INCA – Instituto Nacional do Câncer

KRAS – Oncogene KRAS

M – Molar

MAPK – Proteína quinase ativada por mitógeno

MET – Microscopia Eletrônica de Transmissão

MFI – Mediana da Intensidade de Fluorescência

MMPs - Matriz de Metaloproteases

MUA – 11-mercaptoundecanóico

MUC-1 – Mucina 1 (glicoproteína)

NHS – N-hidroxisulfosuccinimina

NP - Nanopartículas

N-terminal – Amino-terminal

OMS – Organização Mundial da Saúde

PBS – Tampão Fosfato Salino

PE – ficoeritrina

PEG – Polietilenoglicol

PEI – Polietilenoimina

PerCP – Complexo proteico de clorofila peridinina

PI3K ou Akt – Fosfoinositídeo 3 quinase

PLGA – poli(ácido láctico-co-glicólico)

PTX – Paclitaxel

RNA – Ácido Ribonucleotídeo

ROS – Espécies Reativas de Oxigênio

rpm – Rotações por minuto

SFB – Soro Fetal Bovino

SiRNA – *Small Interfering* RNA

STAT – Transdutor de sinal e ativador de transcrição

UV – Luz Ultravioleta

VEGF – Fator de Crescimento Endotelial Vascular

VEGF-1^{+} - Fator de Crescimento Endotelial Vascular -1 positivo

VEGFR-2 – Receptor para o fator de crescimento endotelial vascular -2

Wnt – via de sinalização celular Wnt

Δ toxicidade – diferença entre a porcentagem de apoptose induzida pelo tratamento e a porcentagem de apoptose induzida pelo controle negativo.

Lista de Figuras

Figura 1. Representação esquemática dos receptores de fatores epidérmicos EGFR e HER2. A. Os receptores transmembrana interagem com seus respectivos ligantes, promovendo a ativação de vias de transdução de sinais, levando a mecanismos de sobrevivência, proliferação e imortalização celular. B. Os anticorpos monoclonais ligam-se nos sítios ativos dos receptores e impedindo que os ligantes ativem a cascata de sinalização intracelular, impedindo a manutenção da viabilidade celular [adaptado (37, 38)]. 21

Figura 2. Fórmula estrutural do 5-fluoro-1H-pirimidina-2,4-diona. O 5-fluorouracil é um análogo de pirimidina, antimetabólito antineoplásico, que interfere na síntese de DNA, bloqueando a conversão o ácido desoxiuridílico em ácido timidílico pela enzima timidilato sintase (46). 22

Figura 3. A. Representação esquemática de AuNP recoberta MUA, 5FU e anticorpos monoclonais anti-HER2 e anti-EGFR; e B. ação das AuNP sobre células tumorais. Na imagem são representados marcadores de superfície em verde (HER2 e ligante HER2) e em amarelo escuro (EGFR sofrendo a ação de anti-EGFR e a liberação controlada de 5FU), promovendo a morte da célula tumoral. 30

Figura 4. Espectroscopia de Luz UV-visível de AuNP. Na linha preta AuNP sem modificações; na laranja, modificadas MUA; na azul modificada com EDC/NHS; azul petróleo AuNP 5FU; na roxa 5FU HER2; verde limão 5FU EGFR; azul escuro AuNP 5FU HER2 EGFR; na vermelha AuNP HER2; vinho AuNP EGFR e rosa AuNP HER2 EGFR e 5FU. 38

Figura 5. Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) das AuNP. As escalas se encontram nos tamanhos de 100 nm e 10 nm respectivamente. **A.** AuNP; **B.** AuNP 5FU; **C.** AuNP HER2; **D.** AuNP 5FU HER-2; **E.** AuNP EGFR; **F.** AuNP 5FU EGFR; **G.** AuNP 5FU HER2 EGFR; **H.** AuNP HER2 EGFR. 39

Figura 6. Estratégia de *gating* para análise de viabilidade celular no software FlowJo. A. A contagem de células é dada por complexidade das estruturas internas (SSC – *Side Scatter*) e volume celular (FSC – *Forward Scatter*), cada ponto é representativo de uma célula que foi lida no citômetro. B. Gating na população celular de interesse, excluindo *debris* celulares, na figura representada pelo tubo controle negativo do experimento, onde 89,9% de células são viáveis. C. *Gating* selecionado para separar a marcação de anexina V^+ - PE (Q1), dupla marcação (Q2), marcado apenas com $7AAD^+$ - PerCP (Q3) e viáveis (Q4). 43

Figura 7. Representação dos dados obtidos por citometria de fluxo sobre a linhagem celular Caco-2. Os tratamentos foram: Controle negativo, 5FU livre, AuNP, AuNP 5FU, AuNP EGFR e AuNP 5FU EGFR nas concentrações de 10^{10} e $2x10^{10}$ partículas/mL, incubadas por 24 horas. Os *dotplot* foram analisados pelo *software* FlowJo, demonstrando a eficácia do tratamento AuNP 5FU EGFR já nas primeiras 24h de estudo (dados representativos de três repetições). 44

Figura 8. Representação dos dados obtidos por citometria de fluxo sobre a linhagem celular Caco-2. Os tratamentos foram: Controle negativo, 5FU livre, AuNP, AuNP

5FU, AuNP EGFR e AuNP 5FU EGFR nas concentrações de 10^{10} e $2x10^{10}$ partículas/mL, tratadas por 48 horas. Os *dotplot* foram analisados pelo *software* FlowJo e demonstram a eficiência do tratamento AuNP 5FU EGFR onde restaram pouco menos de 10% de células viáveis na maior concentração testada (dados representativos de três repetições). 45

Figura 9. Citotoxicidade dos compósitos sobre células Caco-2 tratadas por 24 horas. **A.** Apoptose precoce (anexina V^+) tratadas com $1x10^{10}$ AuNP/mL. **B.** apoptose precoce tratadas com $2x10^{10}$ AuNP/mL. **C.** apoptose tardia/necrose (anexina V^+ e $7AAD^+$) tratadas com $1x10^{10}$ AuNP/mL. **D.** apoptose tardia/necrose tratadas com $2x10^{10}$ AuNP/mL. A análise estatística foi realizada por *one-way* ANOVA com post-test de Tukey, com significância de $p < 0,05$. 46

Figura 10. Citotoxicidade dos compósitos sobre células Caco-2 tratadas por 48 horas. **A.** Apoptose precoce (anexina V^+) tratadas com $1x10^{10}$ AuNP/mL. **B.** apoptose precoce tratadas com $2x10^{10}$ AuNP/mL. **C.** apoptose tardia/necrose (anexina V^+ e $7AAD^+$) tratadas com $1x10^{10}$ AuNP/mL. **D.** apoptose tardia/necrose tratadas com $2x10^{10}$ AuNP/mL. A análise estatística foi realizada por *one-way* ANOVA com post-test de Tukey, com significância de $p < 0,05$. 47

Figura 11. Citotoxicidade das nanopartículas de ouro e funcionalizações sobre células de carcinoma colorretal humano HCT-116 tratadas por 24 horas. Os resultados são apresentados em diferença dos tratamentos em relação ao grupo controle. **A.** Células em apoptose recente (anexina V^+) tratadas com $1x10^{10}$ AuNP/mL. **B.** células em apoptose recente tratadas com $2x10^{10}$ AuNP/mL. **C.** células em apoptose tardia/necrose (anexina V^+ e $7AAD^+$) tratadas com $1x10^{10}$ AuNP/mL. **D.** células em apoptose tardia/necrose tratadas com $2x10^{10}$ AuNP/mL. A análise estatística foi realizada por *one-way* ANOVA com post-test de Tukey, com significância de $p < 0,05$. 49

Figura 12. Citotoxicidade das nanopartículas de ouro e funcionalizações sobre células de carcinoma colorretal humano HCT-116 tratadas por 48 horas. Os resultados são apresentados em diferença dos tratamentos em relação ao grupo controle. A. Células em apoptose recente (anexina V^+) tratadas com $1x10^{10}$ AuNP/mL. B. células em apoptose recente tratadas com $2x10^{10}$ AuNP/mL. C. células em apoptose tardia/necrose (anexina V^+ e $7AAD^+$) tratadas com $1x10^{10}$ AuNP/mL. D. células em apoptose tardia/necrose tratadas com $2x10^{10}$ AuNP/mL. A análise estatística foi realizada por *one-way* ANOVA com post-test de Tukey, com significância de $p < 0,05$. 50

Figura 13. Figura representativa do ensaio de proliferação celular por CellTrace™. **A)** as células são previamente coradas com o CellTrace™, no processo de divisão celular, o corante é dividindo entre o citoplasma das células filhas, diminuindo a concentração a cada ciclo. **B)** Histograma da marcação com CellTrace no grupo controle. O pico vermelho é referente a 24 h de tratamento; o azul 48 h; o laranja 72h. Cada pico representa a divisão celular e consequentemente a diluição do CellTrace no citoplasma. **C)** Tratamento com AuNP 5FU EGFR na concentração de $2x10^{10}$ NP/mL. As células deste tratamento não proliferaram, devido a citotoxicidade do tratamento, nota-se também a diminuição na intensidade da fluorescência. **D)**

Tratamento com 5FU livre (0,38mM), nesse tratamento as células não sofreram divisão celular devido a sua ação citotóxica. 51

Figura 14. Índice de proliferação celular na linhagem de carcinoma colorretal HCT-116 avaliando a diluição de CellTrace™ no citoplasma das células. As células foram coradas, tratadas (1 ou $2x10^{10}$ NP/mL) e recolhidas nos tempos de 24, 48 e 72h: **A)** 24h com $1x10^{10}$ NP/mL; **B)** 24h com $2x10^{10}$ NP/mL; **C)** 48h com $1x10^{10}$ NP/mL; **D)** 48h com $2x10^{10}$ NP/mL e **E)** 72h com $1x10^{10}$ NP/mL e **F)** 72h com $2x10^{10}$ NP/mL. A análise estatística foi realizada por *one-way* ANOVA seguido de *post-test* de Dunnet, com significância de $p < 0,05$. 52

Figura 15. Índice de proliferação celular na linhagem de adenocarcinoma colorretal Caco-2 avaliando a diluição de CellTrace™ no citoplasma das células. As células foram coradas, tratadas (1 ou $2x10^{10}$ NP/mL) e recolhidas nos tempos de 24, 48 e 72h: **A)** 24h com $1x10^{10}$ NP/mL; **B)** 24h com $2x10^{10}$ NP/mL; **C)** 48h com $1x10^{10}$ NP/mL; **D)** 48h com $2x10^{10}$ NP/mL e **E)** 72h com $1x10^{10}$ NP/mL e **F)** 72h com $2x10^{10}$ NP/mL. A análise estatística foi realizada por *one-way* ANOVA seguido de *post-test* de Dunnet, com significância de $p < 0,05$. 53

Lista de Tabelas

Tabela 1: Nanopartículas transportadoras de quimioterápicos.....25

Tabela 2: Quimioterápicos carreados por nanoestruturas de ouro 26

Tabela 3. Parâmetros físico-químicos das nanopartículas de ouro e dos respectivos compósitos (média e desvio padrão). O diâmetro foi calculado por ImageJ a partir de imagens de MET e o potencial zeta medido por Zetasizer.....40

Tabela 4. Estimativa de número de partículas/mL com base na espectroscopia UV-vis 41

Tabela 5. Cálculo da massa dos compósitos com base no número e no raio das partículas.....42

Sumário

1. INTRODUÇÃO 17

O CÂNCER COLORRETAL: INCIDÊNCIA E TRATAMENTO 17

A NANOTECNOLOGIA COMO UMA NOVA ABORDAGEM TERAPÊUTICA 23

a. Nanopartículas de ouro e as aplicabilidades em terapias alvo 23

b. A interação das células tumorais com nanopartículas de ouro 28

2. OBJETIVO 31

3. METODOLOGIA 32

3.1 Síntese das AuNP 32

3.2 Modificação da superfície das AuNP com 11-mercaptoundecanóico 32

3.3 Modificação dos grupamentos carboxilas com EDC/NHS 32

3.4 Incorporação de 5-fluorouracil e dos anticorpos anti-EGFR e anti-HER2 às AuNP 33

3.5 Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM) 33

3.6 Potencial zeta (ζ) 34

3.7 Cálculo de número de partículas 34

3.8 Cálculo da concentração da suspensão em massa 34

3.9 Culturas de células de câncer colorretal 35

3.10 Análise da atividade antitumoral das nanopartículas. 35

3.11 Análise de apoptose e necrose por Anexina V e 7-AAD 36

3.12 Análise da proliferação por marcação com CellTrace™ far Red 37

3.13 Análise estatística 37

4. RESULTADOS 38

4.1 Caracterização físico-química das AuNP por espectroscopia de UV-vis 38

4.2 Estrutura das AuNP analisadas por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) 38

4.3 Quantificação de partículas 41

4.4 Avaliação da toxicidade dos construtos sobre as células tumorais 42

4.5 Ação antiproliferativa dos compósitos de ouro 51

5 DISCUSSÃO 54

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS 59

7 REFERÊNCIAS 60

1. INTRODUÇÃO

O CÂNCER COLORRETAL: INCIDÊNCIA E TRATAMENTO

A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que em 2012 ocorreram 14 milhões de casos de câncer no mundo e o índice de mortalidade chegou a 8,2 milhões, sendo 694 mil em decorrência de câncer colorretal (CCR), o qual compreende a porção final do intestino (1). O Instituto Nacional do Câncer (INCA) (2) estimava para 2016 600 mil novos casos de câncer no Brasil, dos quais 34.280 casos de CCR, sendo 48,6% em homens e 51,4% em mulheres. No biênio 2018-2019 são esperados 36.360 novos casos de CCR, tendo incidência maior em mulheres. Assim, essa doença ocupa a terceira posição em incidência de câncer no Brasil e no mundo, reafirmando a importância do estudo desta patologia para a saúde da população (1, 2).

O CCR pode desenvolver-se de forma esporádica ou familiar. A forma esporádica representando 60-80% da incidência desse tumor, na qual, os pacientes não apresentam nenhuma mutação que predisponha ao aparecimento do tumor e também não há relatos de casos na família; a forma familiar resulta da acumulação de alterações dos genes que controlam a diferenciação celular e o crescimento epitelial representando 20-40% dos casos, podendo estar associados ou não à polipose adenomatosa familiar (3).

A cirurgia ainda é o tratamento de escolha nos casos de CCR, em geral acompanhada de quimioterapia neoadjuvante (pré-cirurgia) ou adjuvante (pós-cirurgia), porém complicações metastáticas são frequentes, o que dificulta a cura dos pacientes (3, 4). O intervalo entre a suspeita de CCR e o início do tratamento pode permitir a invasão do tumor primário em outros tecidos ou extravasamento de células para vasos linfáticos ou sanguíneos para alcançar outros tecidos (metástases) (5). Contribui para esse quadro a ação das enzimas proteolíticas produzidas pelas células tumorais, capazes de degradar a matriz extracelular e formar micrometástases que dependem da presença de fatores de crescimento e metaloproteases, que favorecem a evolução para macrometástases (3, 6).

A análise histopatológica demonstra o estadiamento da doença em níveis de 0 a IV, sendo esse último estágio correspondente às metástases confinadas a um órgão ou local. O estadiamento leva em consideração o tamanho do tumor, o grau de invasão de órgãos

adjacentes, o número de linfonodos afetados e se há metástases e cada fase requer um tipo de tratamento ou combinações de quimioterápicos (7). O CCR é apresentado em cinco fazes de progressão (8) descritas abaixo, cada qual com tratamentos. As fases de estadiamento são:

Estadio 0 - carcinoma *in situ*, ou seja, carcinoma está contido a nível celular;

Estadio I - invasão submucosa e a muscular própria;

Estadio IIA - invasão através da muscular própria nos tecidos pericolorretais;

Estadio IIB - penetra na superfície do peritônio visceral;

Estadio IIC - invade diretamente ou adere a outros órgãos ou estruturas;

Estadio IIIA - tumor invade a muscular própria com metástases em 1 a 3 linfonodos regionais ou tecido próximo, ou invade submucosa com metástases em 4 a 6 linfonodos regionais;

Estadio IIIB - o tumor penetra na superfície do peritônio visceral com metástases em linfonodos 1 a 3 regionais ou tecido próximo ou invade através da muscular e própria em tecidos pericolorretais com metástases em linfonodos 4 a 6 regionais ou invade a muscular própria com metástases em 7 ou mais linfonodos regionais;

Estadio IIIC - o tumor penetra na superfície do peritônio visceral com metástases em 4 a 6 linfonodos regionais ou invade através da muscular própria para tecidos pericolorretais com metástases em 7 ou mais linfonodos regionais ou invade diretamente ou é aderente a outros órgãos ou estruturas com metástases em um ou mais gânglios linfáticos regionais

Fase IV - metástase confinada a um órgão ou local (por exemplo, fígado, pulmão, ovário, linfonodos distantes).

As células do câncer colorretal podem expressar vários marcadores de membrana como o antígeno carcinoembriônico (CEA), o receptor do fator de crescimento epitelial (EGFR), a molécula epitelial de adesão celular (EpCAM), o fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF), a integrina $\alpha_v\beta_3$ e a matriz de metaloproteases (MMPs) (9). Um dos importantes marcadores superexpresso da membrana das células de CCR, é o EGFR, também referido como ErbB-1, que pode estar associado a um quadro de mau prognóstico da doença (3). Outras moléculas da mesma família são o HER2 (ErbB-2,

HER 3(ErbB-3) e HER 4 (ErbB-4), que também podem estar superexpressos nas células do câncer colorretal, ainda que em menor intensidade que nas células do câncer de mama (10-12).

Em condições normais, os receptores de fatores epidérmicos são expressos em células epiteliais sadias, desempenhando funções essenciais de sobrevivência, regulando a diferenciação e a proliferação celular. A família ErbB ativa quatro vias de transdução de sinais que se sobrepõe, assim, quando o ligante dessa família interage com seu receptor, ocorre uma dimerização, com consequente mudança na conformação do receptor de quinases, ativando cascatas de sinalização intracelular. Entretanto, os níveis anormais de expressão desses marcadores trazem consequências na proliferação exacerbada das células tumorais, visto que 85% dos CCR possuem esses receptores superexpressos, que servem como marcador da progressão tumoral (13-15).

Sucessivas mutações no tecido colorretal levam ao desenvolvimento do CCR. O gene da polipose adenomatosa de cólon é um gene supressor de tumor presente na via de sinalização intracelular Wnt, responsável pela proliferação, diferenciação e migração celular e que também regula a via da β-caderina que mantém o citoesqueleto intacto (16) e esse conjunto de fatores leva à multiplicação desenfreada de células tumorais. O desequilíbrio na via de sinalização Wnt pode aumentar a expressão de c-myc, que é outro fator de proliferação e também de diferenciação celular. Quando este gene está intacto, é responsável pela orientação do crescimento celular do cólon em direção ao intestino, porém quando há mutação, esse crescimento se torna desordenado e há uma tendência à formação de pólipos adenomatosos, que podem adquirir características de malignidade (17).

Outros genes também estão associados ao CCR, como o KRAS, presente na via do MAPK e identificado em outras neoplasias (18). Essa via de sinalização das quinases relacionadas ao sinal extracelular (ERK MAPK) está fortemente ligada à proliferação e progressão oncogênica e está desregulada em 30% dos CCR, portanto, o crescimento das células tumorais é estimulado pela ligação de fatores de crescimento na membrana como o EGFR (Receptor do Fator de Crescimento Epidérmico) (19). O proto-oncogene BRAF têm incidência em 5-15% dos CCR e está associado ao aumento das proteínas quinases, e sua presença é clinicamente relevante, pois é diretamente ligado ao mau

prognóstico do paciente, que tem baixa taxa de resposta ao anticorpo anti- EGFR (Cetuximab) (20).

O EGFR é uma glicoproteína transmembrana presente em muitos tecidos normais, membro da família de receptores de tirosina quinase (21), possuindo três domínios celulares: o domínio extracelular (porção N-terminal), que confere especificidade aos ligantes, o domínio transmembrana e o domínio intracelular ou C-terminal com atividade tirosina quinase, como ilustrado na figura 1. O domínio extracelular de EGFR sofre dimerização após a ligação com o receptor epidérmico humano (HER) e ativa a tirosina quinase intracelular (C-terminal). Em seguida, uma via de transdução sinais intracelulares é desencadeada a partir de fosforilações, que culminará na proliferação tumoral, apoptose, angiogênese e invasão tecidual (22).

Outra molécula envolvida nos processos de carcinogênese é o receptor de proteína tirosina quinase 2, Erb-B2 ou HER2/neu. Esse proto-oncogene está localizado no cromossomo 17q21 (23), e sua superexpressão foi relatada em vários tumores de origem epitelial, incluindo pulmão (24), próstata (25), bexiga (26), pâncreas (27) e osteosarcoma (28), porém é um marcador mais comum em câncer de mama (29, 30) e em câncer do trato gastrointestinal (31-33), sendo detectado em 81,8% das metástases nos linfonodos (34).

A transdução de sinal de HER2 ativa basicamente as vias que promovem a proliferação celular, como a proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK), fosfoinositino 3 quinase (PI3K ou Akt), fosfolipase C, proteína quinase C e o transdutor de sinal e ativador de transcrição (STAT) (35). Um estudo de Yonesaka e colaboradores demonstrou que a via de sinalização do HER2 promove resistência ao anticorpo Cetuximab (anti-EGFR) *in vitro* e *in vivo*, seja pela sua amplificação ou suprarregulação de heregulina, que leva a sinalização de ERK 1/2 (proteína serina treonina quinase) responsáveis por vias de fatores de migração, adesão, progressão do ciclo celular (36).

Figura 1. Representação esquemática dos receptores de fatores epidérmicos EGFR e HER2. A. Os receptores transmembrana interagem com seus respectivos ligantes, promovendo a ativação de vias de transdução de sinais, levando a mecanismos de sobrevivência, proliferação e imortalização celular. B. Os anticorpos monoclonais ligam-se nos sítios ativos dos receptores e impedindo que os ligantes ativem a cascata de sinalização intracelular, impedindo a manutenção da viabilidade celular [adaptado (37, 38)].

Os dois anticorpos comercialmente disponíveis empregados na clínica são o cetuximab (dirigido contra o EGFR) e o transtuzumab (dirigido ao HER2), ambos capazes de promover aumento do tempo livre de progressão da doença, bem como da sobrevida do paciente (39). Entretanto, há casos de resistência aos anticorpos, muitos deles associados ao aumento da expressão de HER2 (40). Desse modo, a associação desses dois anticorpos poderia favorecer o combate de tipos celulares resistentes ao cetuximab ou ao transtuzumab. Além disso, o uso de tais anticorpos deveria estar associado à quimioterapia para garantir maior eficiência de combate ao tumor.

Uma gama de quimioterápicos é empregada no tratamento do CCR, sejam eles sozinhos ou combinados com outros fármacos. (41). Os esquemas quimioterápicos convencionais se baseiam no uso de 5-fluorouracil (5FU), geralmente associado ao ácido fólico, leucovorina e ao irinotecan (FOLFIRI) ou à leucovorina e oxaliplatina (FOLFOX) ou leucovorina, 5FU, oxaliplatina e irinotecan (FOLFOXIRI) (42-44), também ao CapeOx (oxaliplatina e capecitabina) sendo que esses esquemas apresentam eficiência terapêutica de 6 a 67% (45). A associação de medicamentos é comum para combater o câncer e, no caso do câncer colorretal, o medicamento de escolha é o 5FU. Essa droga aumenta a taxa de cura, prolongando a vida dos pacientes, no entanto, seus efeitos colaterais são intensos, sendo necessária novas estratégias que diminuam esses sintomas.

O 5FU (Figura 2) é um fármaco que atua na via do folato, essencial para a síntese de DNA e divisão celular, promovendo quebra do material genético. Sucessivas reações de fosforilação conduzem à formação de três compostos ativos do fármaco: a) monofosfato de fluorodesoxiuridina (5FdUMP) que se liga na enzima timidilato-sintase resultando em inibição da síntese de DNA e indução de apoptose; b) trifosfato de fluorouridina (5FUTP), que incorpora nucleotídeos presente em RNA, fazendo com

que o processamento do RNA seja anormal; e c) 5-fluorodesoxiuridina-trifosfato (5FdUTP), que conduz à má incorporação de nucleotídeos no DNA, resultando em quebras da cadeia de DNA (46).

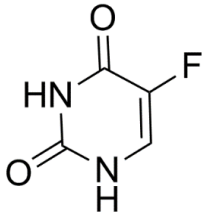


Figura 2. Fórmula estrutural do 5-fluoro-1H-pirimidina-2,4-diona. O 5-fluorouracil é um análogo de pirimidina, antimetabólito antineoplásico, que interfere na síntese de DNA, bloqueando a conversão o ácido desoxiuridílico em ácido timidílico pela enzima timidilato sintase (46).

O 5FU, assim como os demais quimioterápicos antitumorais, apresenta muitos efeitos colaterais, usualmente manifestadas como alterações cutâneas e de mucosa, e disfunções gastrintestinais, cardiovasculares e hematopoiéticas, sendo necessário uma pausa entre as aplicações para que seja detoxificada pela via hepática e excretada pela urina (9, 47, 48). Um dos problemas decorrentes desse esquema terapêutico é que o período de 3-4 semanas exigido entre as aplicações, pode permitir a adaptação e replicação das variantes quimiorresistentes, favorecendo a ocorrência de recidivas. Assim, seria desejável utilizar estratégias para direcionar o quimioterápico às células alvo, reduzindo a concentração do fármaco circulante e, consequentemente, diminuindo os efeitos colaterais da quimioterapia, sem perder a eficiência contra as células tumorais. Para isso, poderia ser utilizado um sistema nanoestruturado para o carreamento do fármaco 5FU diretamente para células tumorais que expressam EGFR ou HER2. A viabilidade de transporte de 5FU por nanocarreadores foi demonstrada, por exemplo, com o uso de nanopartículas de sílica mesoporosa recobertas com EGF para carrear o 5FU até as células tumorais com resistência ao fármaco, observando-se que sua entrega diretamente à célula-alvo superou a quimioresistência, através da parada do ciclo celular na fase S (9).

Apesar dos avanços nos estudos dos nanomateriais, dados sobre a viabilidade de uso dos sistemas nanoestuturados ainda são inconclusivos. Órgãos de saúde mundiais controlam o emprego dessas nanocarreadores e a *Food and Drug Administration* (FDA) já aprovou o uso de alguns nanomateriais para uso clínico como o ácido poli-lático-co-glicólico (PLGA) como nanofármaco enquanto outros carreadores, como as

nanopartículas de ouro estão sendo investigadas quanto ao seu potencial para uso terapêutico.

A NANOTECNOLOGIA COMO UMA NOVA ABORDAGEM TERAPÊUTICA

O desenvolvimento de nanocarreadores de fármacos ou substâncias tóxicas para as células tumorais pode representar um caminho para favorecer o ataque às células tumorais com redução de efeitos colaterais. A nanotecnologia é uma área multidisciplinar que envolve a pesquisa de novos materiais sendo utilizada em diversos campos como a indústria farmacêutica, eletrônica, mecânica, química e alimentícia (4), sendo compreendida como a ciência que estuda estruturas em escala de 1 a 100 nanômetros (nm) (49) cujas propriedades físico-químicas ainda não são totalmente conhecidas (50, 51).

Um dos desafios da nanotecnologia é o comportamento das partículas quando em contato com os fluidos biológicos, pois podem sofrer agregação e, consequentemente, causar entupimento de capilares; ou formar proteínas "coronas", decorrentes da interação de moléculas do próprio organismo com a superfície reativa das nanopartículas, formando uma coroa proteica, devido à carga elétrica superficial. Essas proteínas coronas podem ser prejudiciais à entrega de drogas e também impedir o carreamento dessas partículas por anticorpos às células de interesse (52-54).

Diversos outros tipos de nanopartículas foram desenvolvidos no intuito de carrear fármacos e/ou adjuvantes para as mais variadas patologias, especialmente no combate ao câncer, como mostra a Tabela 1. Novos tratamentos são intensamente estudados e aplicados na prática, entretanto muitos deles falham devido a mecanismos de escape tumoral ou até mesmo desenvolvem resistência à quimioterapia (51). Algumas dessas nanoestruturas mostraram-se promissoras no tratamento antitumoral e tem perspectivas de uso na clínica.

a. Nanopartículas de ouro e as aplicabilidades em terapias alvo

Nanopartículas de metais nobres despertam interesse devido à capacidade de modelagem com precisão atômica. Esse tipo de nanopartícula também tem uma forte relação com ressonância de superfície plasmônica, que se define pela oscilação coletiva

das cargas dos elétrons superficiais na interface de metais e isolantes que interagem com a luz visível, ou seja, quando a frequência plasmônica entra em ressonância com a frequência de um fóton incidente, gera o fenômeno de ressonância plasmônica de superfície localizada (*Localized Surface Plasmon Resonance* - LSPR) (55, 56). Esse fenômeno é de grande interesse, pois fornece, a olho nu, diferentes colorações de suspensão de materiais que são dependentes do formato das partículas e da distância que cada uma ocupa no espaço e também dependem do solvente e cuja corrente elétrica que as envolvem (57).

Tabela 1: Nanopartículas transportadoras de quimioterápicos

Nanopartícula	Quimioterápico	Célula-Alvo	Eficiência	Referência
PLGA - PEG	Paclitaxel e cisplatina	344SQ H460 A549 camundongos	*In vitro*, não houve diferença entre as drogas encapsuladas ou co-encapsuladas, já *in vivo* houve um aumento da apoptose com o co-encapsulamento	(58)
Lipídicas sólidas	Oxaliplatina e ácido fólico	HT-29	O compósito exibiu maior toxicidade pela adição do ácido fólico que aumentou a absorção celular	(59)
Albumina	Erlotinib	ASPC-1 PANC-1	Reduziu a concentração de quimioterápico para a morte celular comparado com a forma livre	(60)
Sílica mesosporosa	Epirubicina e MUC1	MCF-7	Citotoxicidade melhorada em comparação ao fármaco livre, alívio de efeitos colaterias	(61)
	Doxorrubicina	A549	Citotoxicidade efetiva na presença da droga encapsulada	(62)
	5-fluorouracil	HCT-116	NP aumentou a morte celular, porém teve efeitos adversos	(63)
Quitosana	Docetaxcel	C6 Ratos	*In vitro*, a morte foi mais eficiente que o fármaco livre e *in vivo* as NP tiveram maior biodistribuição sanguínea	(64)
	Paclitaxel	Caco-2 Camundongos Ratos	Melhora na mucoadesão e transporte intestinal do fármaco, prolongar a retenção e acúmulo de PTX no tumor, ácido fólico melhorou ainda mais os resultados	(65)
siRNA	Bevacizumab	A431	Supressão do gene VEGF e efeito terapêutico sinérgico quando associado ao anticorpo	(66)
Dendrimeros	Gencitabina Anti-Ftl-1	CFPAC-1 Ratos	*In vitro*, maior toxicidade para células VEGFR-1^{+} e *in vivo* a absorção celular foi maior na presença do fármaco	(67)
Nanotubos de carbono	Temozolomida	RG2 Astrócitos	Induzem morte por parada do ciclo celular e ativação da apoptose, tanto sozinhos quanto combinado com o antineoplásico	(68)
Quantum dots	Doxorrubicina Óxido de zinco	A549 MRC-5	Mostram atividade após a dissolução, a combinação mata as células cancerígenas por apoptose	(69)

Tabela 2: Quimioterápicos carreados por nanoestruturas de ouro

Nanoestrutura	Droga	Auxiliar	Célula alvo	Eficiência	Referência
Nanopartícula de ouro	Doxorrubicina	Oligonucleotídeos	SW480 Balb/c nude	Eficiência em baixas doses – *in vitro* e *in vivo* o compósito suprimiu o crescimento tumoral do xenoenxerto	(70)
	Quercetina	VEGFR-2 EGFR	MCF7 MDA-MB-231 HUVEC Sprague-Dawley	Inibição da transição epitelial-mesenquimal, aumentou a atividade anti-angiogênica *in vitro* e *ex vivo* e diminuiu o tumor *in vivo*. Houve regressão das células tumorais que se tornaram próximas ao normal	(71)
	Cisplatina	Peptídeo RME Irradiação	MDA-MB-231 NOD/SCID	A combinação da droga melhorou os efeitos da irradiação, no entanto o peptídeo teve efeito em mesma intensidade que a droga livre, mas não houve toxicidade intrínseca ou aumento de radiotoxicidade	(72)
	Malato de sunitinib	Tripeptídeo RGD	MCF-7 HUVEC	Redução significativa da proliferação tumoral, propriedades anti-angiogênicas	(73)
	Transtuzumabe	Ácido dietileno triamina pentacético Radiação de elétrons	SK-BR-3 MDA-MB-361 Mouse CD1 atímicos	Compósitos foram encaminhados para células $HER2^{+}$, causaram danos ao DNA diminuindo a sobrevivência celular, diminuição do xenoenxerto $HER2^{+}$ porém sem toxicidade aparente para as células saudáveis do tecido	(74)
Nanorods	Doxorrubicina	Albumina Fototermia	RAW 264.7 Tramp-C1 C57Bl/6	Entrega dos nanorods mediada por macrófagos associado a fototerapia, DOX liberada intracelularmente, migração e acumulo em regiões hipóxicas do tumor	(75)
	____	Anti-EGFR Fototermia	A549 H520 MB49 camundongos	Fototermia dos nanorods direcionados por EGFR teve efeitos significativos *in vivo*, sem toxicidade residual na dose de tratamento recomendada	(76)

Dentre os sistemas que utilizam metais nobres para a produção de NP, destacam-se as nanopartículas de ouro (AuNP), intensamente investigadas por suas aplicabilidades em estudos de terapias alvo (77). AuNP apresentam propriedades físico-químicas que permitem a funcionalização com outros materiais como polímeros (78), fármacos (79), material genético (80), anticorpos (81) e aptâmeros (82), podendo ser aplicados como mecanismos de entrega específica de drogas (83), sensibilização de células (84), sistemas diagnósticos de imagem (85) ou até mesmo testes rápidos para detecção de patógenos (86). As propriedades ópticas e eletrônicas desse tipo de NP é especialmente interessante pois permite a entrega de fármacos a sítios específicos e, simultaneamente, pode ser induzida à hipertermia, utilizada no tratamento de câncer ou usada como contraste em radioterapia e outros métodos de diagnóstico por imagem (87). Alguns estudos de terapias alvo para o câncer utilizando AuNP estão especificados na Tabela 2.

A síntese de AuNP pode ocorrer a partir de dois princípios: 1) *Top-Down*, em que o ouro em massa é partido até o tamanho nanométrico, envolvendo métodos físicos como laser e radiação ou 2) *Top-Up*, em que as estruturas são formadas a partir de átomos de Au, com metodologia química como a redução de íons de ouro. Nesse processo de síntese, primeiramente se faz a redução de precursor de ouro em solução salina de ouro utilizando agentes redutores como boroidrato e citrato de sódio, que reduzem Au (III) a Au. Em seguida, faz-se a estabilização do ouro com citrato de sódio ou alcano tióis para impedir a formação de agregados de ouro metálico e manter a dispersão de nanopartículas (88).

A produção de AuNP pela redução com citrato de sódio foi primeiramente descrita por Turkevich em 1951, sendo o método mais aplicado na atualidade. O citrato de sódio é adicionado em maior concentração sobre o $HAuCl_4$ mantido em câmara de refluxo sob fervura. Esse processo faz com que o $HAuCl_4$ seja reduzido e, como produto, obtemos nanopartículas esféricas que, devido ao fenômeno de LSPR, mostra coloração “vermelho vinho” (89). O tamanho e forma das AuNP obtidas por esse método variam conforme o protocolo de redução pelo citrato de sódio.

O Au (III) reduzido a Au produz NP com tamanho aproximado de 20 nm e o citrato de sódio tem por função estabilizar essa solução prevenindo a agregação. Com esse método é possível conseguir AuNP de 15 a 150 nm em formato esférico. O Au pode ser sintetizado em vários formatos, referidos como NP anisotrópicas como, *nanorods* (76), nanocubos (90), nanofios (91), nanopoliedros (92), dendritos (93) entre outros. Esses diferentes formatos e

tamanhos, bem como suas propriedades elétricas, físicas, químicas e biológicas influenciam a toxicidade das AuNP no nível celular e tecidual (88), pois afetam a absorção, distribuição, metabolismo e a excreção desses nanomateriais (94).

Observou-se que as redes cristalinas de diferentes nanopartículas, isto é, a disposição dos átomos na formação das nanoestruturas, induzem a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), citotoxicidade e inflamação, causando danos celulares irreversíveis (95). Gunduz et al., observaram que baixas concentrações de AuNP com diâmetro de 12 nm, não produzem efeitos tóxicos, enquanto concentrações mais elevadas mostram significativa toxicidade. Em testes *in vitro*, os pesquisadores observaram que meio contendo 10% de soro fetal bovino (SFB) protege as células da ação das AuNP, de modo mais eficiente que o meio contendo 5% de SFB. Os autores atribuem essa proteção ao desdobramento de proteínas coronas presentes no SFB devido à alta energia superficial das NP. Ainda neste estudo, observaram o acúmulo de AuNP no citoplasma ao longo de 20 dias, seguido de um declínio significativo nos dias subsequentes, sugerindo que, ou há inibição da endocitose ao longo do tempo ou as NP são ativamente exocitadas pela célula. Em curto prazo, as NP não possuem efeitos tóxicos, porém, com a exposição crônica, as células são desafiadas a eliminá-las e diminuir o estresse das organelas (96).

b. A interação das células tumorais com nanopartículas de ouro

AuNP podem ser internalizadas por células tumorais por pinocitose ou fagocitose e, quando conjugadas a ligantes, podem ser internalizadas pela endocitose mediada por receptor e por micropinocitose (97). Estudos experimentais para determinar a concentração de AuNP esféricas de diferentes tamanhos mostram que, em ratos, as maiores concentrações são encontradas no sangue, fígado e baço 24 h após a aplicação, com pequeno acúmulo no pulmão. As AuNP de 10 nm foram as que sofreram maior dispersão entre diferentes órgãos, atingindo concentrações mais elevadas no fígado e depois no baço, ou seja, em órgãos do sistema mononuclear fagocitário. Quando foi feita a associação da AuNP com polímero, observou-se um padrão de distribuição tecidual diferente, com redução do acúmulo no fígado e baço, de acordo com a diminuição do tamanho das nanopartículas. Frente a isto, pode-se observar que a associação de AuNP com agentes funcionalizantes são uma abordagem muito interessante, visto que as mesmas podem ser modificadas com ligantes ativos em concentrações muito maiores do que aquelas atingidas com lipossomos, por exemplo (98).

AuNP sofrem o efeito de acúmulo específico no local do tumor, pois massas tumorais solidas possuem vasos sanguíneos cujas junções celulares são mais espessas que as normais (100 a 780 nm contra 20nm em média no tecido normal). Esse espessamento provoca, por vezes, extravasamento de sangue (99, 100) e dessa forma, as AuNP conseguem atravessar o retículo endotelial e se depositar na massa tumoral (96).

O sistema imunológico por sua vez, tenta barrar essas nanopartículas que são vistas como corpos estranhos pelas células fagocitárias, impedindo que cheguem ao sítio tumoral ou por opsonização e desempenhem sua função. Pensando nisso, alguns estudos mostraram que um revestimento hidrofóbico dessas AuNP, por exemplo, pode burlar os fagócitos através de mecanismos de escape de macrófagos presentes no tecido. Esse revestimento funcional, além de possibilitar a incorporação de moléculas de direcionamento e drogas ainda aumenta a meia-vida dessas substâncias em contato com o tumor (101, 102).

Curley et al. (103) desenvolveram AuNP para carreamento de anti-EGFR combinado com radiofrequência, testados em camundongos Balb-c inoculados com células derivadas de câncer pancreático. *In vitro*, as AuNP foram internalizadas de acordo com o tempo de exposição, porém o anticorpo livre foi internalizado mais rapidamente e foi mais eficiente em provocar apoptose. *In vivo*, as AuNP foram detectadas no sítio de injeção intraperitoneal, no xenoenxerto tumoral, baço, fígado, pulmões e rim, no entanto, não houve lesão tecidual seja aguda ou crônica na análise histopatológica.

Eghtedati et al. descreveram o uso de *nanorods* de ouro para carrear o anticorpo anti-HER2/neu às células de câncer de mama, funcionalizando-os com polietilenoglicol com extremidade tiol a fim de promover o escape do sistema retículo endotelial. A toxicidade foi avaliada *in vitro* nas linhagens SKBR-3 e BT474 que superexpressam HER2, observando-se que a presença do anticorpo aumentou a ligação específica à HER2, resultado este, reproduzido em outras linhagens como fibroblastos, MCF-7 e MCF-10A. Devido ao fenômeno de “proteínas coronas”, o grupo incubou os *nanorods* em sangue para avaliar se a funcionalidade era alterada por incubação das partículas com sangue total e não constataram qualquer interferência. Finalmente, utilizando o modelo de xenoenxerto de células BT474 em camundongos nude, acompanhado do tratamento com estradiol (para promover o crescimento hormônio-dependente) observaram que em 24 h os *nanorods* se acumularam no tumor, mas também no baço e fígado (104).

Tendo em mente as propriedades dos nanocarreadores com matriz de metais nobres como o ouro, para a entrega de drogas direcionada por anticorpos monoclonais já utilizados na clínica, o presente estudo foi formulado para testar a **hipótese de que o transporte de quimioterápicos através de nanocarreadores endereçados às células tumorais EFGR+ e/ou HER2+, poderá favorecer o uso de terapias combinadas para combater o câncer colorretal como mostra a Figura 3.**

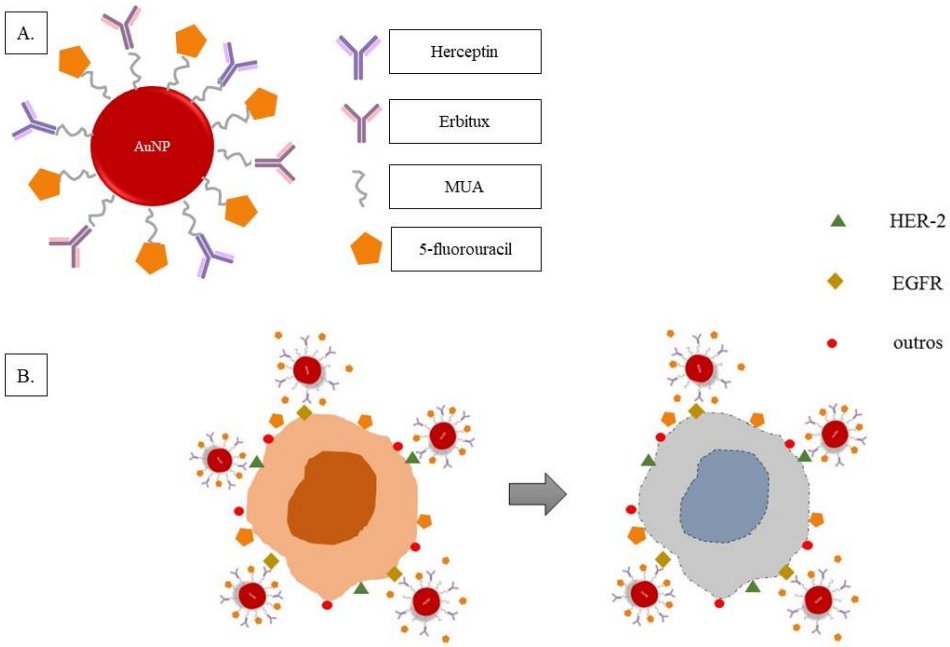


Figura 3. A. Representação esquemática de AuNP recoberta MUA, 5FU e anticorpos monoclonais anti-HER2 e anti-EGFR; e B. ação das AuNP sobre células tumorais. Na imagem são representados marcadores de superfície em verde (HER2 e ligante HER2) e em amarelo escuro (EGFR sofrendo a ação de anti-EGFR e a liberação controlada de 5FU), promovendo a morte da célula tumoral.

2. OBJETIVO

Neste estudo objetivamos incrementar a eficiência de nanopartículas de ouro para transporte do quimioterápico 5-fluorouracil às células tumorais, fazendo seu endereçamento com anticorpos anti-EGFR e anti-HER2, tendo como objetivos específicos:

a) Sintetizar as nanopartículas de ouro, funcionalizando-as com o quimioterápico 5-fluorouracil e anticorpos anti-HER e anti-EGFR;
b) Caracterizar físico-químicamente os compósitos produzidos;
c) Avaliar os efeitos dos compósitos sobre a viabilidade das células de carcinoma colorretal (HCT-116) e adenocarcinoma colorretal (Caco-2).
d) Avaliar os efeitos dos compósitos sobre a proliferação das células de carcinoma colorretal (HCT-116) e adenocarcinoma colorretal (Caco-2).

3. METODOLOGIA

3.1 Síntese das AuNP

As AuNP foram sintetizadas através do método padrão de redução do ácido tetracloroáurico ($HAuCl_4$ – Sigma-Aldrich) com citrato de sódio (Sigma-Aldrich) (86, 89, 105). Brevemente, foi preparada uma solução à 0,1 M de $HAuCl_4$ e outra de citrato de sódio diidratado a 0,68 M. A solução de $HAuCl_4$ foi levada à câmara de refluxo sob fervura e agitação magnética constante, sendo observada uma coloração preta em ebulição após adição da solução de citrato de sódio diidratado. A solução foi mantida em ebulição e agitação por aproximadamente 5 min ou até atingir a coloração vermelho-vinho (86). As sínteses dos compósitos foram realizadas no departamento de química e bioquímica da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" – campus de Botucatu.

3.2 Modificação da superfície das AuNP com 11-mercaptoundecanóico

A superfície das AuNP foi modificada com ácido 11-mercaptoundecanóico (MUA-Sigma-Aldrich). O MUA possui uma extremidade rica em tiol, que se liga irreversivelmente ao ouro e a extremidade livre é um grupamento carboxila para a posterior ligação de 5FU e dos anticorpos. Para isso, uma solução de MUA foi preparada a 0,1 mg/mL em etanol absoluto. Então, em um tubo cônico, adicionamos 100 µL da solução de MUA, para deposição de monocamada automontada de grupamento tiol ao ouro. A incorporação de MUA a AuNP foi avaliada por espectroscopia de luz visível.

3.3 Modificação dos grupamentos carboxilas com EDC/NHS

As carboxilas livres presentes no MUA foram tratadas com N-(3-dimetilaminopropil)-N–etilcarbodiimida (EDC – Sigma-Aldrich) em combinação com N- Hidroxissuccinimida (NHS – Sigma-Aldrich). O EDC é uma carbodiimina utilizada para a ativação de carboxilas para a ligação de aminas primárias, produzindo ligações amida enquanto o NHS é um ativador que torna a combinação altamente reativa, possibilitando acoplar biomoléculas como 5-fluorouracil ou ainda os anticorpos monoclonais anti-EGFR e anti-HER2. A solução de EDC/NHS (1:1) foi preparada de modo a conter 0,4 M de EDC e 0,1 M de NHS (86). Para cada 1 mL de suspensão de AuNP previamente modificada com MUA, adicionamos 100 µL de EDC/NHS. A modificação das carboxilas livres do MUA pelo EDC/NHS foi avaliada por espectroscopia de luz visível.

3.4 Incorporação de 5-fluorouracil e dos anticorpos anti-EGFR e anti-HER2 às AuNP

Os compósitos foram preparados misturando a suspensão de AuNP previamente modificadas com MUA e EDC/NHS com um mix de fármaco e anticorpos às concentrações finais de 7,7M de 5FU, e 100 µg/mL dos anticorpos anti-EGFR e anti-HER2. A mistura de AuNP, anti-HER-2 e anti-EGFR foi submetida a agitação a 50 rpm *overnight* à temperatura de 2 a 8º C. A suspensão foi então centrifugada a 8000x*g* durante 5 min. Algumas suspensões com coloração vermelho-vinho, indicando partículas de menor tamanho, foram submetidas à centrifugação a 12000x*g* por 20 min. Após a remoção do sobrenadante, os compósitos foram ressuspensos em água deionizada (106) e citrato de sódio a 1% (107), centrifugadas novamente e ressuspensas em água e citrato de sódio a 1%, em um volume final de 10 mL. As quantidades adicionadas foram 1mL de 5FU (50mg/mL) a 10 mL de AuNP, anti-HER-2 50 µL (22000µg/mL) e anti-EGFR 200µL (5000 µg/mL adicionamos citrato de sódio a 1% à suspensão, com o objetivo de repor o citrato eliminado na lavagem das AuNP, mantendo assim a sua dispersividade. Após, as diferentes funcionalizações das AuNP foram submetidas a esterilização por luz ultra-violeta em fluxo laminar vertical por 3 horas, seguidas de teste de esterilidade com meio de cultura celular em estufa de CO_2 a 5% à 37ºC. As suspensões foram armazenadas em geladeira (2 a 8ºC) por 30 dias. Os compósitos produzidos foram:

a) AuNP
b) AuNP 5FU
c) AuNP HER2
d) AuNP 5FU HER2
e) AuNP EGFR
f) AuNP 5FU EGFR
g) AuNP HER2 EGFR
h) AuNP 5FU HER2 EGFR

3.5 Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM)

A estrutura das AuNP foi analisada por microscopia eletrônica de transmissão (TEM), para evidenciar a incorporação dos materiais. Para isso, utilizamos grades de cobre de 150 mesh, contendo película de carbono onde foram adicionadas as AuNP por *dropcoating*. Após, retiramos o excesso de líquido da grade encostando delicadamente a extremidade da grade em papel filtro. As amostras foram secas à temperatura ambiente *overnight* e a microscopia foi realizada no dia posterior. O equipamento utilizado foi o FEI

Company / modelo Tecnai G2 Spirit BioTWIN do Laboratório de Caracterização Estrutural do Departamento de Engenharia de Materiais da UFSCar, campus de São Carlos, SP. Os parâmetros utilizados foram: abertura C2=2; voltagem de aceleração: 200kV; spot-scan 8; magnitudes de 160Kx, 620Kx, 1.25Kx.

3.6 Potencial zeta (ζ)

As AuNP foram depositadas em cubetas acrílicas em formato "Y" contendo eletrodos para a determinação do potencial Zeta (ζ) hidrodinâmico. O potencial zeta mede a capacidade de repulsão ou atração eletrostática de cargas superficiais, semelhantes a uma microeletroforese, cujos efeitos se dão na estabilidade dos construtos. Tais medidas nos oferecem um detalhamento do estado de agregação de partículas, possibilitando a melhora das formulações para garantir melhor estabilidade das suspensões. É importante ressaltar que essas medidas são hidrodinâmicas, ou seja, a água forma uma camada de cargas ao redor da partícula, de modo que os tamanhos expressos nos resultados não são os diâmetros e o potencial ζ reais das partículas, visto que estão dispersas em água deionizada e NaCl. As análises foram realizadas nos Laboratório de eletroquímica – Instituto de Química (IQSC) e também no Laboratório de Nanomedicina e Nanotoxicologia, no Instituto de física (IFSC) – ambos localizados na Universidade de São Paulo, campus de São Carlos (USP-SC).

3.7 Cálculo de número de partículas

Com o tamanho de partículas em mãos, estimou-se matematicamente o número de partículas/mL de acordo com Haiss (108) contido em nossa amostra através da fórmula:

$$N = \frac{A_{450}\, x\, 10^{14}}{d^2 \left[-0{,}295 + 1{,}36 \exp\left(-\left(\frac{d - 96{,}8}{78{,}2}\right)^2\right)\right]}$$

Onde,

N = número de partículas/mL;

A_{450} = absorbância da amostra em 450 nm;

d = diâmetro de partículas (nm).

3.8 Cálculo da concentração da suspensão em massa

Com o número de partículas estimado, foi possível calcular a concentração da suspensão em massa, determinada pela fórmula:

$$C_{wt} = N \frac{4}{3} \pi r^3 \, 19.28 \, x \, 10^{-15}$$

Onde,

C_{wt} = Concentração em massa (g/mL);

N = número de partículas/mL;

r = raio da partícula (nm).

3.9 Culturas de células de câncer colorretal

Foram utilizadas células tumorais das linhagens de carcinoma colorretal humano HCT-116 (resistente ao anti-EGFR) adquiridas do banco de células do Rio de Janeiro e adenocarcinoma colorretal humano Caco-2 (sensível ao anti-HER2) gentilmente cedidas pelo professor Dr. Rodrigo Hernandes do Departamento de Microbiologia e Imunologia. As linhagens celulares foram mantidas em meio de cultura completo: meio RPMI 1640 (Gibco) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB - Gibco), 1% de piruvato de sódio (Sigma-Aldrich), 1% aminoácidos não essenciais (Sigma-Aldrich), e 25 mM HEPES (Sigma-aldrich), 1% de antibióticos e antimicóticos (Life Technologies)] a 37°C e sob atmosfera de 5% CO_2 (Shel Lab CO_2 series), em garrafas de 75 cm^3 até atingir 80% de confluência da monocamada.

O projeto de pesquisa tem a aprovação do comitê de ética e pesquisa com seres humanos com Certificado de Apresentação para Apreciação Ética (CAAE): 71397817.6.0000.5411.

3.10 Análise da atividade antitumoral das nanopartículas.

A atividade antitumoral das AuNP foi avaliada mediante a exposição das células tumorais com os diferentes grupos de nanopartículas em duas concentrações, 10^{10} ou $2x10^{10}$ nanopartículas/mL. Os grupos testados foram:

a) Controle negativo
b) AuNP
c) AuNP 5FU
d) AuNP HER2
e) AuNP 5FU HER2
f) AuNP EGFR
g) AuNP 5FU EGFR
h) AuNP HER2 EGFR

i) AuNP 5FU HER2 EGFR

j) 5FU livre 0,38 mM

Para isso, utilizamos $5x10^4$ células/mL em placas de 24 alvéolos, as quais foram mantidas *overnight* em estufa com atmosfera de 5% de CO_2 a 37º C para a aderência. Após a incubação, os alvéolos foram tratados com $1x10^{10}$ ou $2x10^{10}$ partículas/mL. A atividade antitumoral foi avaliada em 24 e 48 horas de tratamento. O volume final de cada alvéolo foi de 1 mL.

3.11 Análise de apoptose e necrose por Anexina V e 7-AAD

Ensaio de citotoxidade foi feito por marcação com anexina V–PE – marcador de apoptose (BD Biosciences) e 7-adenosino-actinomicina D - PerCP – marcador de necrose (7-AAD – BD Biosciences). Para isso, as células HCT-116 ou Caco-2 foram cultivadas como descrito no item anterior.

A anexina V se liga especificamente à fosfatidil serina, uma proteína encontrada na face interna da membrana citoplasmática de modo que células cuja membrana encontra-se íntegra não são marcadas pela anexina V. Células em apoptose, no entanto, sofrem alterações na membrana e expõe a fosfatidilserina na face externa da célula, o que permite a marcação com anexina V (109). A 7AAD, por sua vez, tem forte afinidade com o DNA da célula, de modo que danos na membrana celular permitem a sua entrada na célula e marcação do ácido nucléico (110) .

A seu tempo, os sobrenadantes dos alvéolos foram transferidos para tubos cônico de 15 mL, seguido de lavagem dos alvéolos com 500 µL de PBS e recolhidos em seus respectivos tubos. As células aderentes foram removidas da superfície por tratamento com 200µL de tripsina adicionados nos alvéolos, seguido de incubação por 3 min à 37ºC em estufa de CO_2, e lavagem com 500 µL de meio de cultura completo aquecido. Os alvéolos foram delicadamente lavados para evitar danos celulares e o conteúdo dos alvéolos foram transferidos para os tubos correspondentes, seguidas de centrifugação a 1200 rpm por 8 min.

O sobrenadante foi descartado, seguido de duas lavagens com tampão de anexina V. O tampão de anexina V previamente diluído para a marcação celular. As células foram repassadas para tubos tipo eppendorf seguido da adição de 200 µL de tampão de anexina V e centrifugados à 10000 rpm por 0,5 min. O sobrenadante foi descartado e lavado uma segunda vez com o tampão. Adicionamos quantidade suficiente para completar 100 µL de tampão nos tubos e foi feita a marcação com anexina V (0,75 µL por tubo) seguido de

incubação por 20 min à temperatura ambiente. Após adicionamos 3µL de 7AAD e 200 µL de tampão de anexina V. A aquisição foi realizada em citômetro FACS Canto™ II (BD Biosciences) com *software* FACSDiva. Os resultados foram analisados no *software* FlowJo, versão vX.10.6 (Tree Stars Inc.) (111).

3.12 Análise da proliferação por marcação com CellTrace™ far Red

A análise da proliferação celular foi feita por marcação com CellTrace™ far Red - APC (ThermoFicher Scientific). O CellTrace é um corante intracelular fluorescente utilizado para verificar a taxa de proliferação de células em cultura. A marcação é feita inicialmente com o corante e as células são tratadas e incubadas para a divisão celular. Conforme essas células sofrem o processo de divisão celular, a quantidade de corante é dividida entre as células-filhas, sendo possível observar um decaimento da fluorescência do CellTrace, enquanto as células que não se multiplicaram, mantém fluorescência alta. Nesse caso, utilizamos o corante em aloficocianina (APC) que é lido no canal vermelho do citômetro de fluxo.

Para o ensaio, utilizamos 10^6 células separadas em tubos cônicos, lavadas e ressuspensas em 1 mL de PBS, seguido da adição de 0,25 µL de CellTrace™ e incubadas por 20 min a 37º C e ao abrigo da luz. Após, o volume foi completado com 5 mL de meio de cultura completo e incubado ao abrigo da luz por 5 min. As células foram centrifugadas a 800 x *g* por 7 min, o sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em meio completo pré-aquecido a 37ºC. Para avaliar os efeitos dos compósitos sobre a atividade proliferativa das células tumorais Caco-2 e HCT-116, estas foram cultivadas em placas de 24 alvéolos com $5x10^4$ células por alvéolo e incubadas a 37° C sob atmosfera de 5% de CO_2 *overnight*. As células foram tratadas com $1x10^{10}$ e $2x10^{10}$ partículas/mL de cada compósito por 24, 48 e 72 horas. Em cada período, as células foram removidas por tripsinização, lavadas com PBS e fixadas para a leitura no último dia de incubação seguida de análise por citometria de fluxo (111).

3.13 Análise estatística

Os dados foram submetidos ao teste de Bartlett para análise de variância seguidos dos testes de ANOVA com *post-test* de Tukey ou Dunnet para os dados paramétricos ou de Kruskal-Wallis, para dados não paramétricos, considerando-se significativas as diferenças com menos de 5% de probabilidade de erro ($p \leq 0.05$).

4. RESULTADOS

4.1 Caracterização físico-química das AuNP por espectroscopia de UV-vis

A espectroscopia de UV-vis determinou propriedades características de AuNP, bem como o deslocamento dos picos de absorbância e também o aumento do comprimento de onda indicam que houve incorporação de moléculas na superfície das AuNP. Esse padrão de espectroscopia (Figura 4) indica AuNP de forma esférica e de tamanho aproximado de 15 nm de diâmetro, visto que o pico de absorbância de AuNP é de 518 nm, AuNP MUA 519 nm, AuNP MUA+ EDC/NHS 591 nm, AuNP 5FU 534 nm, AuNP HER2 628 nm, AuNP 5FU HER-2 542 nm, AuNP EGFR 605 nm, AuNP 5FU EGFR 531 nm, AuNP 5FU HER2 EGFR 532 e AuNP HER2 EGFR 627 nm. A ausência de outros picos indica tratar-se de suspensão monodispersa, como confirmado por MET.

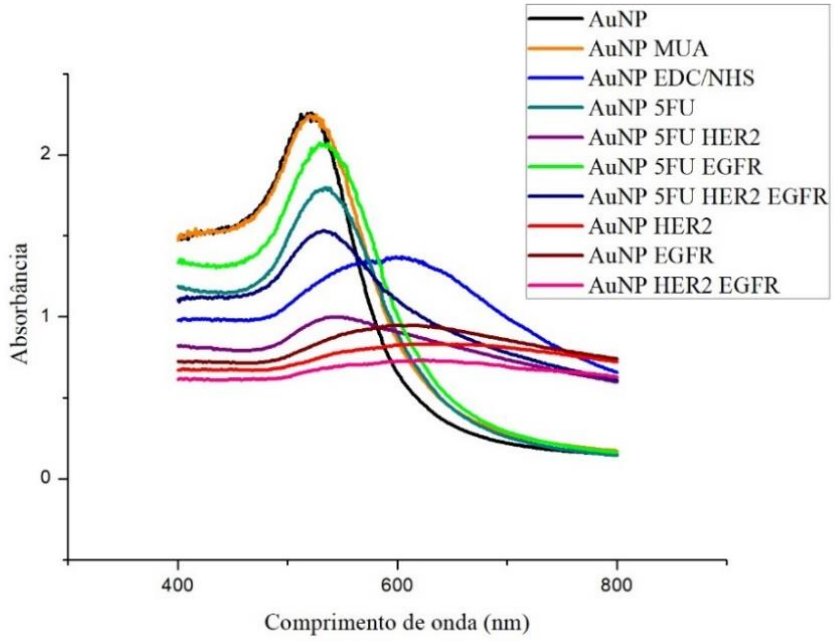


Figura 4. Espectroscopia de Luz UV-visível de AuNP. Na linha preta AuNP sem modificações; na laranja, modificadas MUA; na azul modificada com EDC/NHS; azul petróleo AuNP 5FU; na roxa 5FU HER2; verde limão 5FU EGFR; azul escuro AuNP 5FU HER2 EGFR; na vermelha AuNP HER2; vinho AuNP EGFR e rosa AuNP HER2 EGFR e 5FU.

4.2 Estrutura das AuNP analisadas por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

A microscopia eletrônica de transmissão foi utilizada para avaliar a morfologia das AuNP produzidas neste trabalho e também para avaliar o tamanho de partículas pelo *software* ImageJ (NIH). A Figura 5 exibe nossas AuNP pura e suas diferentes

funcionalizações, tem imagens apresentadas em escala de 100 nm e 10 nm. As AuNP sem modificações de superfície apresentam um diâmetro médio de 11 nm, formato esférico e estão polidispersas (com exceção de AuNP HER2, AuNP EGFR e AuNP HER2 EGFR que mostraram aglomeração). A AuNP 5FU EGFR revelou aumento tênue, mas tamanho superior ao das outras produções de AuNP.

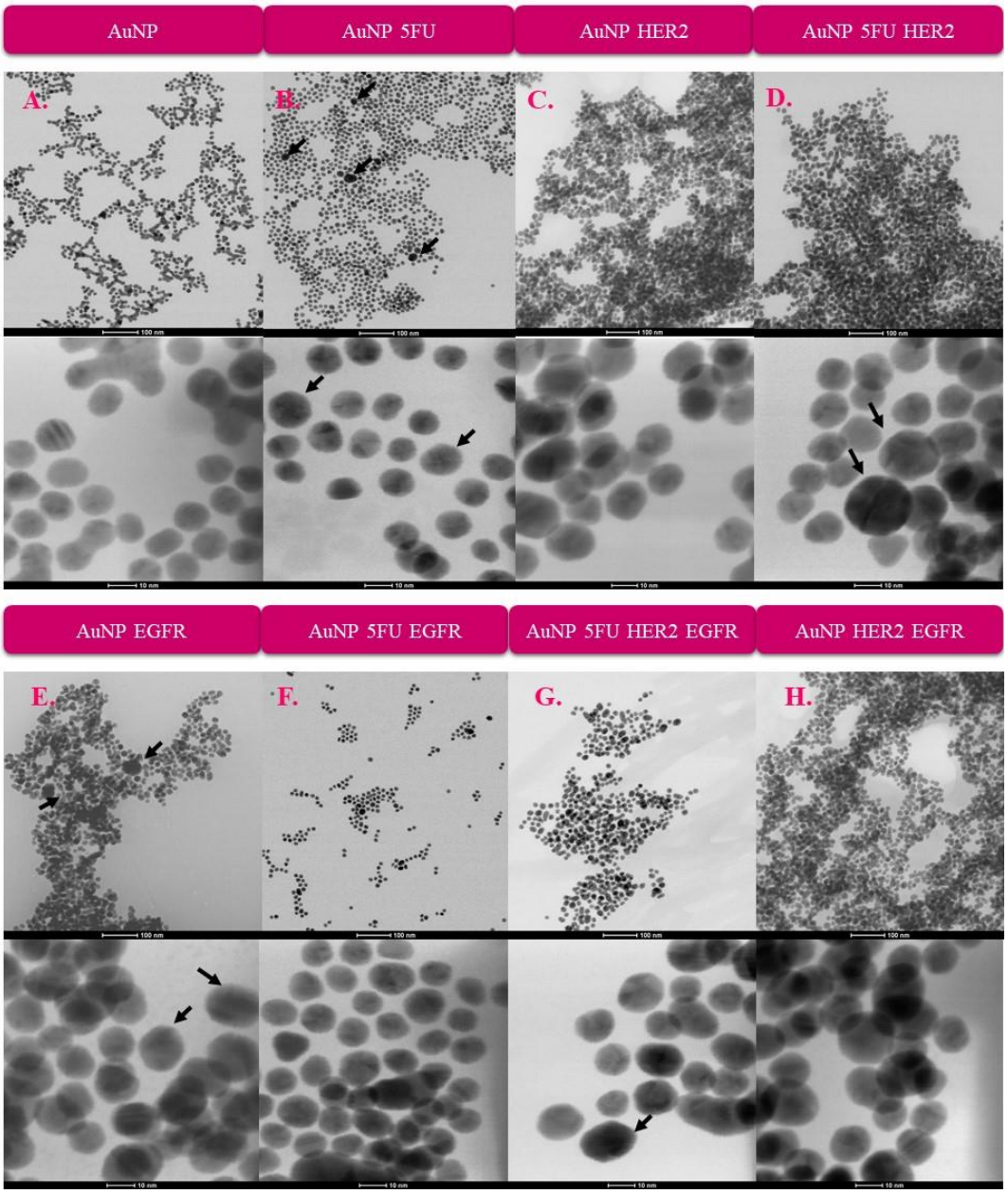


Figura 5. Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) das AuNP. As escalas se encontram nos tamanhos de 100 nm e 10 nm respectivamente. **A.** AuNP; **B.** AuNP 5FU; **C.** AuNP HER2; **D.** AuNP 5FU HER-2; **E.** AuNP EGFR; **F.** AuNP 5FU EGFR; **G.** AuNP 5FU HER2 EGFR; **H.** AuNP HER2 EGFR.

A tabela 3 mostra as dimensões das partículas sintetizadas para o presente estudo, estimadas a partir de imagens obtidas por MET, revelando estruturas com tamanho inferior a

20 nm. Nossa nanopartícula pura, apresentou um tamanho médio de 11, 5 nm, como esperado para essa metodologia de redução de $HAuCl_4$ com citrato de sódio. As incorporações subsequentes apresentaram um leve aumento na superfície, destacando-se a AuNP 5FU EGFR que tendeu ao aumento de 8 nm em relação a AuNP pura.

O potencial zeta exibiu um perfil de cargas negativas e tanto na AuNP sozinha quanto nas que continham quimioterápico (tabela 3). Por outro lado, as nanopartículas que possuem apenas os anticorpos em sua composição, apontaram também carga negativa, porém próxima a zero. A Ressonância Plasmônica de Superfície Localizada (LSPR) caracteriza-se por um fenômeno óptico presente em nanopartículas metálicas, como as AuNP. O fenômeno se deve à oscilação coletiva de elétrons e quando um plasmon é formado, as cargas elétricas se alinham em um dos lados da partícula, porém logo voltam ao seu estado inicial. A mudança de cor ocorre em estados de agregação pois a formação do plasmon leva a uma oscilação de campo elétrico que se desloca muito mais, ocorrendo um decaimento exponencial com a distância da superfície (9). Esse fenômeno permite a caracterização da amostra, cujos resultados foram ilustrados na figura 4.

Tabela 3. Parâmetros físico-químicos das nanopartículas de ouro e dos respectivos compósitos (média e desvio padrão).

Compósito	Diâmetro (nm)	Potencial zeta (mV)
AuNP	11,5 ± 1,06	-46,5 ± 1,10
AuNP 5FU	12,8 ± 1,5	-44,4 ± 2,90
AuNP HER2	14,53 ± 1,09	-3,98 ± 0,316
AuNP 5FU HER2	15,66 ± 0,7	-35,0 ± 0,806
AuNP EGFR	14,9 ± 1,23	-7,45 ± 0,131
AuNP 5FU EGFR	18,83 ± 1,52	-33,1 ± 3,78
AuNP 5FU HER2 EGFR	15,43 ± 0,86	-22,6 ± 0,408
AuNP HER2 EGFR	16,56 ± 1,04	-3,03 ± 0,539

Caracterização físico-química AuNP e seus construtos por ImageJ (tamanho) e Zetasizer Nano ZS90 (potencial zeta). AuNP: nanopartículas sem funcionalização; AuNP-5FU: AuNP funcionalizadas com 5FU; AuNP-HER2: AuNP funcionalizada com anti-HER2; AuNP-5FU-HER2: AuNP funcionalizada com 5FU e anticorpo anti-HER-2; AuNP-EGFR: AuNP funcionalizada com anticorpo anti-EGFR. AuNP-5FU EGFR: AuNP funcionalizada com 5FU e anticorpo anti-EGFR. AuNP-5FU HER2 EGFR: AuNP funcionalizada com 5 FU e os anticorpos anti-HER2 e anti-EGFR e AuNP-EGFR: AuNP funcionalizada com os anticorpos anti-HER-2 e anti-EGFR.

4.3 Quantificação de partículas

A fim de determinar a concentração utilizada nos tratamentos nos ensaios *in vitro*, realizamos cálculos matemáticos para estimar o número de partículas que usaríamos para cada tratamento. No primeiro momento, utilizamos o cálculo de número de partículas descrito por Haiss (108) com base no tamanho das partículas e no comprimento de onda que elas exibem. Esse cálculo estimou o intervalo de 0,57 a 2,95x10^{12} nanopartículas/mL. Observamos que os procedimentos de lavagem das nanopartículas levaram à perda de parte do material. Os resultados são expressos na Tabela 4.

Tabela 4. Estimativa de número de partículas/mL com base na espectroscopia UV-vis

Compósito	**Diâmetro (nm)**	**A_{450}**	**Nº de partículas (x10^{12}) mL^{-1}**
AuNP	11,5 ± 1,06	1,556	2,95
AuNP 5FU	12,8 ± 1,5	1,150	1,73
AuNP HER2	14,53 ± 1,09	0,676	0,84
AuNP 5FU HER2	15,66 ± 0,7	0,791	0,832
AuNP EGFR	14,9 ± 1,23	0,716	0,843
AuNP 5FU EGFR	18,83 ± 1,52	1,316	1,186
AuNP 5FU HER2 EGFR	15,43 ± 0,86	1,121	1,22
AuNP HER2 EGFR	16,56 ± 1,04	0,613	0,57

Estimativa de número de partículas/mL utilizando o diâmetro de partícula obtido por ImageJ (tamanho) e A_{450} – Absorbância em 450 nm. AuNP: nanopartículas sem funcionalização; AuNP-5FU: AuNP funcionalizadas com 5FU; AuNP-HER2: AuNP funcionalizada com anti-HER2; AuNP-5FU-HER2: AuNP funcionalizada com 5FU e anticorpo anti-HER-2; AuNP-EGFR: AuNP funcionalizada com anticorpo anti-EGFR. AuNP-5FU EGFR: AuNP funcionalizada com 5FU e anticorpo anti-EGFR. AuNP-5FU HER2 EGFR: AuNP funcionalizada com5 FU e os anticorpos anti-HER2 e anti-EGFR e AuNP-EGFR: AuNP funcionalizada com os anticorpos anti-HER-2 e anti-EGFR.

Um segundo cálculo foi realizado, dessa vez para estimar a massa das partículas, utilizando a quantidade de partículas do primeiro cálculo. Estimamos que nossas partículas apresentem massa de 45 a 26,13 $\mu g/mL^{-1}$, como descrito na tabela 5.

Tabela 5. Cálculo da massa dos compósitos com base no número e no raio das partículas

Compósito	Raio (nm)	Nº de partículas (x10^{12}) mL^{-1}	C_{wt} ($\mu g/mL^{-1}$)
AuNP	5,75	2,95	45,29
AuNP 5FU	6,4	1,73	36,62
AuNP HER2	7,265	0,84	17,78
AuNP 5FU HER2	7,83	0,832	27,0
AuNP EGFR	7,45	0,843	56,88
AuNP 5FU EGFR	9,415	1,186	39,6
AuNP 5FU HER2 EGFR	7,715	1,22	45,24
AuNP HER2 EGFR	8,28	0,57	26,13

Massa obtida através de cálculo utilizando raio e o número das partículas obtidos na tabela 4. AuNP: nanopartículas sem funcionalização; AuNP-5FU: AuNP funcionalizadas com 5FU; AuNP-HER2: AuNP funcionalizada com anti-HER2; AuNP-5FU-HER2: AuNP funcionalizada com 5FU e anticorpo anti-HER-2; AuNP-EGFR: AuNP funcionalizada com anticorpo anti-EGFR. AuNP-5FU EGFR: AuNP funcionalizada com 5FU e anticorpo anti-EGFR. AuNP-5FU HER2 EGFR: AuNP funcionalizada com 5 FU e os anticorpos anti-HER2 e anti-EGFR e AuNP-EGFR: AuNP funcionalizada com os anticorpos anti-HER-2 e anti-EGFR.

4.4 Avaliação da toxicidade dos construtos sobre as células tumorais

A toxicidade sobre as células foi avaliada através do ensaio de apoptose/necrose celular por citometria de fluxo, utilizando anexina V e 7AAD a fim de determinar a eficácia dos compósitos na eliminação das células tumorais. As células HCT-116 e Caco-2 foram tratadas por 24 e 48 horas com as diferentes AuNP. A estratégia de *gating* foi realizada conforme a figura 6 e os resultados foram divididos em apoptose recente (Q1) e apoptose tardia/necrose (somatório dos quadrantes Q2 e Q3).

Os resultados apresentados foram normalizados em relação ao controle e expressos como Δ toxicidade, isto é, a diferença entre os ensaios teste e o controle (Δ toxicidade= % apoptose induzida pelo tratamento - % apoptose controle).

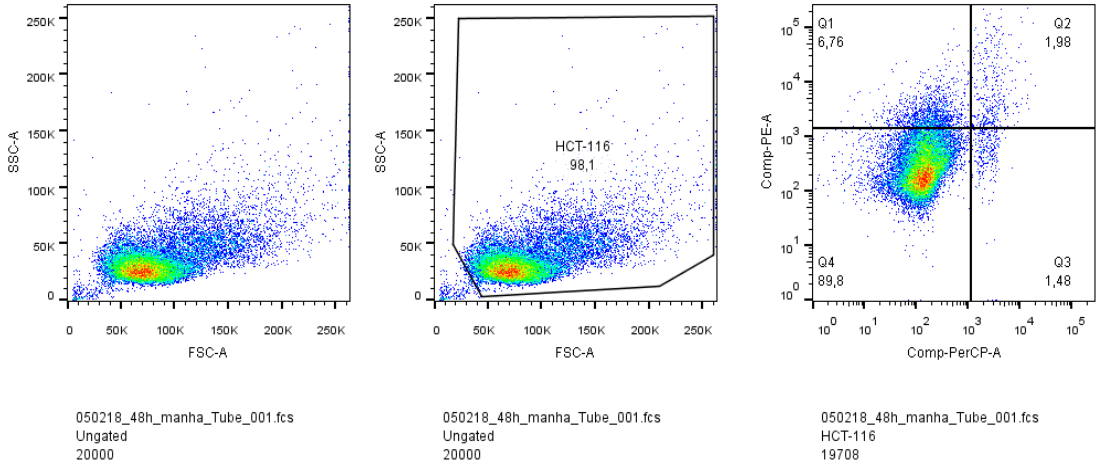


Figura 6. Estratégia de *gating* para análise de viabilidade celular no software FlowJo. A. A contagem de células é dada por complexidade das estruturas internas (SSC – *Side Scatter*) e volume celular (FSC – *Forward Scatter*), cada ponto é representativo de uma célula que foi lida no citômetro. B. Gating na população celular de interesse, excluindo *debris* celulares, na figura representada pelo tubo controle negativo do experimento, onde 89,9% de células são viáveis. C. *Gating* selecionado para separar a marcação de anexina V^+ - PE (Q1), dupla marcação (Q2), marcado apenas com $7AAD^+$ - PerCP (Q3) e viáveis (Q4).

Para melhor visualização, as figuras 7 e 8 ilustram *dotplot*s dos dados obtidos por citometria de fluxo para a linhagem Caco-2, tratadas por 24 e 48 horas, respectivamente. Para essas figuras, mostramos a eficiência dos construtos contendo o anti-EGFR, bem como os controles negativos, AuNP, AuNP 5FU e também o 5FU na forma livre (0,38mM). Os dados de todos os tratamentos realizados encontram-se nas figuras seguintes, os quais foram normalizados e representados em gráficos de barra.

Na figura 9 representamos os dados sobre a capacidade das AuNP induzir apoptose nas células Caco-2 em 24 ou 48 horas representado na figura 8, utilizando duas quantidades diferentes dos construtos, isto é, 10^{10} NP/mL ou $2x10^{10}$ NP/mL. Nossos resultados indicam suscetibilidade das células Caco-2 à apoptose precoce induzido por $2x10^{10}$ NP/mL de AuNP 5FU EGFR, de modo a similar ao 5FU livre, com diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos AuNP EGFR e AuNP 5FU EGFR.

A avaliação feita após 48h de exposição (Figura 10) às duas concentrações de NP mostra a mesma tendência de atividade, especialmente quando desafiamos as células com $2x10^{10}$ NP/mL. É importante ressaltar que no período de 48h o efeito pró-apoptótico dos compósitos carregados com 5FU anti-EGFR foi mais elevado que a droga isoladamente (Figura 10C).

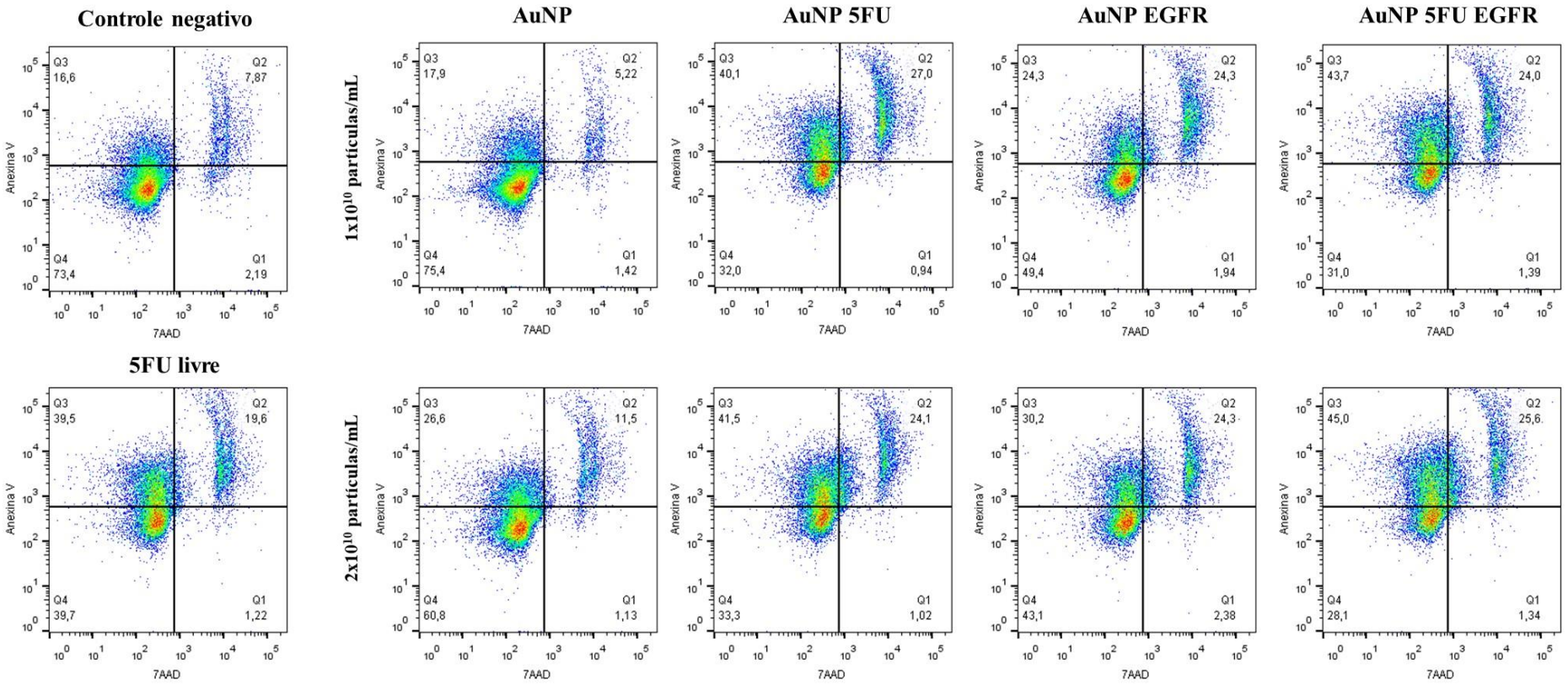


Figura 7. Representação dos dados obtidos por citometria de fluxo sobre a linhagem celular Caco-2. Os tratamentos foram: Controle negativo, 5FU livre, AuNP, AuNP 5FU, AuNP EGFR e AuNP 5FU EGFR nas concentrações de 10^{10} e $2x10^{10}$ partículas/mL, incubadas por 24 horas. Os *dotplot* foram analisados pelo *software* FlowJo, demonstrando a eficácia do tratamento AuNP 5FU EGFR já nas primeiras 24h de estudo (dados representativos de três repetições).

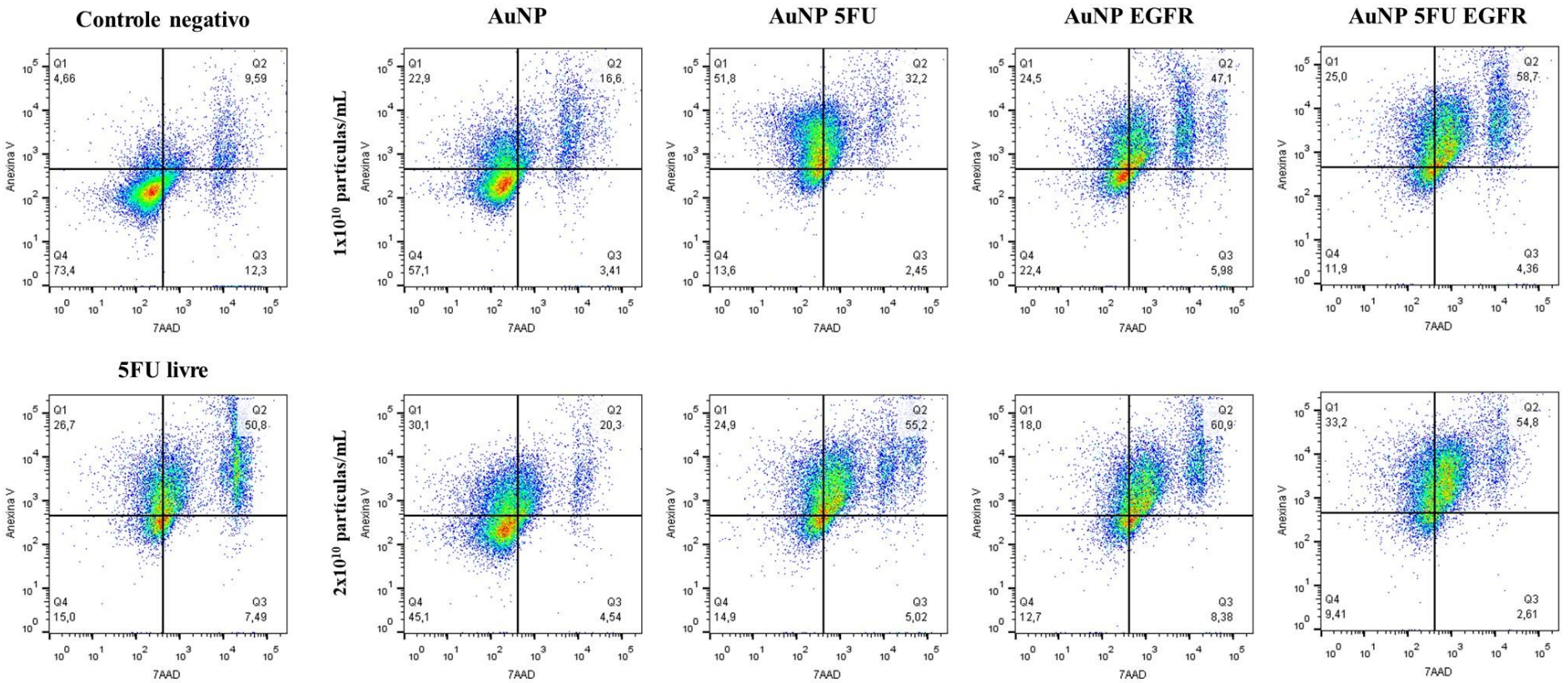


Figura 8. Representação dos dados obtidos por citometria de fluxo sobre a linhagem celular Caco-2. Os tratamentos foram: Controle negativo, 5FU livre, AuNP, AuNP 5FU, AuNP EGFR e AuNP 5FU EGFR nas concentrações de 10^{10} e $2x10^{10}$ partículas/mL, tratadas por 48 horas. Os *dotplot* foram analisados pelo *software* FlowJo e demonstram a eficiência do tratamento AuNP 5FU EGFR onde restaram pouco menos de 10% de células viáveis na maior concentração testada (dados representativos de três repetições).

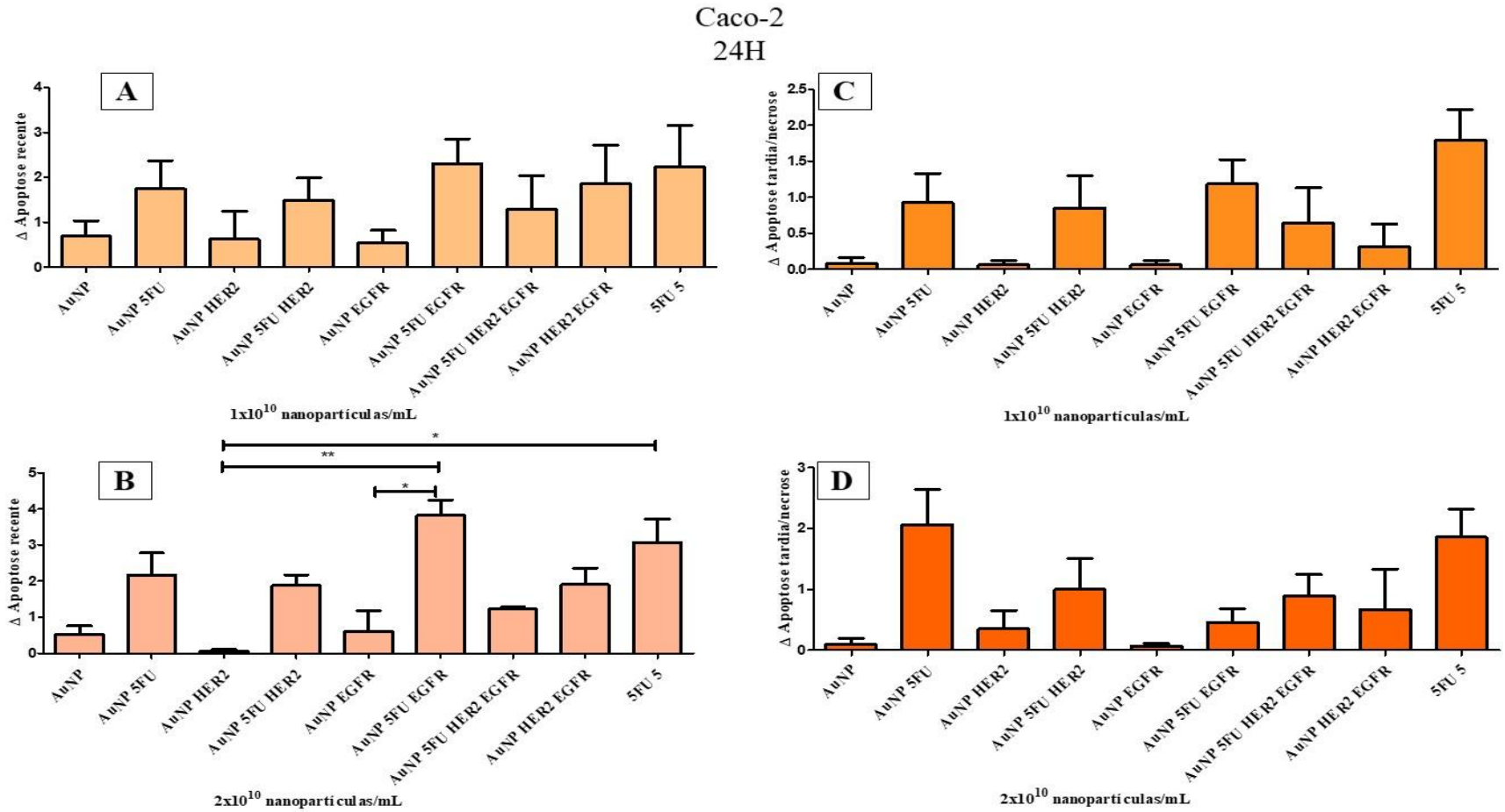


Figura 9. Citotoxicidade dos compósitos sobre células Caco-2 tratadas por 24 horas. **A.** Apoptose precoce (anexina V^+) tratadas com $1x10^{10}$ AuNP/mL. **B.** apoptose precoce tratadas com $2x10^{10}$ AuNP/mL. **C.** apoptose tardia/necrose (anexina V^+ e $7AAD^+$) tratadas com $1x10^{10}$ AuNP/mL. **D.** apoptose tardia/necrose tratadas com $2x10^{10}$ AuNP/mL. A análise estatística foi realizada por *one-way* ANOVA com post-test de Tukey, com significância de $p < 0,05$.

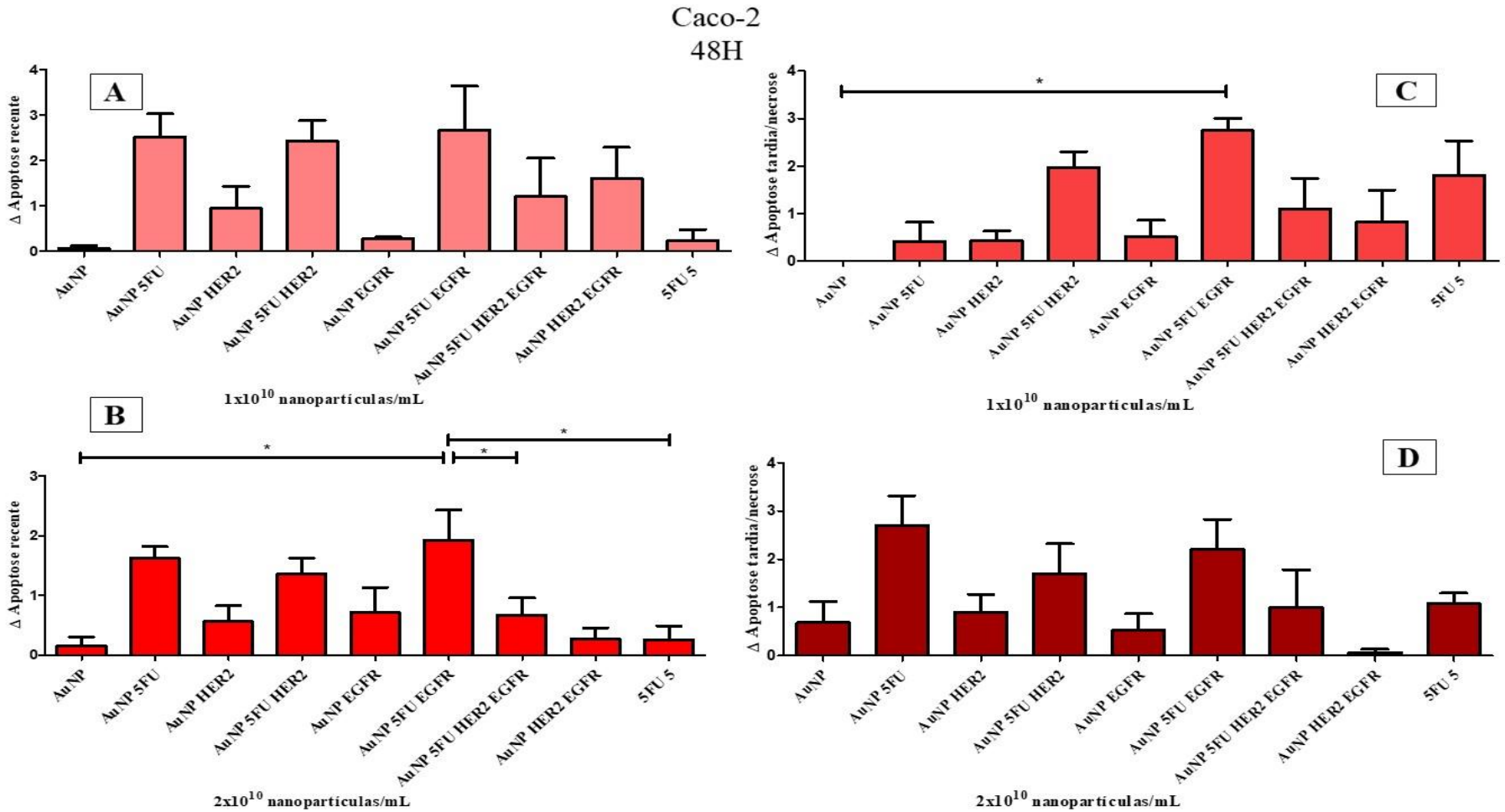


Figura 10. Citotoxicidade dos compósitos sobre células Caco-2 tratadas por 48 horas. **A.** Apoptose precoce (anexina V^+) tratadas com $1x10^{10}$ AuNP/mL. **B.** apoptose precoce tratadas com $2x10^{10}$ AuNP/mL. **C.** apoptose tardia/necrose (anexina V^+ e $7AAD^+$) tratadas com $1x10^{10}$ AuNP/mL. **D.** apoptose tardia/necrose tratadas com $2x10^{10}$ AuNP/mL**.** A análise estatística foi realizada por *one-way* ANOVA com post-test de Tukey, com significância de $p < 0,05$.

Nossos resultados indicam que o anticorpo anti-HER2 não foi eficiente em promover o endereçamento das partículas às células Caco-2 para induzir apoptose, independentemente da quantidade de partículas adicionadas à cultura celular.

Por outro lado, as células HCT-116 mostraram-se mais resistentes do que as Caco-2, observando-se baixos níveis de apoptose sob desafio com as NP no período de 24 horas (Figura 11). Apenas após 48 horas foi possível observar uma tendência de aumento na capacidade das AuNP 5FU EGFR em provocar apoptose precoce dessas células, tanto com o uso de 10^{10} quanto de $2x10^{10}$ NP/mL (Figura 12 E, G) e também para essa linhagem celular não observamos ação relevante atribuível a incorporação de anticorpo anti-HER2 às partículas.

Outro ponto relevante, é que a AuNP por si só não provocou ação apoptótica e/ou necrótica em relação ao controle em nenhuma das linhagens, atestando que o potencial citotóxico dos compósitos foi exclusivamente da incorporação das moléculas propostas.

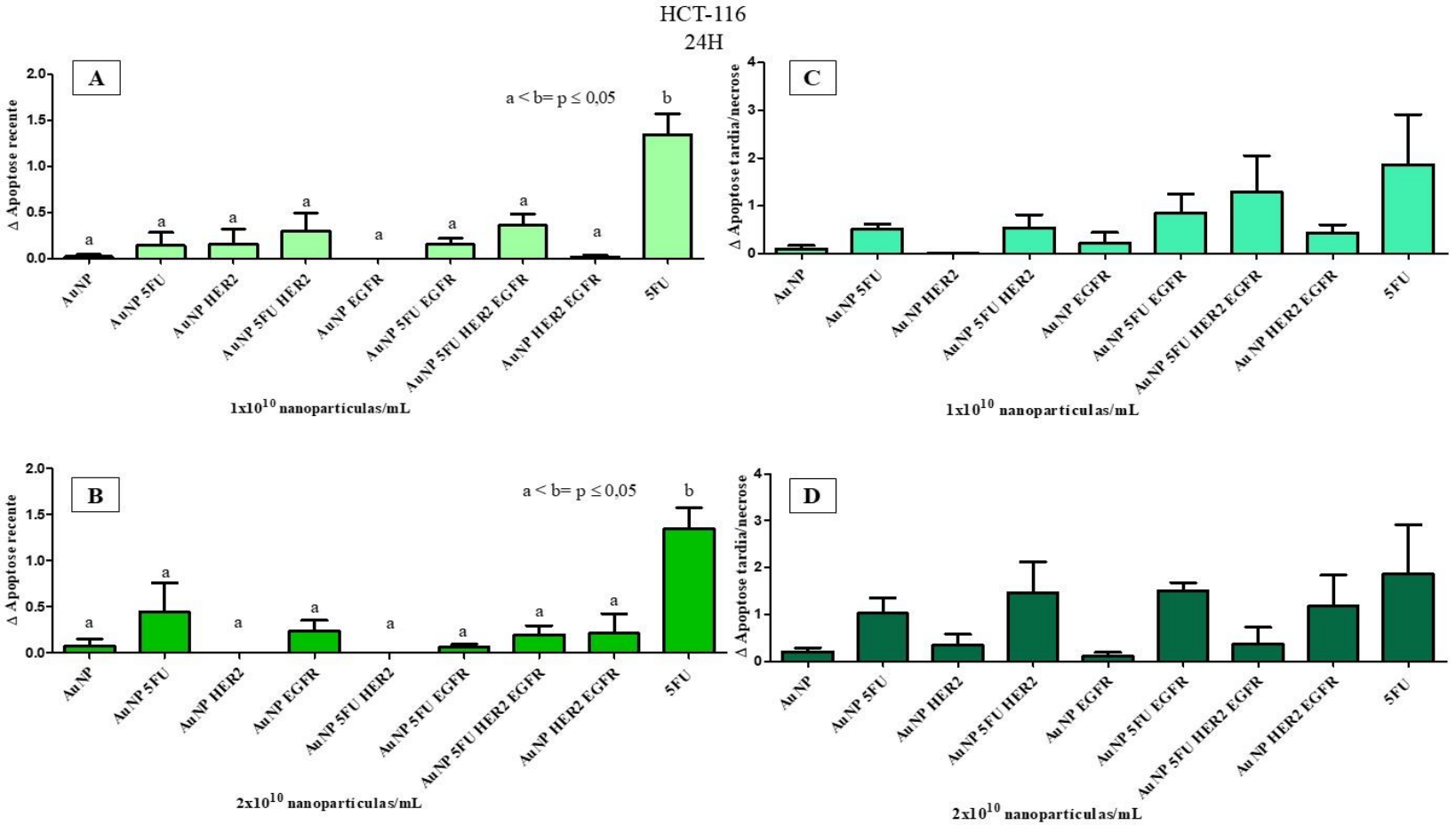


Figura 11. Citotoxicidade das nanopartículas de ouro e funcionalizações sobre células de carcinoma colorretal humano HCT-116 tratadas por 24 horas. Os resultados são apresentados em diferença dos tratamentos em relação ao grupo controle. **A.** Células em apoptose recente (anexina V^+) tratadas com $1x10^{10}$ AuNP/mL. **B.** células em apoptose recente tratadas com $2x10^{10}$ AuNP/mL. **C.** células em apoptose tardia/necrose (anexina V^+ e $7AAD^+$) tratadas com $1x10^{10}$ AuNP/mL. **D.** células em apoptose tardia/necrose tratadas com $2x10^{10}$ AuNP/mL. A análise estatística foi realizada por *one-way* ANOVA com post-test de Tukey, com significância de $p < 0,05$.

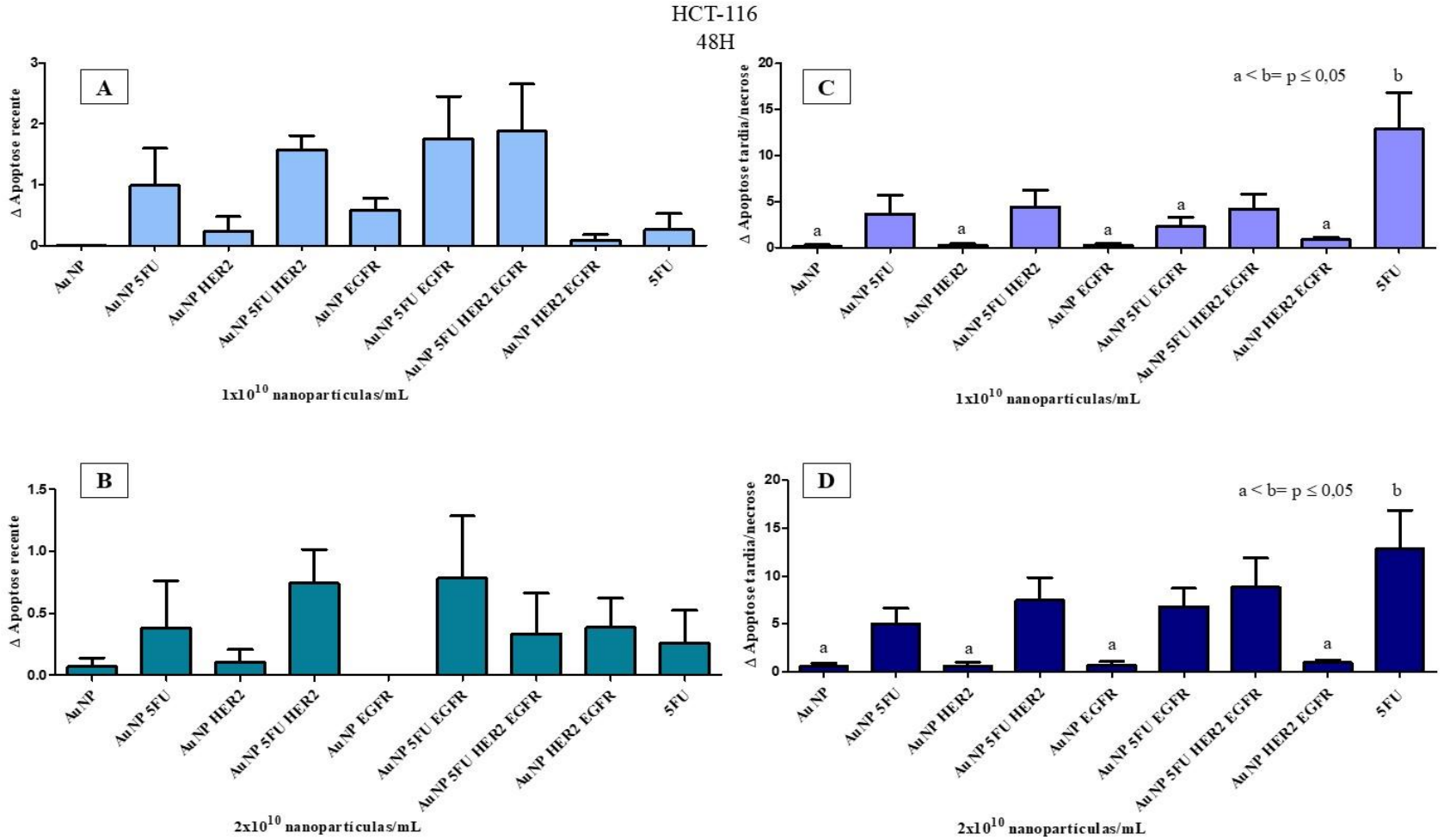


Figura 12. Citotoxicidade das nanopartículas de ouro e funcionalizações sobre células de carcinoma colorretal humano HCT-116 tratadas por 48 horas. Os resultados são apresentados em diferença dos tratamentos em relação ao grupo controle. A. Células em apoptose recente (anexina V^+) tratadas com $1x10^{10}$ AuNP/mL. B. células em apoptose recente tratadas com $2x10^{10}$ AuNP/mL. C. células em apoptose tardia/necrose (anexina V^+ e $7AAD^+$) tratadas com $1x10^{10}$ AuNP/mL. D. células em apoptose tardia/necrose tratadas com $2x10^{10}$ AuNP/mL. A análise estatística foi realizada por *one-way* ANOVA com post-test de Tukey, com significância de $p < 0,05$.

4.5 Ação antiproliferativa dos compósitos de ouro

Para ter uma visão mais clara da eficiência dos compósitos sintetizados em nosso estudo, utilizamos o ensaio de proliferação celular para avaliar se as partículas seriam capazes de impedir a proliferação das células tumorais. Nesse ensaio, o fluorocromo foi inserido no citoplasma das células no tempo zero, de modo que inicialmente todas essas células possuem a mesma quantidade de fluorocromo. À medida que essas células se dividem há uma diluição da fluorescência, como mostrado na Figura 13, ficando cada célula-filha com metade da intensidade de fluorescência da célula-mãe (sem diluição). Tem-se, portanto, que a proliferação é inversamente proporcional à intensidade de fluorescência detectada.

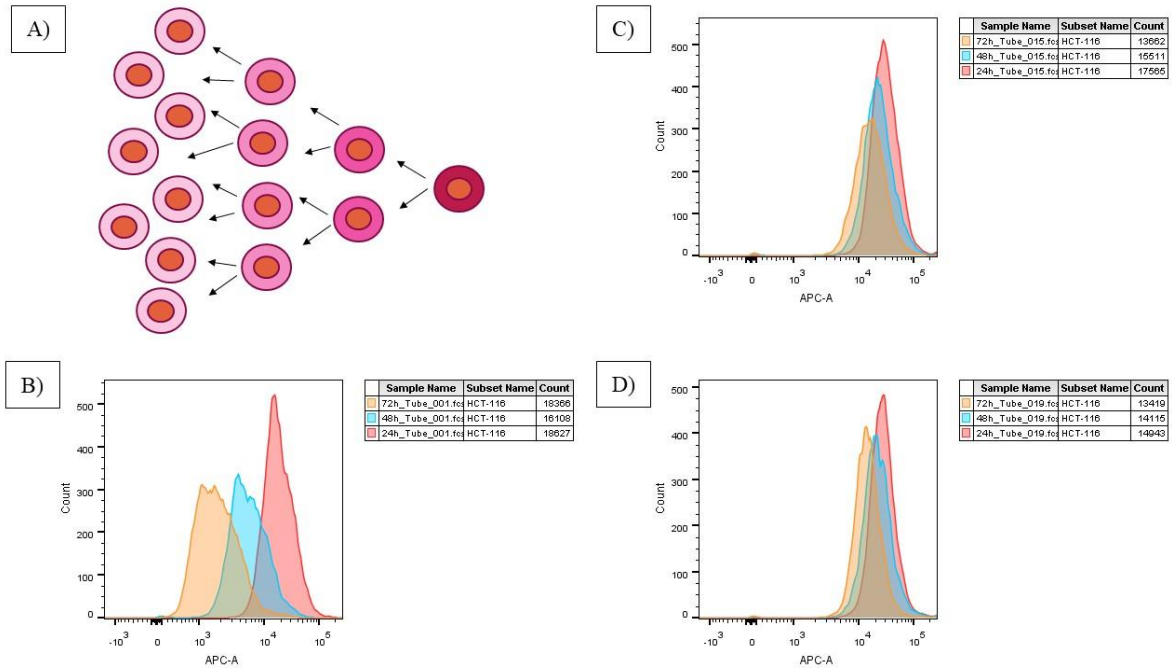


Figura 13. Figura representativa do ensaio de proliferação celular por CellTrace™. **A)** as células são previamente coradas com o CellTrace™, no processo de divisão celular, o corante é dividindo entre o citoplasma das células filhas, diminuindo a concentração a cada ciclo. **B)** Histograma da marcação com CellTrace no grupo controle. O pico vermelho é referente a 24 h de tratamento; o azul 48 h; o laranja 72h. Cada pico representa a divisão celular e consequentemente a diluição do CellTrace no citoplasma. **C)** Tratamento com AuNP 5FU EGFR na concentração de $2x10^{10}$ NP/mL. As células deste tratamento não proliferaram, devido a citotoxicidade do tratamento, nota-se também a diminuição na intensidade da fluorescência. **D)** Tratamento com 5FU livre (0,38mM), nesse tratamento as células não sofreram divisão celular devido a sua ação citotóxica.

Esse ensaio nos permitiu observar que as partículas que contém 5FU em sua formulação foram mais eficientes que aquelas contendo apenas os anticorpos. Observamos que as células HCT-116 (Figura 14) e Caco-2 (Figura 15) foram igualmente afetadas pela exposição a tais compósitos, em especial a AuNP 5FU EGFR, AuNP 5FU HER2 EGFR e AuNP 5FU HER2. Esse padrão repetiu-se em todos os 3 períodos de avaliação (24, 48 e 72h), mas foi mais evidente após 72h de cultura. Não encontramos correlação com a atividade de NP adicionadas à cultura, isto é, tanto as culturas desafiadas com 10^{10} quanto aquelas desafiadas com $2x10^{10}$, apresentaram os mesmos perfis de susceptibilidade aos compósitos.

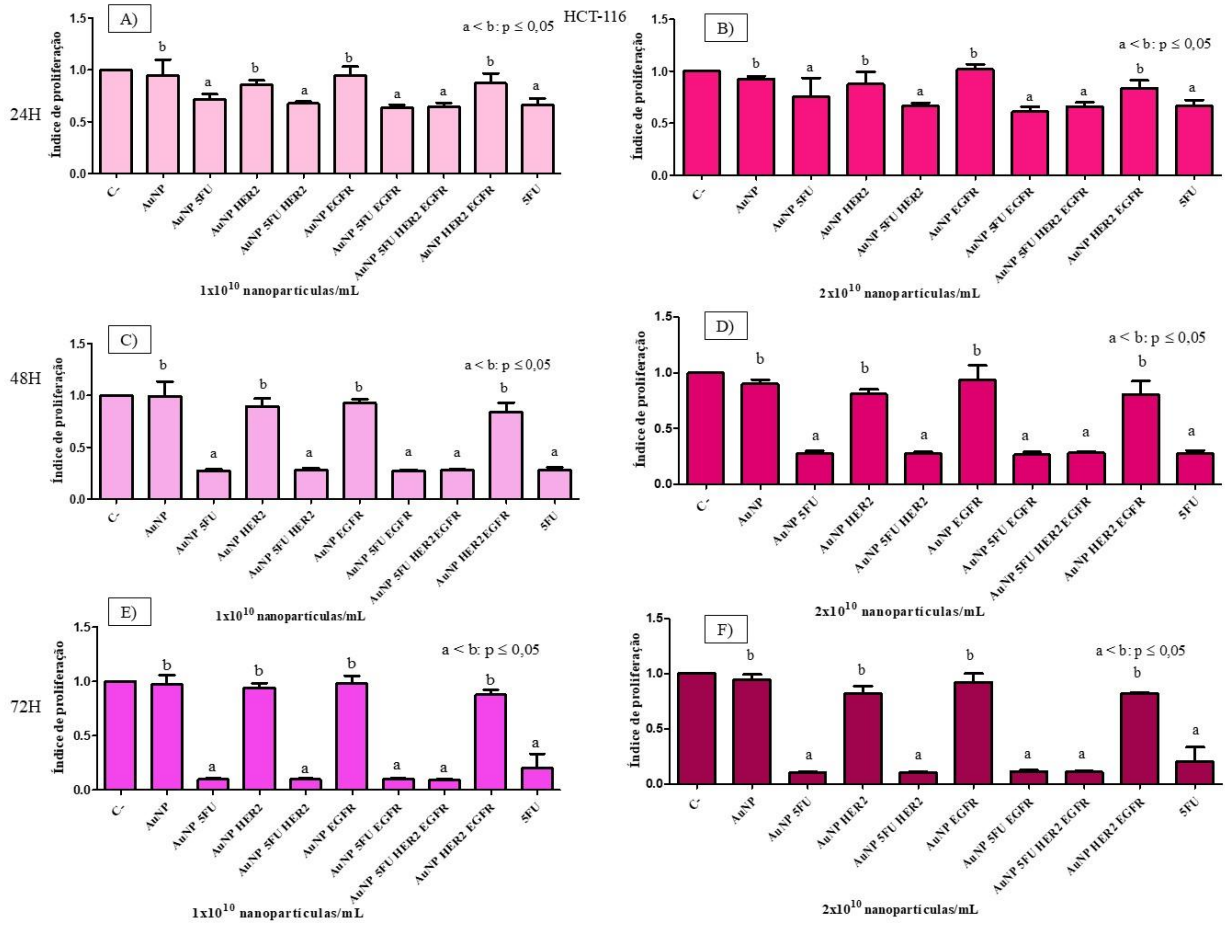


Figura 14. Índice de proliferação celular na linhagem de carcinoma colorretal HCT-116 avaliando a diluição de CellTrace™ no citoplasma das células. As células foram coradas, tratadas (1 ou $2x10^{10}$ NP/mL) e recolhidas nos tempos de 24, 48 e 72h: **A)** 24h com $1x10^{10}$ NP/mL; **B)** 24h com $2x10^{10}$ NP/mL; **C)** 48h com $1x10^{10}$ NP/mL; **D)** 48h com $2x10^{10}$ NP/mL e **E)** 72h com $1x10^{10}$ NP/mL e **F)** 72h com $2x10^{10}$ NP/mL. A análise estatística foi realizada por *one-way* ANOVA seguido de *post-test* de Dunnet, com significância de $p < 0,05$.

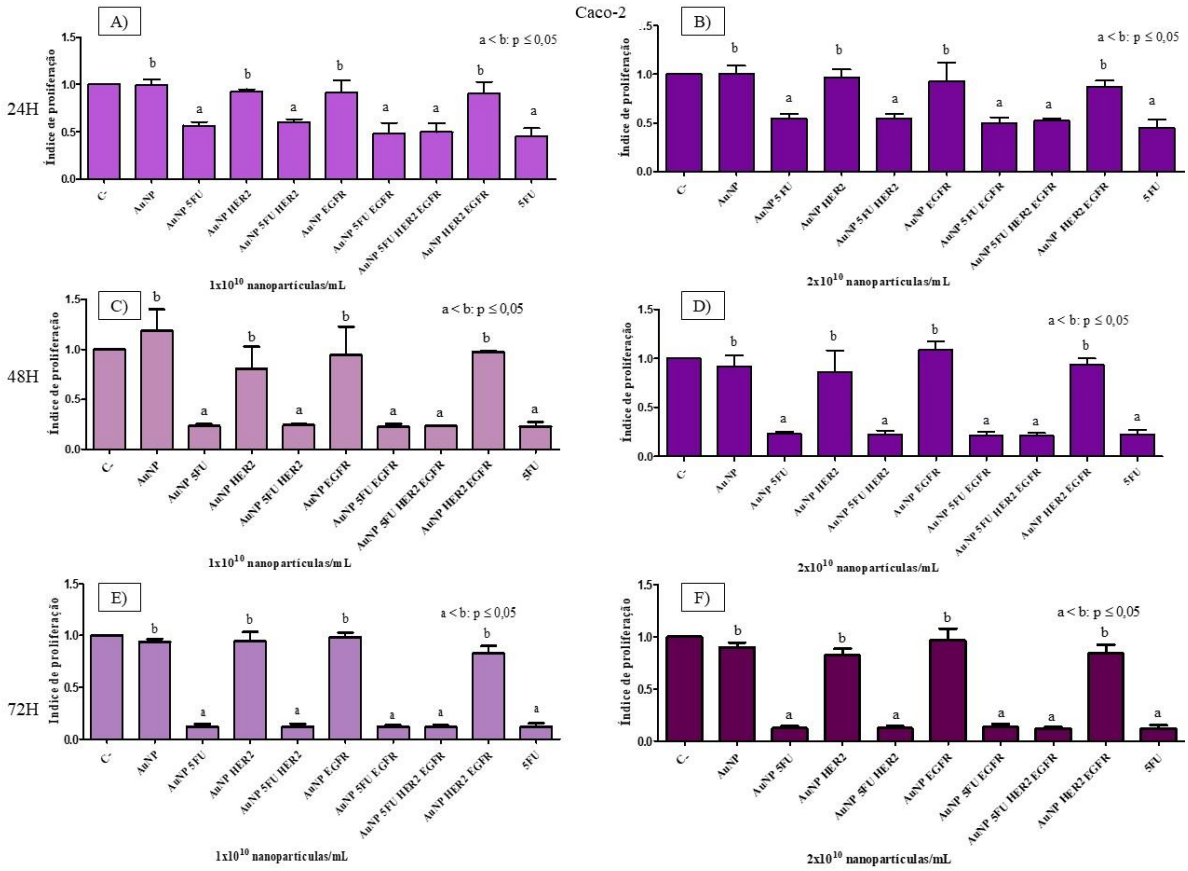


Figura 15. Índice de proliferação celular na linhagem de adenocarcinoma colorretal Caco-2 avaliando a diluição de CellTrace™ no citoplasma das células. As células foram coradas, tratadas (1 ou $2x10^{10}$ NP/mL) e recolhidas nos tempos de 24, 48 e 72h: **A)** 24h com $1x10^{10}$ NP/mL; **B)** 24h com $2x10^{10}$ NP/mL; **C)** 48h com $1x10^{10}$ NP/mL; **D)** 48h com $2x10^{10}$ NP/mL e **E)** 72h com $1x10^{10}$ NP/mL e **F)** 72h com $2x10^{10}$ NP/mL. A análise estatística foi realizada por *one-way* ANOVA seguido de *post-test* de Dunnet, com significância de $p < 0,05$.

5 DISCUSSÃO

AuNP são conhecidas por suas propriedades colorimétricas (7), dependendo do tamanho, formato e estado de agregação e/ou aglomeração, as AuNP mudam de coloração. Nanopartículas esféricas de ouro com tamanho aproximado de 15 nm possuem coloração “vermelho vinho” quando recém-sintetizada, tornando-se mais roxas, quanto maior seu estado de agregação (8). Assim, o fenômeno de ressonância plasmônica, permitiu comprovar a síntese das AuNP, mostrando a característica avermelhada cujo comprimento de onda no espectro visível é entre 500-600 nm (9).

Nosso maior desafio foi a manipulação das AuNP para viabilizar a incorporação dos materiais propostos sem que o procedimento promovesse agregação das partículas. As primeiras amostras sintetizadas foram revestidas com polietilenoimina (PEI), polímero sintético rico em grupamentos amina, objetivando minimizar possíveis efeitos tóxicos das nanopartículas e também fornecer maior superfície de ligação do quimioterápico e dos dois anticorpos. Entretanto, a funcionalização polimérica foi ineficiente, visto que formou agregados aglomerados nas AuNP. Decidimos então modificar o protocolo, excluindo a etapa de polimerização com PEI e observamos uma melhoria no aspecto das nanopartículas, como demonstrado nas imagens obtidas por MET.

Existem quatro tipos de estruturas que as AuNP podem formar após a sua construção, essas estruturas descritas foram importantes nas nossas análises, visto que em um primeiro momento, nossas AuNP que foram funcionalizadas com PEI mostraram agregados aglomerados, nossa preocupação foi evitar essas estruturas.

O primeiro tipo de estrutura são as partículas primárias, consistem AuNP dispersas como as ilustradas na figura 5A e 5B. Com a adição de moléculas orgânicas, a segunda estrutura formada são os aglomerados de partículas primárias, ou seja, as AuNP se aproximaram devido a interações físico-químicas, porém as formas das AuNP são bem evidentes, não havendo sobreposição de partículas e foram evidenciadas nas figuras 5C, 5D, 5E, 5F, 5G e 5H. A terceira formação são os agregados e sua característica é a ausência de definição entre as AuNP, pois há sobreposição das nanoestruturas. A quarta e última formação são os agregados aglomerados e, nesse caso, a agregação é tão intensa que não se tem distinção das AuNP, apenas uma massa é vista nas imagens de MET. Vale ressaltar que essa classificação foi realizada com imagens de MET em escala de 10 nm (112).

Para comprovar as ligações dos agentes funcionalizantes, realizamos a espectroscopia de UV/visível, o qual pico inicial foi de 518 nm, característico de nanopartículas de ouro, cujo Au (III) foi reduzido pelo citrato de sódio (113). A cada incorporação foi possível observar o deslocamento do pico para a direita, ou seja, o aumento seu espectro de absorção, indicando que as moléculas foram incorporadas às AuNP (114). Essa caracterização também foi essencial para o cálculo de número de partículas utilizado para os tratamentos em ensaios biológicos.

As AuNP foram funcionalizadas para torná-las compatíveis pela inserção de 11-mercaptoundecanóico (MUA) servindo como uma ponte entre a nanopartícula e a droga e os anticorpos. Essa funcionalização reduz a toxicidade direta das nanopartículas por reduzir sua hidrofobicidade e aumentar sua dispersividade (115). Esse procedimento foi feito pelo método de deposição de camada auto-montada, introduzindo uma ligação tiol ao Au e deixa uma extremidade carboxila livre (116). Essa carboxila foi então modificada com EDC e NHS para ativação dos grupos carboxila, para permitir a imobilização de compostos amínicos (117), como é o caso do 5FU e dos anticorpos. Após funcionalização com MUA, EDC/NHS, notamos uma alteração na coloração pela mudança superficial e também do tamanho das partículas quando adicionamos o EDC/NHS, que foi revertido rapidamente após a adição de 5FU. Nos grupos que contêm apenas os anticorpos, as AuNP permaneceram com coloração arroxeada.

A microscopia eletrônica de transmissão (MET) exibiu imagens de nossas nanopartículas que tiveram um tamanho em torno de 10-15 nm de diâmetro. A inserção de 5FU não demonstrou um aumento no diâmetro significativo, permanecendo com aproximadamente 12 nm, visto que a molécula de 5FU possui o tamanho de 5,3 Angström (118). Observações compatíveis com dados da literatura de que AuNP acopladas com glutationa, molécula maior que o 5FU, não apresenta crescimento de diâmetro superficial (79). Em outro estudo utilizando a cisplatina, as AuNP obtidas tinham 13 nm, também não alterado com a adição da droga (119), esses resultados confirmam os dados encontrados na espectroscopia de UV-visível.

As funcionalizações com o quimioterápico e anticorpos evidenciaram aumento do diâmetro médio das partículas, entretanto, o deslocamento dos picos constatados na espectroscopia de luz UV-visível, foram muito altos, possivelmente devido a aglomeração de partículas como mostrado nas imagens de MET (120), com exceção de AuNP 5FU EGFR que não apresentou grandes aglomerados.

Esses aglomerados encontrados nas imagens de MET se devem principalmente pela incorporação das moléculas orgânicas, no caso, os anticorpos, os quais induziram a formação de ligações não-covalentes, o que permitiu a aproximação das nanopartículas (121).

Adicionalmente aos testes de caracterização físico-química, o potencial zeta complementou nossos dados no que diz respeito ao estado de aglomeração de alguns de nossos compósitos. As nanopartículas que permaneceram dispersas em suspensão apresentaram potencial zeta hidrodinâmico superior a -20 mV, mantendo as AuNP afastadas, repelindo-se através de alta carga de superfície. Em contrapartida, as AuNP conjugadas apenas com os anticorpos, expressaram carga de superfície muito próxima de zero, o que explica o fenômeno de aglomeração observado nesses grupos (122).

Deka et al. demonstraram o potencial de DNA de fita simples sequestrar os íons citrato que recobrem as nanopartículas de ouro (107) e acreditamos que os anticorpos utilizados no nosso estudo tenham tido o mesmo efeito. Esse é um evento difícil de ser revertido, visto que houve a adição de íons citrato na suspensão e mesmo assim o efeito não foi revertido de forma total.

Nanopartículas são carregadas superficialmente e se comportam de maneiras distintas frente às variações de pH (12,15). Para que suspensões de partículas sejam dispersas, o potencial zeta deve ser diferente de 0 e quanto mais distante de zero, mais as partículas sofrem repulsão, que indica alto grau de estabilidade (12) . Essas cargas repelem-se e impedem a formação de agregados ou aglomerados devido a atração interpartículas por forças de Van der Waals.

Haiss e colaboradores (108) descreveram as equações matemáticas baseadas na teoria de Mie sobre a ressonância plasmônica. Nesse estudo os autores demonstraram que é possível estimar o número de partículas de ouro presentes em uma solução por UV-vis e essa estimativa foi utilizada para determinar a quantidade de partículas a serem usadas nos tratamentos celulares. Feito isso, concentramos nossos esforços para os ensaios funcionais *in vitro.* Os tratamentos feitos com AuNP em cinética de 24 e 48 h se basearam na possibilidade de liberação lenta e gradual de drogas (21). Nossa primeira observação importante foi que a AuNP sozinha é inerte frente aos ensaios biológicos realizados, ao contrário do que alguns estudos relatam (123). A adição do quimioterápico 5-fluorouracil à AuNP promoveu atividade apoptótica e também na cessação da proliferação celular. Perfil similar foi descrito for Safwat et al. (79) em AuNP funcionalizadas com glutationa e 5FU,

provocando a morte de células de câncer colorretal provenientes de ressecções cirúrgicas encaminhadas a histopatologia. Outro estudo utilizando AuNP conjugadas com 5FU mostrou morte celular 20% superior ao 5FU livre ($1x10^{-4}$ M) e AuNP sozinhas também não apresentaram toxicidade (124).

Ainda assim, a combinação de AuNP mais 5FU conjugada com o anticorpo anti-EGFR mostrou um aumento da citotoxicidade, principalmente por apoptose recente na maior concentração de nanopartículas testada, especialmente na linhagem de adenocarcinoma Caco-2, inclusive observando uma tendência a ter um efeito superior ao 5FU na forma livre. A expressão de EGFR na superfície de células da linhagem Caco-2 é significativamente maior do que a expressão do mesmo marcador na linhagem HCT-116, sendo um dos motivos para a eficiência do tratamento ser maior em adenocarcinoma Caco-2 (125).

A combinação de AuNP, quimioterápico e o anticorpo anti-HER-2, também mostrou tendência citotóxica, ainda que em baixa quantidade, por apoptose recente na linhagem de carcinoma HCT-116. Em relação a proliferação celular, a combinação AuNP 5FU HER-2 exerceu seu papel, desempenhando a suspensão da divisão celular, devido a morte precoce dessas células tanto na linhagem HCT-116, quanto na Caco-2.

Em ensaios *in vitro*, a linhagem BT-474 ($HER2^+$) e MCF-7 ($HER2^-$), ambas de câncer de mama, foram incubadas com AuNP (15 nm) polimerizadas com polietilenoglicol-SH com anti-HER2 ou anti-IgG por 17h, verificando-se a especificidade das AuNP por $HER2^+$, que se ligaram aos receptores de membrana, tendo como controle um anti-IgG, que não se ligou às células. Em um segundo momento, testes *in vivo* foram realizados injetando as mesmas AuNP pela via subcutânea em camundongos. Os animais foram tratados com as nanopartículas após 5 dias da injeção das células tumorais. Ensaios de imagem *in vivo* revelaram que as nanopartículas se mantiveram na periferia do tumor que superexpressa HER2, sendo alvo de promissor para diagnóstico por imagem (126). No caso da célula utilizada em nosso estudo, HCT-116, apresentam expressão de HER2 menor que a linhagem de câncer de mama BT-474, que tem superexpressão de HER2, a baixa eficiência de nossas partículas que contém anti-HER2 pode ser explicada por esse motivo (125, 127).

O Erbitux (128) e o Herceptin (129), medicamentos à base de anticorpos IgG_1 monoclonais quiméricos anti-EGFR e anti-HER2, respectivamente, possuem excipientes em sua formulação para garantir a sua estabilidade, como cloreto de sódio, glicina, polisorbato 80, ácido cítrico monoidratado, hidróxido de sódio e água de injeção. A adição de anticorpos

às nanopartículas de ouro é delicada, visto que o anticorpo sequestra íons citrato que dão estabilidade a partícula, sem os quais há agregação de partículas (107). Para tentar minimizar esses efeitos, durante as lavagens, adicionamos uma solução de citrato de sódio, a fim de impedir que houvesse essa captura de forma massiva dos íons citrato que recobrem a partícula, que ajudam a manter a dispersividade.

A ineficiência do anticorpo anti-HER2 em endereçar as partículas e provocar a morte ou impedir a proliferação das células-alvo foi inesperada pois a linhagem Caco-2 apresenta superexpressão de HER2 em sua membrana (125). É possível que tenha havido absorção inadequada desses anticorpos às partículas, em decorrência de características da solução diferente, visto que se trata de anticorpo de uso clínico, cuja formulação não é totalmente explicitada na bula.

Outro ponto a ser ressaltado, é que AuNP HER2 teve evidentes agregados mostrados por MET e, portanto, se houvesse anticorpos a ela ligados, esses não conseguiram ocupar todos os receptores das células, visto que estão no emaranhado de partículas (125).

A combinação da AuNP com anticorpos anti-HER-2 e anti-EGFR não aumentou a citotoxicidade como originalmente hipotetizado, mesmo quando combinados (AuNP HER2 EGFR). Uma análise importante, foi que a microscopia eletrônica de transmissão, exibiu nanopartículas fortemente agrupadas, e como hipótese, os anticorpos encontrados nessa suspensão de nanopartículas não conseguiram ocupar todos os receptores celulares, para assim bloqueá-los e findar a sinalização intracelular comandada pelos supracitados.

Para diferenciar esse tipo de efeito, os dois ensaios biológicos, de morte por anexinaV^+ *versus* 7AAD^+ e o de proliferação por CellTrace™ devem ser vistos como um todo. Nesse sentido, analisando todos os ensaios em conjunto, concluímos que a interrupção do ciclo celular aqui mostrada foi causada pela morte das células em cultura, corroborando com os ensaios anteriores de que os construtos têm o efeito citotóxico sobre as linhagens celulares de câncer colorretal.

Apesar de nossos esforços, as AuNP que contém apenas os anticorpos mantiveram-se agregadas. As nanopartículas em suspensão adquirem uma carga superficial por adsorção de íons ou dissociação de prótons, onde é formada uma camada dupla de cargas. Essa dupla camada pode repelir as partículas entre si por forças repulsivas eletrostáticas, porém o cloreto de sódio diminui a distância dessa dupla camada, culminando em agregação de partículas pelas forças de Van der Waals (122), que foi visualizada nas formulações de AuNP com os anticorpos.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Frente aos resultados obtidos e discutidos no decorrer dessa dissertação, podemos concluir que:

- Produzimos nanopartículas de ouro de tamanho diminuto, modificando sua superfície com MUA e EDC/NHS para a incorporação do quimioterápico 5-fluorouracil e dos anticorpos anti-HER2 e anti-EGFR.
- Obtivemos partículas esféricas, porém, em algumas formulações testadas, houve aglomeração das partículas, principalmente naquelas em que os anticorpos foram inseridos, e isso se atribuiu as ligações químicas entre as moléculas orgânicas.
- A AuNP sozinha não provocou nenhum dano, seja na viabilidade ou na proliferação das células, o que é excelente, pois demonstra que os efeitos citotóxicos aqui mostrados foram em relação a inserção do quimioterápico e dos anticorpos.
- As AuNP que contém EGFR associados ao 5FU foi eficaz na cessação da proliferação e esse efeito parece ser decorrente da sua capacidade de induzir apoptose nas células-alvo. As outras formulações, como a AuNP 5FU, AuNP 5FU HER2 e AuNP 5FU HER2 EGFR também exibiram efeitos citotóxicos e na proliferação celular, porém de modo mais discreto.
- A linhagem de adenocarcinoma colorretal, Caco-2 revelou-se mais sensível aos tratamentos do que as de carcinoma HCT-116. Entretanto, em relação à proliferação de HCT-116, as formulações que contém o 5FU ou o 5FU aliado aos anticorpos, pareceram mais eficientes que o controle 5FU livre quando mantidas em cultura por 72h.

7 REFERÊNCIAS

1. Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2012. CA: a cancer journal for clinicians. 2012 Jan-Feb;62(1):10-29. PubMed PMID: 22237781.
2. (INCA) INdCJAGdS. Estimativa 2012 - Incidência de Câncer no Brasil. In: Vigilância CGdAECdPe, editor. Estimativa 2012 : incidência de câncer no Brasil Rio de Janeiro INCA; 2011. p. 118.
3. Arvelo F, Sojo F, Cotte C. Biology of colorectal cancer. Ecancermedicalscience. 2015;9:520. PubMed PMID: 25932044. Pubmed Central PMCID: 4404039.
4. Millan M, Merino S, Caro A, Feliu F, Escuder J, Francesch T. Treatment of colorectal cancer in the elderly. World journal of gastrointestinal oncology. 2015 Oct 15;7(10):204-20. PubMed PMID: 26483875. Pubmed Central PMCID: 4606175.
5. Li CJ, Zhang X, Fan GW. Updates in colorectal cancer stem cell research. Journal of cancer research and therapeutics. 2014 Dec;10 Suppl:233-9. PubMed PMID: 25693926.
6. Zhang YY, Chen B, Ding YQ. Metastasis-associated factors facilitating the progression of colorectal cancer. Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP. 2012;13(6):2437-44. PubMed PMID: 22938401.
7. Guan S. Statistical designs for early phases of cancer clinical trials. Journal of biopharmaceutical statistics. 2012;22(6):1109-26. PubMed PMID: 23075011.
8. Yao HW, Wu HW, Liu YH. [From traditional population-based approach to individualized precision medicine: the interpretation of update on The AJCC Colorectal Cancer Staging System, Eighth Edition]. Zhonghua wai ke za zhi [Chinese journal of surgery]. 2017 Jan 01;55(1):24-7. PubMed PMID: 28056249.
9. Chen L, She X, Wang T, He L, Shigdar S, Duan W, et al. Overcoming acquired drug resistance in colorectal cancer cells by targeted delivery of 5-FU with EGF grafted hollow mesoporous silica nanoparticles. Nanoscale. 2015 Sep 07;7(33):14080-92. PubMed PMID: 26242620.
10. Gullick WJ. The epidermal growth factor system of ligands and receptors in cancer. European journal of cancer. 2009 Sep;45 Suppl 1:205-10. PubMed PMID: 19775619.
11. Ross JS, McKenna BJ. The HER-2/neu oncogene in tumors of the gastrointestinal tract. Cancer investigation. 2001;19(5):554-68. PubMed PMID: 11458821.
12. Nathanson DR, Culliford ATt, Shia J, Chen B, D'Alessio M, Zeng ZS, et al. HER 2/neu expression and gene amplification in colon cancer. International journal of cancer. 2003 Jul 20;105(6):796-802. PubMed PMID: 12767065.
13. McKay JA, Murray LJ, Curran S, Ross VG, Clark C, Murray GI, et al. Evaluation of the epidermal growth factor receptor (EGFR) in colorectal tumours and lymph node metastases. European journal of cancer. 2002 Nov;38(17):2258-64. PubMed PMID: 12441262.
14. Hynes NE, Schlange T. Targeting ADAMS and ERBBs in lung cancer. Cancer cell. 2006 Jul;10(1):7-11. PubMed PMID: 16843261.
15. Ellina MI, Bouris P, Aletras AJ, Theocharis AD, Kletsas D, Karamanos NK. EGFR and HER2 exert distinct roles on colon cancer cell functional properties and expression of matrix macromolecules. Biochimica et biophysica acta. 2014 Aug;1840(8):2651-61. PubMed PMID: 24792576.
16. Matsumoto S, Fujii S, Kikuchi A. Arl4c is a key regulator of tubulogenesis and tumourigenesis as a target gene of Wnt-beta-catenin and growth factor-Ras signalling. Journal of biochemistry. 2017 Jan;161(1):27-35. PubMed PMID: 28053143.

17. Sipos F, Firneisz G, Muzes G. Therapeutic aspects of c-MYC signaling in inflammatory and cancerous colonic diseases. World journal of gastroenterology. 2016 Sep 21;22(35):7938-50. PubMed PMID: 27672289. Pubmed Central PMCID: 5028808.
18. Yang YF, Wang GY, He JL, Wu FP, Zhang YN. Overall survival of patients with KRAS wild-type tumor treated with FOLFOX/FORFIRI+/-cetuximab as the first-line treatment for metastatic colorectal cancer: A meta-analysis. Medicine. 2017 Mar;96(12):e6335. PubMed PMID: 28328812. Pubmed Central PMCID: 5371449.
19. Xiang S, Xiang T, Xiao Q, Li Y, Shao B, Luo T. Zinc-finger protein 545 is inactivated due to promoter methylation and functions as a tumor suppressor through the Wnt/beta-catenin, PI3K/AKT and MAPK/ERK signaling pathways in colorectal cancer. International journal of oncology. 2017 Sep;51(3):801-11. PubMed PMID: 28677721. Pubmed Central PMCID: 5564408.
20. Ntavatzikos A, Spathis A, Patapis P, Machairas N, Peros G, Konstantoudakis S, et al. Integrating TYMS, KRAS and BRAF testing in patients with metastatic colorectal cancer. World journal of gastroenterology. 2017 Aug 28;23(32):5913-24. PubMed PMID: 28932083. Pubmed Central PMCID: 5583576.
21. Pabla B, Bissonnette M, Konda VJ. Colon cancer and the epidermal growth factor receptor: Current treatment paradigms, the importance of diet, and the role of chemoprevention. World journal of clinical oncology. 2015 Oct 10;6(5):133-41. PubMed PMID: 26468449. Pubmed Central PMCID: 4600187.
22. Normanno N, De Luca A, Bianco C, Strizzi L, Mancino M, Maiello MR, et al. Epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling in cancer. Gene. 2006 Jan 17;366(1):2-16. PubMed PMID: 16377102.
23. Schlessinger J. All signaling is local? Molecular cell. 2002 Aug;10(2):218-9. PubMed PMID: 12191465.
24. Lara PN, Jr., Laptalo L, Longmate J, Lau DH, Gandour-Edwards R, Gumerlock PH, et al. Trastuzumab plus docetaxel in HER2/neu-positive non-small-cell lung cancer: a California Cancer Consortium screening and phase II trial. Clinical lung cancer. 2004 Jan;5(4):231-6. PubMed PMID: 14967075.
25. Lara PN, Jr., Chee KG, Longmate J, Ruel C, Meyers FJ, Gray CR, et al. Trastuzumab plus docetaxel in HER-2/neu-positive prostate carcinoma: final results from the California Cancer Consortium Screening and Phase II Trial. Cancer. 2004 May 15;100(10):2125-31. PubMed PMID: 15139054.
26. Coogan CL, Estrada CR, Kapur S, Bloom KJ. HER-2/neu protein overexpression and gene amplification in human transitional cell carcinoma of the bladder. Urology. 2004 Apr;63(4):786-90. PubMed PMID: 15072912.
27. Safran H, Iannitti D, Ramanathan R, Schwartz JD, Steinhoff M, Nauman C, et al. Herceptin and gemcitabine for metastatic pancreatic cancers that overexpress HER-2/neu. Cancer investigation. 2004;22(5):706-12. PubMed PMID: 15581051.
28. Tsai JY, Aviv H, Benevenia J, Chang VT, Patterson F, Aisner S, et al. HER-2/neu and p53 in osteosarcoma: an immunohistochemical and fluorescence in situ hybridization analysis. Cancer investigation. 2004;22(1):16-24. PubMed PMID: 15069760.
29. Petricevic B, Laengle J, Singer J, Sachet M, Fazekas J, Steger G, et al. Trastuzumab mediates antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity and phagocytosis to the same extent in both adjuvant and metastatic HER2/neu breast cancer patients. Journal of translational medicine. 2013 Dec 12;11:307. PubMed PMID: 24330813. Pubmed Central PMCID: 4029549.
30. Baselga J, Norton L, Albanell J, Kim YM, Mendelsohn J. Recombinant humanized anti-HER2 antibody (Herceptin) enhances the antitumor activity of paclitaxel and

doxorubicin against HER2/neu overexpressing human breast cancer xenografts. Cancer research. 1998 Jul 01;58(13):2825-31. PubMed PMID: 9661897.
31. Ingold Heppner B, Behrens HM, Balschun K, Haag J, Kruger S, Becker T, et al. HER2/neu testing in primary colorectal carcinoma. British journal of cancer. 2014 Nov 11;111(10):1977-84. PubMed PMID: 25211663. Pubmed Central PMCID: 4229629.
32. Farzand S, Siddique T, Saba K, Bukhari MH. Frequency of HER2/neu overexpression in adenocarcinoma of the gastrointestinal system. World journal of gastroenterology. 2014 May 21;20(19):5889-96. PubMed PMID: 24914350. Pubmed Central PMCID: 4024799.
33. Holzmann K, Welter C, Klein V, Pistorius G, Seitz G, Blin N. Tumor-specific methylation patterns of erbB2 (HER2/neu) sequences in gastro-intestinal cancer. Anticancer research. 1992 May-Jun;12(3):1013-8. PubMed PMID: 1352439.
34. McKay JA, Loane JF, Ross VG, Ameyaw MM, Murray GI, Cassidy J, et al. c-erbB-2 is not a major factor in the development of colorectal cancer. British journal of cancer. 2002 Feb 12;86(4):568-73. PubMed PMID: 11870539. Pubmed Central PMCID: 2375271.
35. Kirouac DC, Du J, Lahdenranta J, Onsum MD, Nielsen UB, Schoeberl B, et al. HER2+ Cancer Cell Dependence on PI3K vs. MAPK Signaling Axes Is Determined by Expression of EGFR, ERBB3 and CDKN1B. PLoS computational biology. 2016 Apr;12(4):e1004827. PubMed PMID: 27035903. Pubmed Central PMCID: 4818107.
36. Yonesaka K, Zejnullahu K, Okamoto I, Satoh T, Cappuzzo F, Souglakos J, et al. Activation of ERBB2 signaling causes resistance to the EGFR-directed therapeutic antibody cetuximab. Science translational medicine. 2011 Sep 7;3(99):99ra86. PubMed PMID: 21900593. Pubmed Central PMCID: 3268675.
37. Parts RoSB. Part:BBa_K1694005 Single-chain variable fragment (Anti-HER2) 2015 [cited 2018 23 March]. Available from: http://parts.igem.org/Part:BBa_K1694005.
38. Bardelli A, Janne PA. The road to resistance: EGFR mutation and cetuximab. Nature medicine. 2012 Feb 6;18(2):199-200. PubMed PMID: 22310681.
39. Yazdi MH, Faramarzi MA, Nikfar S, Abdollahi M. A Comprehensive Review of Clinical Trials on EGFR Inhibitors Such as Cetuximab and Panitumumab as Monotherapy and in Combination for Treatment of Metastatic Colorectal Cancer. Avicenna journal of medical biotechnology. 2015 Oct-Dec;7(4):134-44. PubMed PMID: 26605007. Pubmed Central PMCID: 4629455.
40. Van Emburgh BO, Sartore-Bianchi A, Di Nicolantonio F, Siena S, Bardelli A. Acquired resistance to EGFR-targeted therapies in colorectal cancer. Molecular oncology. 2014 Sep 12;8(6):1084-94. PubMed PMID: 24913799. Pubmed Central PMCID: 5528615.
41. Zhang XQ, Sun XE, Liu WD, Feng YG, Zhang HM, Shi LH, et al. Synergic effect between 5fluorouracil and celecoxib on hypoxic gastric cancer cells. Molecular medicine reports. 2015 Feb;11(2):1160-6. PubMed PMID: 25351347.
42. Elsoueidi R, Craig J, Mourad H, Richa EM. Safety and efficacy of FOLFOX followed by cetuximab for metastatic colorectal cancer with severe liver dysfunction. Journal of the National Comprehensive Cancer Network : JNCCN. 2014 Feb;12(2):155-60. PubMed PMID: 24586077.
43. Tran NH, Cavalcante LL, Lubner SJ, Mulkerin DL, LoConte NK, Clipson L, et al. Precision medicine in colorectal cancer: the molecular profile alters treatment strategies. Therapeutic advances in medical oncology. 2015 Sep;7(5):252-62. PubMed PMID: 26327923. Pubmed Central PMCID: 4543854.
44. Cao W, Yang W, Lou G, Jiang J, Geng M, Xi W, et al. Phase II trial of infusional fluorouracil, leucovorin, oxaliplatin, and irinotecan (FOLFOXIRI) as first-line treatment for advanced gastric cancer. Anti-cancer drugs. 2009 Apr;20(4):287-93. PubMed PMID: 19177020.

45. Ishii K, Kanamoto A, Miyanaga S, Noto M, Takeda T, Tani T, et al. [The present status of CapeOX as adjuvant chemotherapy for colorectal cancer]. Gan to kagaku ryoho Cancer & chemotherapy. 2015 Mar;42(3):319-22. PubMed PMID: 25812500.
46. Schilsky RL. Biochemical and clinical pharmacology of 5-fluorouracil. Oncology. 1998 Oct;12(10 Suppl 7):13-8. PubMed PMID: 9830619.
47. Posner MR, Darnowski JW, Weitberg AB, Dudley MN, Corvese D, Cummings FJ, et al. High-dose intravenous zidovudine with 5-fluorouracil and leucovorin. A phase I trial. Cancer. 1992 Dec 15;70(12):2929-34. PubMed PMID: 1451076.
48. Cohen SS, Flaks JG, Barner HD, Loeb MR, Lichtenstein J. The Mode of Action of 5-Fluorouracil and Its Derivatives. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1958 Oct 15;44(10):1004-12. PubMed PMID: 16590300. Pubmed Central PMCID: 528686.
49. Initiative NN, editor Leading to the Next Industrial Revolution A Report by the Interagency Working Group on Nanoscience, Engineering and Technology. National Nanotechnology Initiative; 2000; Washington, DC: Committee on Technology, National Science and Technology Council.
50. Barkhordari A, Barzegar S, Hekmatimoghaddam H, Jebali A, Rahimi Moghadam S, Khanjani N. The toxic effects of silver nanoparticles on blood mononuclear cells. The international journal of occupational and environmental medicine. 2014 Jul;5(3):164-8. PubMed PMID: 25027045.
51. Hubbs AF, Mercer RR, Benkovic SA, Harkema J, Sriram K, Schwegler-Berry D, et al. Nanotoxicology--a pathologist's perspective. Toxicologic pathology. 2011 Feb;39(2):301-24. PubMed PMID: 21422259.
52. Safi M, Courtois J, Seigneuret M, Conjeaud H, Berret JF. The effects of aggregation and protein corona on the cellular internalization of iron oxide nanoparticles. Biomaterials. 2011 Dec;32(35):9353-63. PubMed PMID: 21911254.
53. Palchetti S, Pozzi D, Capriotti AL, Barbera G, Chiozzi RZ, Digiacomo L, et al. Influence of dynamic flow environment on nanoparticle-protein corona: From protein patterns to uptake in cancer cells. Colloids and surfaces B, Biointerfaces. 2017 May 01;153:263-71. PubMed PMID: 28273493.
54. Paula AJ, Araujo Junior RT, Martinez DS, Paredes-Gamero EJ, Nader HB, Duran N, et al. Influence of protein corona on the transport of molecules into cells by mesoporous silica nanoparticles. ACS applied materials & interfaces. 2013 Sep 11;5(17):8387-93. PubMed PMID: 23841723.
55. Uechi I, Yamada S. Photochemical and analytical applications of gold nanoparticles and nanorods utilizing surface plasmon resonance. Analytical and bioanalytical chemistry. 2008 Aug;391(7):2411-21. PubMed PMID: 18607578.
56. Zargar B, Hatamie A. Localized surface plasmon resonance of gold nanoparticles as colorimetric probes for determination of Isoniazid in pharmacological formulation. Spectrochimica acta Part A, Molecular and biomolecular spectroscopy. 2013 Apr;106:185-9. PubMed PMID: 23380146.
57. Fuku K, Hayashi R, Takakura S, Kamegawa T, Mori K, Yamashita H. The synthesis of size- and color-controlled silver nanoparticles by using microwave heating and their enhanced catalytic activity by localized surface plasmon resonance. Angewandte Chemie. 2013 Jul 15;52(29):7446-50. PubMed PMID: 23740666.
58. Tian J, Min Y, Rodgers Z, Au KM, Hagan CTt, Zhang M, et al. Co-delivery of paclitaxel and cisplatin with biocompatible PLGA-PEG nanoparticles enhances chemoradiotherapy in non-small cell lung cancer models. Journal of materials chemistry B, Materials for biology and medicine. 2017 Aug 14;5(30):6049-57. PubMed PMID: 28868145. Pubmed Central PMCID: 5576184.

59. Rajpoot K, Jain SK. Colorectal cancer-targeted delivery of oxaliplatin via folic acid-grafted solid lipid nanoparticles: preparation, optimization, and in vitro evaluation. Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology. 2017 Aug 29:1-12. PubMed PMID: 28849671.
60. Noorani M, Azarpira N, Karimian K, Heli H. Erlotinib-loaded albumin nanoparticles: A novel injectable form of erlotinib and its in vivo efficacy against pancreatic adenocarcinoma ASPC-1 and PANC-1 cell lines. International journal of pharmaceutics. 2017 Aug 25;531(1):299-305. PubMed PMID: 28847671.
61. Hanafi-Bojd MY, Moosavian Kalat SA, Taghdisi SM, Ansari L, Abnous K, Malaekeh-Nikouei B. MUC1 Aptamer-conjugated mesoporous silica nanoparticles effectively target breast cancer cells. Drug development and industrial pharmacy. 2017 Aug 23:1-18. PubMed PMID: 28832225.
62. He Y, Luo L, Liang S, Long M, Xu H. Amino-functionalized mesoporous silica nanoparticles as efficient carriers for anticancer drug delivery. Journal of biomaterials applications. 2017 Jan 01:885328217724638. PubMed PMID: 28776488.
63. Pan G, Jia TT, Huang QX, Qiu YY, Xu J, Yin PH, et al. Mesoporous silica nanoparticles (MSNs)-based organic/inorganic hybrid nanocarriers loading 5-Fluorouracil for the treatment of colon cancer with improved anticancer efficacy. Colloids and surfaces B, Biointerfaces. 2017 Aug 08;159:375-85. PubMed PMID: 28818782.
64. Agrawal P, Singh RP, Sonali, Kumari L, Sharma G, Koch B, et al. TPGS-chitosan cross-linked targeted nanoparticles for effective brain cancer therapy. Materials science & engineering C, Materials for biological applications. 2017 May 01;74:167-76. PubMed PMID: 28254282.
65. He R, Yin C. Trimethyl chitosan based conjugates for oral and intravenous delivery of paclitaxel. Acta biomaterialia. 2017 Apr 15;53:355-66. PubMed PMID: 28189812.
66. Kim MG, Jo SD, Yhee JY, Lee BS, Lee SJ, Park SG, et al. Synergistic anti-tumor effects of bevacizumab and tumor targeted polymerized VEGF siRNA nanoparticles. Biochemical and biophysical research communications. 2017 Jul 15;489(1):35-41. PubMed PMID: 28533089.
67. Ozturk K, Esendagli G, Gurbuz MU, Tulu M, Calis S. Effective targeting of gemcitabine to pancreatic cancer through PEG-cored Flt-1 antibody-conjugated dendrimers. International journal of pharmaceutics. 2017 Jan 30;517(1-2):157-67. PubMed PMID: 27965135.
68. Romano-Feinholz S, Salazar-Ramiro A, Munoz-Sandoval E, Magana-Maldonado R, Hernandez Pedro N, Rangel Lopez E, et al. Cytotoxicity induced by carbon nanotubes in experimental malignant glioma. International journal of nanomedicine. 2017;12:6005-26. PubMed PMID: 28860763. Pubmed Central PMCID: 5573058.
69. Cai X, Luo Y, Zhang W, Du D, Lin Y. pH-Sensitive ZnO Quantum Dots-Doxorubicin Nanoparticles for Lung Cancer Targeted Drug Delivery. ACS applied materials & interfaces. 2016 Aug 31;8(34):22442-50. PubMed PMID: 27463610.
70. Lee CS, Kim H, Yu J, Yu SH, Ban S, Oh S, et al. Doxorubicin-loaded oligonucleotide conjugated gold nanoparticles: A promising in vivo drug delivery system for colorectal cancer therapy. European journal of medicinal chemistry. 2017 Aug 31. PubMed PMID: 28870452.
71. Balakrishnan S, Bhat FA, Raja Singh P, Mukherjee S, Elumalai P, Das S, et al. Gold nanoparticle-conjugated quercetin inhibits epithelial-mesenchymal transition, angiogenesis and invasiveness via EGFR/VEGFR-2-mediated pathway in breast cancer. Cell proliferation. 2016 Dec;49(6):678-97. PubMed PMID: 27641938.
72. Cui L, Her S, Dunne M, Borst GR, De Souza R, Bristow RG, et al. Significant Radiation Enhancement Effects by Gold Nanoparticles in Combination with Cisplatin in

Triple Negative Breast Cancer Cells and Tumor Xenografts. Radiation research. 2017 Feb;187(2):147-60. PubMed PMID: 28085639.
73. Saber MM, Bahrainian S, Dinarvand R, Atyabi F. Targeted drug delivery of Sunitinib Malate to tumor blood vessels by cRGD-chiotosan-gold nanoparticles. International journal of pharmaceutics. 2017 Jan 30;517(1-2):269-78. PubMed PMID: 27956189.
74. Cai Z, Chattopadhyay N, Yang K, Kwon YL, Yook S, Pignol JP, et al. 111In-labeled trastuzumab-modified gold nanoparticles are cytotoxic in vitro to HER2-positive breast cancer cells and arrest tumor growth in vivo in athymic mice after intratumoral injection. Nuclear medicine and biology. 2016 Dec;43(12):818-26. PubMed PMID: 27788375.
75. Chiu HT, Su CK, Sun YC, Chiang CS, Huang YF. Albumin-Gold Nanorod Nanoplatform for Cell-Mediated Tumoritropic Delivery with Homogenous ChemoDrug Distribution and Enhanced Retention Ability. Theranostics. 2017;7(12):3034-52. PubMed PMID: 28839462. Pubmed Central PMCID: 5566104.
76. Yang X, Su LJ, La Rosa FG, Smith EE, Schlaepfer IR, Cho SK, et al. The Antineoplastic Activity of Photothermal Ablative Therapy with Targeted Gold Nanorods in an Orthotopic Urinary Bladder Cancer Model. Bladder cancer. 2017 Jul 27;3(3):201-10. PubMed PMID: 28824948. Pubmed Central PMCID: 5545915.
77. Dreaden EC, Austin LA, Mackey MA, El-Sayed MA. Size matters: gold nanoparticles in targeted cancer drug delivery. Therapeutic delivery. 2012 Apr;3(4):457-78. PubMed PMID: 22834077. Pubmed Central PMCID: 3596176.
78. Petrizzo A, Conte C, Tagliamonte M, Napolitano M, Bifulco K, Carriero V, et al. Functional characterization of biodegradable nanoparticles as antigen delivery system. Journal of experimental & clinical cancer research : CR. 2015 Oct 06;34:114. PubMed PMID: 26444005. Pubmed Central PMCID: 4596393.
79. Safwat MA, Soliman GM, Sayed D, Attia MA. Gold nanoparticles enhance 5-fluorouracil anticancer efficacy against colorectal cancer cells. International journal of pharmaceutics. 2016 Nov 20;513(1-2):648-58. PubMed PMID: 27693737.
80. Seo EJ, Jang IH, Do EK, Cheon HC, Heo SC, Kwon YW, et al. Efficient production of retroviruses using PLGA/bPEI-DNA nanoparticles and application for reprogramming somatic cells. PloS one. 2013;8(9):e76875. PubMed PMID: 24098810. Pubmed Central PMCID: 3786964.
81. Yu K, Zhao J, Zhang Z, Gao Y, Zhou Y, Teng L, et al. Enhanced delivery of Paclitaxel using electrostatically-conjugated Herceptin-bearing PEI/PLGA nanoparticles against HER-positive breast cancer cells. International journal of pharmaceutics. 2016 Jan 30;497(1-2):78-87. PubMed PMID: 26617314.
82. Javier DJ, Nitin N, Levy M, Ellington A, Richards-Kortum R. Aptamer-targeted gold nanoparticles as molecular-specific contrast agents for reflectance imaging. Bioconjugate chemistry. 2008 Jun;19(6):1309-12. PubMed PMID: 18512972. Pubmed Central PMCID: 2651625.
83. Zhao J, Lee P, Wallace MJ, Melancon MP. Gold Nanoparticles in Cancer Therapy: Efficacy, Biodistribution, and Toxicity. Current pharmaceutical design. 2015;21(29):4240-51. PubMed PMID: 26323426.
84. Toda T, Yoshino S. Enhancement of ovalbumin-specific Th1, Th2, and Th17 immune responses by amorphous silica nanoparticles. International journal of immunopathology and pharmacology. 2016 Sep;29(3):408-20. PubMed PMID: 27343242.
85. Jain KK. Applications of nanobiotechnology in clinical diagnostics. Clinical chemistry. 2007 Nov;53(11):2002-9. PubMed PMID: 17890442.

86. Basso CR TC, Junior JPA, Pedrosa VA. A fast and highly sensitive method for the detection of canine distemper virus by the naked eye. Analytical Methods. 2015;7(6):2264–7.
87. Parida S, Maiti C, Rajesh Y, Dey KK, Pal I, Parekh A, et al. Gold nanorod embedded reduction responsive block copolymer micelle-triggered drug delivery combined with photothermal ablation for targeted cancer therapy. Biochimica et biophysica acta. 2017 Jan;1861(1 Pt A):3039-52. PubMed PMID: 27721046.
88. Alex S, Tiwari A. Functionalized Gold Nanoparticles: Synthesis, Properties and Applications--A Review. Journal of nanoscience and nanotechnology. 2015 Mar;15(3):1869-94. PubMed PMID: 26413604.
89. JOHN TURKEVICH PCS, JAMES HILLIE. A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold. Discuss Faraday Soc. 1951;11:55-75.
90. Ding H, Yang D, Zhao C, Song Z, Liu P, Wang Y, et al. Protein-gold hybrid nanocubes for cell imaging and drug delivery. ACS applied materials & interfaces. 2015 Mar 04;7(8):4713-9. PubMed PMID: 25669930.
91. Nouh ESA, Baquero EA, Lacroix LM, Delpech F, Poteau R, Viau G. Surface-Engineering of Ultrathin Gold Nanowires: Tailored Self-Assembly and Enhanced Stability. Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids. 2017 Jun 06;33(22):5456-63. PubMed PMID: 28489394.
92. Guan G, Liu S, Cai Y, Low M, Bharathi MS, Zhang S, et al. Destabilization of gold clusters for controlled nanosynthesis: from clusters to polyhedra. Advanced materials. 2014 Jun 04;26(21):3427-32. PubMed PMID: 24619478.
93. Lin TH, Lin CW, Liu HH, Sheu JT, Hung WH. Potential-controlled electrodeposition of gold dendrites in the presence of cysteine. Chemical communications. 2011 Feb 21;47(7):2044-6. PubMed PMID: 21210050.
94. Gatoo MA, Naseem S, Arfat MY, Dar AM, Qasim K, Zubair S. Physicochemical properties of nanomaterials: implication in associated toxic manifestations. BioMed research international. 2014;2014:498420. PubMed PMID: 25165707. Pubmed Central PMCID: 4140132.
95. Wang J, Fan Y. Lung injury induced by TiO2 nanoparticles depends on their structural features: size, shape, crystal phases, and surface coating. International journal of molecular sciences. 2014 Dec 03;15(12):22258-78. PubMed PMID: 25479073. Pubmed Central PMCID: 4284706.
96. Gunduz N, Ceylan H, Guler MO, Tekinay AB. Intracellular Accumulation of Gold Nanoparticles Leads to Inhibition of Macropinocytosis to Reduce the Endoplasmic Reticulum Stress. Scientific reports. 2017 Feb 01;7:40493. PubMed PMID: 28145529. Pubmed Central PMCID: 5286442.
97. Bareford LM, Swaan PW. Endocytic mechanisms for targeted drug delivery. Advanced drug delivery reviews. 2007 Aug 10;59(8):748-58. PubMed PMID: 17659804. Pubmed Central PMCID: 2000329.
98. Torchilin VP, Rammohan R, Weissig V, Levchenko TS. TAT peptide on the surface of liposomes affords their efficient intracellular delivery even at low temperature and in the presence of metabolic inhibitors. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2001 Jul 17;98(15):8786-91. PubMed PMID: 11438707. Pubmed Central PMCID: 37513.
99. Maeda H. Tumor-selective delivery of macromolecular drugs via the EPR effect: background and future prospects. Bioconjugate chemistry. 2010 May 19;21(5):797-802. PubMed PMID: 20397686.

100. Kommareddy S, Tiwari SB, Amiji MM. Long-circulating polymeric nanovectors for tumor-selective gene delivery. Technology in cancer research & treatment. 2005 Dec;4(6):615-25. PubMed PMID: 16292881.
101. Singh M, Harris-Birtill DC, Markar SR, Hanna GB, Elson DS. Application of gold nanoparticles for gastrointestinal cancer theranostics: A systematic review. Nanomedicine : nanotechnology, biology, and medicine. 2015 Nov;11(8):2083-98. PubMed PMID: 26115635.
102. Ferrari M. Cancer nanotechnology: opportunities and challenges. Nature reviews Cancer. 2005 Mar;5(3):161-71. PubMed PMID: 15738981.
103. Curley SA, Cherukuri P, Briggs K, Patra CR, Upton M, Dolson E, et al. Noninvasive radiofrequency field-induced hyperthermic cytotoxicity in human cancer cells using cetuximab-targeted gold nanoparticles. Journal of experimental therapeutics & oncology. 2008;7(4):313-26. PubMed PMID: 19227011.
104. Eghtedari M, Liopo AV, Copland JA, Oraevsky AA, Motamedi M. Engineering of hetero-functional gold nanorods for the in vivo molecular targeting of breast cancer cells. Nano letters. 2009 Jan;9(1):287-91. PubMed PMID: 19072129. Pubmed Central PMCID: 4153361.
105. Basso CR, Tozato CC, Junior JPA, Pedrosa VA. A fast and highly sensitive method for the detection of canine distemper virus by the naked eye. Anal Methods. 2015;7(6):2264-7.
106. Bhadra D, Bhadra S, Jain S, Jain NK. A PEGylated dendritic nanoparticulate carrier of fluorouracil. International journal of pharmaceutics. 2003 May 12;257(1-2):111-24. PubMed PMID: 12711167.
107. Deka J, Mech R, Ianeselli L, Amenitsch H, Cacho-Nerin F, Parisse P, et al. Surface passivation improves the synthesis of highly stable and specific DNA-functionalized gold nanoparticles with variable DNA density. ACS applied materials & interfaces. 2015 Apr 1;7(12):7033-40. PubMed PMID: 25756758.
108. Haiss W, Thanh NT, Aveyard J, Fernig DG. Determination of size and concentration of gold nanoparticles from UV-vis spectra. Analytical chemistry. 2007 Jun 01;79(11):4215-21. PubMed PMID: 17458937.
109. Clarke R, Lund E, Johnson II, Pinder A. Apoptosis can be detected in attached colonic adenocarcinoma HT29 cells using annexin V binding, but not by TUNEL assay or sub-G0 DNA content. Cytometry. 2000 Jul 1;40(3):252. PubMed PMID: 10878570.
110. Toba K, Kishi K, Koike T, Winton EF, Takahashi H, Nagai K, et al. Profile of cell cycle in hematopoietic malignancy by DNA/RNA quantitation using 7AAD/PY. Experimental hematology. 1996 Jul;24(8):894-901. PubMed PMID: 8690048.
111. Yu Y, Kong L, Li L, Li N, Yan P. Antitumor Activity of Doxorubicin-Loaded Carbon Nanotubes Incorporated Poly(Lactic-Co-Glycolic Acid) Electrospun Composite Nanofibers. Nanoscale research letters. 2015 Dec;10(1):1044. PubMed PMID: 26306537. Pubmed Central PMCID: 4549354.
112. Tyner AMKKM. Analytical characterization of gold nanoparticle primary particles, aggregates, agglomerates, and agglomerated aggregates. Journal of Nanoparticle Research 2011;13(1):3465–81.
113. Li C, Li D, Wan G, Xu J, Hou W. Facile synthesis of concentrated gold nanoparticles with low size-distribution in water: temperature and pH controls. Nanoscale research letters. 2011 Jul 6;6(1):440. PubMed PMID: 21733153. Pubmed Central PMCID: 3211859.
114. Prabaharan M, Grailer JJ, Pilla S, Steeber DA, Gong S. Gold nanoparticles with a monolayer of doxorubicin-conjugated amphiphilic block copolymer for tumor-targeted drug delivery. Biomaterials. 2009 Oct;30(30):6065-75. PubMed PMID: 19674777.

115. Rastogi V, Yadav P, Bhattacharya SS, Mishra AK, Verma N, Verma A, et al. Carbon nanotubes: an emerging drug carrier for targeting cancer cells. Journal of drug delivery. 2014;2014:670815. PubMed PMID: 24872894. Pubmed Central PMCID: 4020363.
116. Schulz F, Dahl GT, Besztejan S, Schroer MA, Lehmkuhler F, Grubel G, et al. Ligand Layer Engineering To Control Stability and Interfacial Properties of Nanoparticles. Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids. 2016 Aug 09;32(31):7897-907. PubMed PMID: 27458652.
117. Spain E, Gilgunn S, Sharma S, Adamson K, Carthy E, O'Kennedy R, et al. Detection of prostate specific antigen based on electrocatalytic platinum nanoparticles conjugated to a recombinant scFv antibody. Biosensors & bioelectronics. 2016 Mar 15;77:759-66. PubMed PMID: 26513282.
118. Hodali RAA-THA. Use of Zeolite ZSM-5 for Loading and Release of 5-Fluorouracil. Journal of Chemistry. 2015;2015(1):1-9.
119. Comenge J, Sotelo C, Romero F, Gallego O, Barnadas A, Parada TG, et al. Detoxifying antitumoral drugs via nanoconjugation: the case of gold nanoparticles and cisplatin. PloS one. 2012;7(10):e47562. PubMed PMID: 23082177. Pubmed Central PMCID: 3474726.
120. Yanchuk; VCORALSII, Ariga YNJPHK. Gold Nanoparticles Aggregation: Drastic Effect of Cooperative

Functionalities in a Single Molecular Conjugate. The Journal of Physical Chemistry C. 2012;116(1):8.
121. Sedighimoghaddam MHJHAAAPHP-TB. Various methods of gold nanoparticles (GNPs) conjugation to antibodies. Sensing and Bio-Sensing Research 2016;9(1):17-22.

122. Wang G, Sun W. Optical limiting of gold nanoparticle aggregates induced by electrolytes. The journal of physical chemistry B. 2006 Oct 26;110(42):20901-5. PubMed PMID: 17048905.
123. Pernodet N, Fang X, Sun Y, Bakhtina A, Ramakrishnan A, Sokolov J, et al. Adverse effects of citrate/gold nanoparticles on human dermal fibroblasts. Small. 2006 Jun;2(6):766-73. PubMed PMID: 17193121.
124. El-Sayed MBMNTA-GOME-BMA. 5-Fluorouracil Induces Plasmonic Coupling in Gold Nanospheres: New Generation of Chemotherapeutic Agents. Nanomedicine & Nanotechnology. 2012;3(7):7.

125. SiShi Li; Elizabeth Buchbinder; LWJDBDJFSZ. EGFR and HER2 levels are frequently elevated in colon cancer cells. DISCOVERIES REPORTS. 2014;1(1):8.
126. Hainfeld JF, O'Connor MJ, Dilmanian FA, Slatkin DN, Adams DJ, Smilowitz HM. Micro-CT enables microlocalisation and quantification of Her2-targeted gold nanoparticles within tumour regions. The British journal of radiology. 2011 Jun;84(1002):526-33. PubMed PMID: 21081567. Pubmed Central PMCID: 3473629.
127. LaBonte MJ, Wilson PM, Fazzone W, Russell J, Louie SG, El-Khoueiry A, et al. The dual EGFR/HER2 inhibitor lapatinib synergistically enhances the antitumor activity of the histone deacetylase inhibitor panobinostat in colorectal cancer models. Cancer research. 2011 May 15;71(10):3635-48. PubMed PMID: 21464044. Pubmed Central PMCID: 3118510.
128. S/A M. Erbitux - cetuximabe. Merck S/A; 2016. p. 20.
129. Farmacêutica R. Herceptin - transtuzumabe. Brasil: Produtos Roche químicos e farmacêuticos 2018. p. 18.