



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE MEDICINA**

**Sophia Miquelle Ceron Gimenez Ribeiro Sartori**

**Transporte de paclitaxel por nanopartículas de ferrita e  
quitosana através da avidéz por cálcio de células de  
câncer prostático**

Dissertação apresentada à Faculdade de  
Medicina, Universidade Estadual Paulista  
“Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de  
Botucatu, para obtenção do título de  
Mestre em Patologia.

Orientador(a): Prof. Dr. Ramon Kaneno  
Coorientador(a): Prof (a). Dr (a). Margarida Juri Saeki

**Botucatu  
2019**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE MEDICINA**

**Sophia Miquelle Ceron Gimenez Ribeiro Sartori**

**Transporte de paclitaxel por nanopartículas de ferrita e  
quitosana através da avidéz por cálcio de células de  
câncer prostático**

Dissertação apresentada à Faculdade de  
Medicina, Universidade Estadual Paulista  
“Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de  
Botucatu, para obtenção do título de  
Mestre em Patologia.

Orientador(a): Prof. Dr. Ramon Kaneno  
Coorientador(a): Prof (a). Dr (a). Margarida Juri Saeki

**Botucatu  
2019**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Sartori, Sophia Miquelle Ceron Gimenez Ribeiro.

Transporte de paclitaxel por nanopartículas de ferrita e quitosana através da avidéz por cálcio de células de câncer prostático / Sophia Miquelle Ceron Gimenez Ribeiro Sartori. - Botucatu, 2019

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: Ramon Kaneno

Coorientador: Margarida Juri Saeki

Capes: 21100004

1. Próstata - Câncer. 2. Nanopartículas. 3. Paclitaxel. 4. Quitosana. 5. Ferrita (Materiais magnéticos).

Palavras-chave: Biotecnologia; Câncer de próstata; Imunologia; Nanopartículas magnéticas; Paclitaxel.

*Este trabalho foi desenvolvido nos laboratórios do Departamento de Microbiologia e Imunologia e no Departamento de Química e Bioquímica do Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista campus de Botucatu.*

*Dedico este trabalho à minha família e a todos que acreditam na Ciência.*

*Primeiramente, agradeço a Deus por me sustentar nos momentos mais difíceis. Agradeço as infinitas possibilidades que me trouxeram até aqui.*

*A meu orientador Dr. Ramon Kaneno, por todos os ensinamentos teóricos, práticos e por todas as discussões científicas, culinárias e de planejamento de móveis (Ramon móveis planejados rsrs), nesses quase 6 anos de convivência. Ainda me lembro do primeiro e-mail que trocamos e naquele momento eu mal sabia que iria me apaixonar pela Imunologia de tumores. Muito obrigada Professor!*

*A minha coorientadora Dra. Margarida Juri Saeki, por todo aprendizado físico-químico, por acreditar no trabalho de uma bióloga e por tantas horas de discussão de artigos e suporte para experimentos em outras instituições. Você foi fundamental para que concluíssemos esse trabalho...e que trabalho! Muito obrigada!*

*A meus pais Sergio Sartori e Sonia (in memorian), por todo o amor e apoio, que mesmo em sua simplicidade de não conseguirem ter feito ensino superior, nunca deixaram de me incentivar a estudar, de ir mais além. Obrigada por tudo, obrigada pela oportunidade de viver!*

*A minha irmã, por ter contribuído para que me tornasse adulta aos 15 anos e por ter me proporcionado corrigir suas tarefas, vivenciando um miniambiente acadêmico, durante tantos anos. Por isso sou grata por tudo que passamos juntas! Obrigada Tha!*

*A meu amor, namorado e acima de tudo amigo Fábio Baggio, o responsável e a base para que eu desenvolvesse esse trabalho. Você me ofereceu muito mais que um ombro amigo quando eu mais precisei, você me deu uma família, um lar. Eu não teria conseguido sem você! Muito obrigada, "italiano" rs*

*A meus sogros, Dirce e Orlando Baggio, minha família também, a compreensão e generosidade de vocês permitiu que eu conquistasse mais essa etapa em minha vida. Muito obrigada por tudo!*

*A meus amigos do laboratório de Imunologia de Tumores: Graziela Romagnoli (Grá), pela sua paciência e por cada ensinamento tanto*

*peçoal quanto profissional e por cada discussão científica. Jamais esquecerei de suas palavras enquanto eu fazia citometria: "Saber o por quê está fazendo algo, te trará independência científica". A Carolina Gorgulho (Carú) pela ajuda e ensinamento científico, pelas conversas no café e até para sair no jornal da cidade rs! Ao Jofer Ramirez (Peruano), por colaboração em experimentos e melhora na didática em ensinar palavras não convencionais a estrangeiros rs. A Raquel Liszbinski (Guria) e a Angélica Amaral (Gé, Moskita), minhas "mimis", por serem afago para os dias difíceis de pesquisa, e por tantas outras histórias lindas vividas nessa Botucatu. A Flavia, Carla e a Bruna (Bruh), pela nossa rotina de laboratório, por me permitir ajudá-las e também ser ajuda em tantos momentos. Obrigado a todos por serem minha família científica!*

*Aos professores, aos colegas e funcionários do Departamento de Microbiologia e Imunologia e também da Química e Bioquímica.*

*A coordenadora do programa de pós-graduação em Patologia/FMB, Dra. Márcia Guimarães por ter me acolhido durante o processo de transferência.*

*A secretária do programa de pós-graduação em Patologia/FMB, Vania Soler por toda paciência e ajuda com os trâmites acadêmicos.*

*"A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê". (Arthur Schopenhauer)*

## ÍNDICE

<i>CAPÍTULO I Revisão</i> .....	12
<b>Funcionalidade diagnóstica e terapêutica de nanopartículas magnéticas contra o câncer</b> .....	13
I. As nanopartículas multifuncionais como veículos para o tratamento do câncer .....	13
II. Potencial de uso de nanopartículas de óxido de ferro na terapia multifuncional.....	19
III. Conclusão .....	26
IV. Referências .....	27
<i>CAPÍTULO II Dissertação</i> .....	34
Lista de abreviaturas .....	35
Resumo .....	36
Abstract .....	37
I. INTRODUÇÃO .....	38
II. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL .....	49
III. MATERIAIS E MÉTODOS .....	52
1. Síntese das nanopartículas de ferrita $Mn_{0,75}Zn_{0,25}Fe_{1,7}O_4$ por co-precipitação .....	52
2. Revestimento polimérico das nanopartículas de ferrita com quitosana .....	52
3. Mimetização das nanopartículas revestidas com hidroxiapatita .....	53

4. Síntese e encapsulamento de paclitaxel nas nanopartículas .....	54
5. Quantificação da porcentagem de massa atômica das ferritas por espectroscopia de energia dispersiva de raios-X (EDX) .....	55
6. Caracterização magnética das ferritas por difratometria de raios-X (DRX) .....	55
7. Caracterização resposta magnética das ferritas por biosusceptometria de corrente alternada (BAC) .....	56
8. Quantificação de paclitaxel por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa (LC/MS) .....	57
9. Quantificação de paclitaxel por espectrofotometria UV-Visível .....	58
10. Caracterização dos grupamentos funcionais das nanopartículas por espectroscopia de infravermelhos (FTIR) com transformada de Fourier .....	59
11. Caracterização da carga superficial e ponto isoelétrico das nanopartículas por Zetasizer .....	59
12. Caracterização morfológica e mapeamento dos elementos químicos das nanopartículas .....	60
13. Cultura <i>in vitro</i> da linhagem tumoral de câncer de próstata LNCaP .....	61
14. Determinação da morte celular por citometria de fluxo .....	61
15. Caracterização morfológica da interação das nanopartículas com as células tumorais .....	63
16. Ciclo celular da linhagem tumoral de câncer de próstata LNCaP .....	64
17. Viabilidade celular de pró-osteoblastos MC3T3.....	65
18. Análise Estatística .....	65

IV. RESULTADOS .....	66
1. Porcentagem de massa atômica das ferritas próxima ao nominal .....	66
2. Padrão de difração de ferritas magnéticas monofásicas .....	68
3. Resposta magnética para diferentes proporções de Fe .....	70
4. Eficiência de encapsulamento de paclitaxel .....	71
5. Grupamentos funcionais como verificação das etapas de síntese .....	75
6. Carga elétrica superficial das nanopartículas e seu comportamento em alterações de pH .....	76
7. Morfologia das nanopartículas .....	78
8. Mapeamento e contraste dos elementos químicos .....	81
9. Morte celular mediada pelo endereçamento de paclitaxel em nanopartículas magnéticas .....	83
10. Interação entre o câncer de próstata e nanopartículas magnéticas .....	89
11. O efeito das nanopartículas de ferrita Mn e Zn carregadas com PTX sobre o ciclo celular de LNCaP.....	96
12. Efeito sobre a viabilidade de pró-osteoblastos murinos MC3T3.....	99
V. DISCUSSÃO .....	100
VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	111

**CAPÍTULO I**  
*Revisão*

## **Funcionalidade diagnóstica e terapêutica de nanopartículas magnéticas contra o câncer**

**Resumo:** O desenvolvimento de nanopartículas para aplicações clínicas, tanto no diagnóstico quanto no tratamento do câncer envolve estudos visando melhorar a biocompatibilidade, estabilidade química, capacidade de carregamento de drogas, entrega dirigida, sinais de imagem e resposta térmica ou fotodinâmica das nanopartículas. Nesta revisão, abordamos as propriedades físico-químicas, aplicações e terapêutica com nanopartículas, especialmente as magnéticas de óxido de ferro, como um sistema promissor para diagnóstico e tratamento do câncer.

### **I. As nanopartículas multifuncionais como veículos para o diagnóstico e o tratamento do câncer**

Nos últimos anos, as nanopartículas foram desenvolvidas para finalidades relacionadas à administração de medicamentos, tratamentos de câncer e diagnóstico, com estratégias para melhorar a eficácia dos tratamentos em nanoescala através da adição de elementos funcionais, melhorias na segmentação ativa, e agentes de contraste foram incorporados às nanopartículas para criar formulações verdadeiramente multifuncionais (1). Essas partículas foram denominadas teranósticas e representam um ponto culminante de múltiplas estratégias combinadas em uma nanopartícula. A definição tradicional de

theranóstico é que eles combinam o terapêutico (tera) e diagnóstico (nóstico) na mesma formulação (2). A fim de alcançar essa multifuncionalidade, tipicamente quatro aspectos são incluídos: nanopartículas, técnicas de diagnóstico por imagem, direcionamento através de ligante e, abordagem terapêutica.

Assim, propõe-se o uso de nanopartículas multifuncionais para superar as limitações dos tratamentos já existentes contra o câncer. Entre essas limitações, destacamos a ação das cargas superficiais indesejadas nas nanopartículas, a deposição insuficiente de drogas ou até mesmo sua degradação, a dificuldade para encapsular drogas hidrofóbicas (3-10) e ainda, a entrega não específica que colabora para a toxicidade às células saudáveis (11, 12).

Existem duas formas de inserção dessas nanopartículas multifuncionais no microambiente tumoral. A primeira, chamada de segmentação passiva, que consiste na interação com as nanopartículas através das características do próprio microambiente tumoral. A vasculatura tumoral possui arquitetura pobre com uma membrana basal anormal e fissuras entre as células endoteliais, dificultando a entrega de fármacos convencionais que acabam por retornar ao sistema vascular, sendo excretados pelos rins (13). As fissuras entre as células tumorais possuem tamanhos que variam de 200–1000 nm, favorecendo a entrada e acúmulo de nanopartículas (14, 15). Desse modo, a retenção dos fármacos encapsulados em nanopartículas nos tumores é cerca de dez vezes maior que o dos quimioterápicos livres. Esse cenário só é possível devido ao efeito de permeabilidade e retenção (EPR) aprimorado dos tumores (16) e também pelo próprio microambiente tumoral (17-19).

Embora o EPR seja um excelente meio de difusão dos tratamentos para as células cancerígenas, alguns tumores têm distribuições de vasos sanguíneos heterogêneos e componentes estromais que funcionam como barreiras para o fornecimento de drogas (15, 20). Como alternativa a essas barreiras, os tratamentos baseados na utilização de nanopartículas multifuncionais tem como segunda opção de inserção no microambiente tumoral, a segmentação ativa. Ela consiste na capacidade de direcionar ativamente as nanopartículas através da combinação com vários agentes como moléculas sintéticas, ácidos nucleicos, proteínas e peptídeos, incluindo a utilização de polímeros biodegradáveis e biocompatíveis e núcleos magnéticos para promover a entrega direcionada, buscando reduzir a toxicidade às células saudáveis (21-23).

Alguns dos tratamentos baseados em nanopartículas aprovadas pela *Food and Drug Administration* (FDA) (24-32) (Tabela 1), revelam não só elementos na tentativa de entrega direcionada, mas também estruturas capazes de se acumular em tumores sólidos por conta do efeito EPR (33, 34), como o Mylotarg<sup>®</sup>, acoplado a anticorpo monoclonal usado para leucemia mielóide aguda mas atualmente não utilizado (27) ou ainda, formulações mais simples como a doxorubicina lipossomal Doxil, um dos primeiros medicamentos aprovados pelo FDA (24). O Abraxane<sup>®</sup>, aprovado em 2005, é o resultado da associação do quimioterápico paclitaxel com nanopartículas de albumina para tratamento do câncer de mama (29), aprovado também em 2013, para câncer de pâncreas (32).

**Table 1: Nanopartículas aprovadas pela FDA (USA) para tratamento de pacientes com câncer**

Nome comercial	Tipo de nanopartícula	Aplicação	Ano de aprovação	Ref.
Doxil®	Formulação de doxorubicina lipossomal	câncer de ovário refratário, sarcoma de Kaposi, câncer de mama refratário	1995	(24)
Feridex®	nanopartículas de ferro superparamagnéticas associadas ao dextrano	Sarcoma de Kaposi HIV-associado	1996	(26)
DaunoXome®	Daunorrubicina lipossomal	Sarcoma de Kaposi, câncer de ovário metastático	1996	(25)
Mylotarg®	Moléculas de ozogamicina gemtuzumab ligadas ao anticorpo monoclonal	Leucemia mielóide aguda	2000	(27)
Zevalin®	anticorpo monoclonal de camundongo IgG1 com	linfoma não-Hodgkin's	2002	(28)

	quelante tiuxetano associado ao isótopo radioativo Ítrio-90			
Abraxane <sup>®</sup>	paclitaxel ligado à albumina	Câncer de mama metastático	2005	(29)
Oncospar <sup>®</sup>	versão modificada da enzima L-asparaginase	leucemia	2006	(30)
Ontak <sup>®</sup>	proteína de fusão denileucina difitox	Linfoma cutâneo de células T	2008	(31)
Abraxane <sup>®</sup>	paclitaxel ligado à albumina	Câncer de pâncreas metastático	2013	(32)

O acúmulo das nanopartículas favorecido pelo próprio estabelecimento do microambiente tumoral e também pelo efeito EPR, aliado as propriedades multifuncionais das nanopartículas, permite ao mesmo tempo a terapêutica e o diagnóstico direcionados as células tumorais (35). Esse cenário, têm sido amplamente explorado nas últimas décadas para diferentes tipos de nanopartículas, incluindo as lipossomais, poliméricas, micelares e principalmente as magnéticas de óxido de ferro (33, 36-44).

### *Nanopartículas lipossomais*

Os lipossomas são de natureza anfifílica, compostos de componentes hidrofóbicos e hidrofílicos, geralmente dispostos em bicamada (45). São úteis como sistemas de distribuição de drogas com propriedades de superfície que podem ser facilmente modificadas (46), permitem o acoplamento de diversos ligantes (47), o tamanho das nanopartículas pode ser controlado (48) e também podem encapsular elementos solúveis em água ou insolúveis no núcleo (49). Apesar dessas vantagens, os lipossomas possuem estabilidade fraca, baixa eficiência de carregamento e perfis de liberação deficientes (50).

### *Nanopartículas poliméricas*

Compreendem as nanoesferas ou nanocápsulas e são compostas a partir de monômeros (51). Os polímeros mais usados para fazer nanopartículas poliméricas são poli (ácido láctico) /poli (ácido láctico-co-glicólico) PLA/PGLA, copolímeros em bloco e o biopolímero quitosana. A quitosana tem sido amplamente utilizada como sistemas de nanopartículas multifuncionais, especialmente para entrega de ácidos nucleicos (52) devido às suas fortes propriedades policatiônicas. O PLA/PLGA é capaz de encapsular drogas hidrofóbicas e hidrofílicas sem degradação (53). A capacidade de adaptação dessas nanopartículas pode ser alcançada por alterações nas proporções de ácido láctico e glicólico na síntese o que confere biocompatibilidade, baixa depuração e a possibilidade de construir estruturas personalizadas. Atualmente, sua maior utilização está mais relacionada ao suporte para outros tipos de nanopartículas multifuncionais (54).

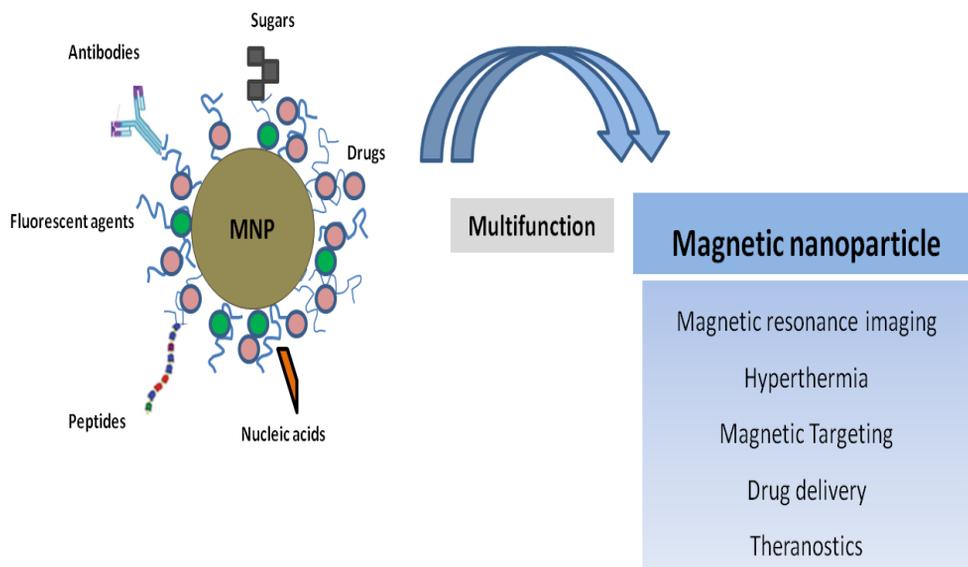
### *Micelas poliméricas*

As nanopartículas micelares são colóides compostos por moléculas anfifílicas com segmentos hidrofóbicos e hidrofílicos (55). Abaixo da concentração micelar crítica (CMC), o polímero permanece como monômero em solução e, acima dessa concentração, formam-se micelas. Seu tamanho varia de 5 à 100 nm de diâmetro, sendo vantajosa como veículos de entrega de drogas, pois quimioterápicos hidrofóbicos e hidrofílicos, podem ser encapsulados durante a automontagem micelar. Dessa forma, o núcleo hidrofóbico pode solubilizar drogas e a região externa hidrofílica proteger as partículas da depuração sistêmica. A adição de ligantes de direcionamento ou agentes de contraste também é possível, já que as micelas interagem e podem ser absorvidas pelas células através do efeito de permeabilidade e retenção (16) aprimorado (56) ou ainda, por endocitose mediada por receptor (57).

## **II. Potencial de uso de nanopartículas magnéticas de óxido de ferro na terapia multifuncional**

Entre as nanopartículas que atualmente são estudadas em ensaios clínicos, as nanopartículas magnéticas (MNPs) representam um nicho importante de nanomateriais promissores para novas abordagens clínicas contra o câncer (58). As propriedades físico-químicas singulares dessas nanopartículas conferem capacidades multifuncionais como agentes de contraste para geração de imagens de ressonância magnética (diagnóstico), administração de fármacos,

direcionamento de ligantes como moléculas sintéticas, anticorpos, peptídeos, entre outros, com possibilidade da combinação entre terapia e diagnóstico (Teranóstico) (**Figura 1**) (59).



**Figura 1:** Ilustração representativa de nanopartícula magnética multifuncional e suas aplicações. Adaptado de Boubbou, 2018.

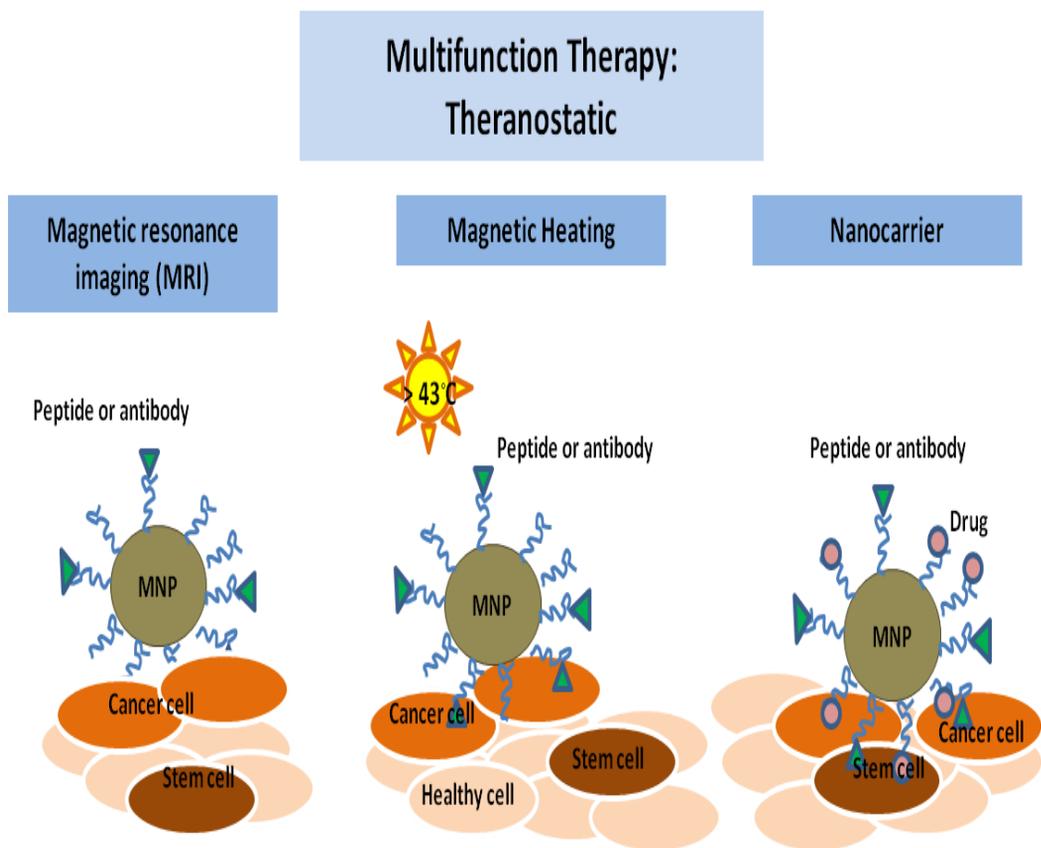
As MNPs podem ser classificadas como metais, ligas ou óxidos, e apresentam elementos magnéticos como ferro, níquel, cobalto e outras combinações. Entre elas, as nanopartículas baseadas em ferro são as mais estudadas e já possuem aprovação pela FDA para uso clínico contra o câncer, devido a sua biocompatibilidade, com uma gama de aplicações devido às suas propriedades magnéticas (**Tabela 2**) (60).

**Tabela 2: Nanopartículas de óxido de ferro aprovadas pela FDA para diagnóstico imaginológico e terapia do câncer**

<b>Nome e formulação</b>	<b>Aplicação</b>	<b>Ref.</b>
<b>Gastromark<sup>®</sup></b> Suspensão aquosa de nanopartículas de óxido de ferro superparamagnéticas revestidas com silicone	Ressonância magnética	(61, 62)
<b>Feridex<sup>®</sup></b> Nanopartículas de ferro superparamagnéticas associadas ao dextrano	Ressonância magnética	(63-65)
<b>Combidx<sup>®</sup></b> Óxido de ferro superparamagnético ultrasmall coberto com dextrano de baixo peso molecular	Ressonância magnética	(66, 67)
<b>Resovist<sup>®</sup></b> Nanopartículas de óxido de ferro superparamagnéticas revestidas com carboxil dextrano	Ressonância magnética	(68-70)
<b>Feraheme<sup>®</sup></b> Óxido de ferro superparamagnético não estequiométrico revestido com éter carboximetílico de poliglicose sorbitol	Terapia de reposição de ferro; Ressonância magnética	(71)
<b>NanoTherm<sup>TM</sup></b> Dispersão aquosa de nanopartículas de óxido de ferro superparamagnéticas	hipertermia	(72)

As nanopartículas magnéticas de óxido de ferro mais utilizados em aplicações biomédicas são a magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) (73) e a maguemita ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ) (74), por serem materiais facilmente obtidos e compostos unicamente por ferro. Entretanto, pode-se otimizar as propriedades magnéticas, substituindo-se parte dos íons  $\text{Fe}^{2+}$  por outros metais, tais como Mn e Zn, dando origem às nanopartículas magnéticas de ferritas de Mn e Zn (75-77).

Embora as nanopartículas magnéticas não sejam as únicas que combinam a administração de medicamentos e exames de imagem, elas são as mais avançadas nos processos de pesquisa e desenvolvimento como agentes terapêuticos, bem como contraste de ressonância magnética para humanos (78, 79). Essa capacidade permite que elas atuem como nanopartículas multifuncionais em diferentes frentes de tratamento, seja para obtenção de imagens, hipertermia magnética ou ainda como carreadores de fármacos direcionados às células tumorais (**Figura 2**).



**Figura 2:** Ilustração sobre a utilização da Terapia Multifuncional através das nanopartículas magnéticas de óxido de ferro no diagnóstico e tratamento do câncer. Adaptado de Gobbo et.al, 2015.

Para que essas nanopartículas atuem como agentes de contraste, é necessário que uma quantidade suficiente desse agente se acumule na região de interesse, através de segmentação ativa pela utilização de ligantes específicos às células tumorais como peptídeos ou anticorpos. Modalidades de imagem comumente utilizadas incluem ressonância magnética (MRI), tomografia computadorizada

(TC), imagem óptica (fluorescência e bioluminescência) e imagens de radionuclídeos (PET e SPECT) (80). Sob ação de determinado campo magnético de alta frequência, aquecem-se e podem induzir a morte de células cancerígenas por hipertermia (39, 81), (82-85). O tratamento via hipertermia é oferecido atualmente em alguns centros principalmente na Europa, onde os tumores normalmente são aquecidos na faixa de 41–46°C (hipertermia moderada) ou > 46°C (termoablação) por tempo específico, por microondas, ondas de rádio, ultrassom ou ondas infravermelhas (86). As células tumorais geralmente possuem maior sensibilidade ao calor do que as células normais em temperatura na faixa de 43°C (87, 88).

Estudos clínicos para aplicação de MNPs de óxido de ferro na hipertermia magnética em tumores humanos de próstata mostrou-se como uma técnica de aquecimento viável e bem tolerado em pacientes com câncer de próstata recorrente. Recentemente, essas partículas foram usadas na terapia de hipertermia magnética para tratar tumores ósseos metastáticos, sendo capazes de reduzir a lesão e ainda, promover a restauração óssea (89).

De um modo geral, as nanopartículas magnéticas de óxido de ferro estão sujeitas a opsonização e depuração rápida pelo sistema reticuloendotelial (RES), sendo necessário seu revestimento com polímeros, como poli (etilenoglicol) (PEG) (94), a quitosana (95), a dextrana (96) e outros (97). Neste sentido, o polímero quitosana é referência em aplicações biológicas devido a não-toxicidade, biocompatibilidade, biodegradabilidade, além de propriedades antifúngicas e bactericidas (98). Este polímero é de fácil funcionalização, sendo

aplicado comumente em estudos de tecidos ósseos, formando ligações semelhantes as da interação antígeno/anticorpo com diversas drogas, incluindo o fármaco hidrofóbico paclitaxel utilizado na quimioterapia atual (99, 100), (101, 102).

As células tumorais, principalmente aquelas com predominância de metástases ósseas, são mais sensíveis a alterações nos níveis de cálcio, necessitando de maior demanda deste elemento em processos como a proliferação celular (103, 104). Alguns tipos de câncer, como o de próstata tem predominância de metástase frequentes para o tecido ósseo. Desse modo, o estabelecimento de células metastáticas no osso pode estar relacionados à afinidade por cristais de hidroxiapatita (90-93). O estudo realizado por Martins et.al com nanopartículas magnéticas de ferritas de Mn e Zn revelou excelentes resultados quanto a inserção de polímeros biocompatíveis e revestimentos como a hidroxiapatita, não apresentando toxicidade às células do sistema imunológico, como os monócitos, e ao mesmo tempo mostrou efeito citotóxico sobre células humanas de câncer de mama (16) (105-108). Além disso, as ferritas de Mn e Zn mostraram grande capacidade de resposta magnética, favorecendo tratamentos de hipertermia.

Desse modo, não só as nanopartículas magnéticas convencionais, mas também as nanopartículas de ferrita de Mn e Zn, polimerizadas e recobertas com atrativos as células tumorais, como a hidroxiapatita, tornam-se potenciais sistemas multifuncionais capazes de promover o direcionamento de fármacos hidrofóbicos, e também contribuir para o diagnóstico através de suas propriedades magnéticas.

### **III. Conclusão**

A utilização de sistemas baseados em MNP visando a multifuncionalidade dessas partículas para o tratamento de tumores possui grande potencial não só no âmbito de exames de imagem, mas também na entrega de fármacos dirigida através da hipertermia magnética, constituindo tecnologias promissoras no tratamento do câncer. Especificamente para as nanopartículas magnéticas de ferrita de Mn e Zn, recentes nesse processo, mas que acoplam diferentes elementos buscando um tratamento mais direcionado e com menos efeitos tóxicos adjacentes. No entanto, limitações associadas a características físico-químicas, são comumente encontradas nos estudos o que torna muitas vezes difícil a aprovação para uso clínico. Portanto, precisamos de uma melhor compreensão da relevância funcional das nanopartículas magnéticas de óxido de ferro e suas variações na relação com o microambiente tumoral, para diminuir a distância entre o que se pesquisa e o que se aplica, a fim de fornecer uma estratégia terapêutica multifuncional contra o câncer.

#### IV. Referências

1. Cheng Z, Al Zaki A, Hui JZ, Muzykantov VR, Tsourkas A. Multifunctional nanoparticles: cost versus benefit of adding targeting and imaging capabilities. *Science*. 2012;338(6109):903-10. Epub 2012/11/20.
2. Kelkar SS, Reineke TM. Theranostics: combining imaging and therapy. *Bioconjugate chemistry*. 2011;22(10):1879-903. Epub 2011/08/13.
3. Li LT, R.; Li, M.; Kohane, D.S. Self-assembled gemcitabine-gadolinium nanoparticles for magnetic resonance imaging and cancer therapy. *Acta Biomater*. 2016;33:34–9.
4. Rizzo LY, Theek B, Storm G, Kiessling F, Lammers T. Recent progress in nanomedicine: therapeutic, diagnostic and theranostic applications. *Current opinion in biotechnology*. 2013;24(6):1159-66. Epub 2013/04/13.
5. Lee GY, Qian WP, Wang L, Wang YA, Staley CA, Satpathy M, et al. Theranostic nanoparticles with controlled release of gemcitabine for targeted therapy and MRI of pancreatic cancer. *ACS nano*. 2013;7(3):2078-89. Epub 2013/02/14.
6. Tian Q, Hu J, Zhu Y, Zou R, Chen Z, Yang S, et al. Sub-10 nm Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Cu(2-x)S core-shell nanoparticles for dual-modal imaging and photothermal therapy. *Journal of the American Chemical Society*. 2013;135(23):8571-7. Epub 2013/05/22.
7. Bardhan R, Lal S, Joshi A, Halas NJ. Theranostic nanoshells: from probe design to imaging and treatment of cancer. *Accounts of chemical research*. 2011;44(10):936-46. Epub 2011/05/27.
8. Huang P, Rong P, Lin J, Li W, Yan X, Zhang MG, et al. Triphase interface synthesis of plasmonic gold bellflowers as near-infrared light mediated acoustic and thermal theranostics. *Journal of the American Chemical Society*. 2014;136(23):8307-13. Epub 2014/05/21.
9. Kim J, Piao Y, Hyeon T. Multifunctional nanostructured materials for multimodal imaging, and simultaneous imaging and therapy. *Chemical Society reviews*. 2009;38(2):372-90. Epub 2009/01/27.
10. Giljohann DA, Seferos DS, Daniel WL, Massich MD, Patel PC, Mirkin CA. Gold nanoparticles for biology and medicine. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2010;49(19):3280-94. Epub 2010/04/20.
11. Yousefi A EF, Rshimian S, Atyabi F, Dinarvand R. . Preparation and in vitro evaluation of a pegylated nano-liposomal formulation containing docetaxel. . *Sci Pharm* 2009;77:453–64.
12. Sharma R YM, Bhaskar S, Asif M. . Formulation and evaluation of paclitaxel loaded PSA-PEG nanoparticle. . *J App Pharm Sci*. 2011;1:96–8.
13. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000;100(1):57-70. Epub 2000/01/27.
14. Byrne JD, Betancourt T, Brannon-Peppas L. Active targeting schemes for nanoparticle systems in cancer therapeutics. *Advanced drug delivery reviews*. 2008;60(15):1615-26. Epub 2008/10/09.
15. Puri A, Loomis K, Smith B, Lee JH, Yavlovich A, Heldman E, et al. Lipid-based nanoparticles as pharmaceutical drug carriers: from concepts to clinic. *Critical reviews in therapeutic drug carrier systems*. 2009;26(6):523-80. Epub 2009/01/01.

16. Miller MA, Gadde S, Pfirschke C, Engblom C, Sprachman MM, Kohler RH, et al. Predicting therapeutic nanomedicine efficacy using a companion magnetic resonance imaging nanoparticle. *Science translational medicine*. 2015;7(314):314ra183. Epub 2015/11/20.
17. Hare JJ, Lammers T, Ashford MB, Puri S, Storm G, Barry ST. Challenges and strategies in anti-cancer nanomedicine development: An industry perspective. *Advanced drug delivery reviews*. 2017;108:25-38. Epub 2016/05/04.
18. Matsumura Y, Maeda H. A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: mechanism of tumoritropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs. *Cancer research*. 1986;46(12 Pt 1):6387-92. Epub 1986/12/01.
19. ea MM. Encapsulation of paclitaxel into a bio-nanocomposite. A study combining inelastic neutron scattering to thermal analysis and infrared spectroscopy. *EPJ Web Conf* 2015;83.
20. Perez-Herrero E, Fernandez-Medarde A. Advanced targeted therapies in cancer: Drug nanocarriers, the future of chemotherapy. *European journal of pharmaceuticals and biopharmaceutics : official journal of Arbeitsgemeinschaft fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik eV*. 2015;93:52-79. Epub 2015/03/31.
21. Barraud L, Merle P, Soma E, Lefrancois L, Guerret S, Chevallier M, et al. Increase of doxorubicin sensitivity by doxorubicin-loading into nanoparticles for hepatocellular carcinoma cells in vitro and in vivo. *Journal of hepatology*. 2005;42(5):736-43. Epub 2005/04/14.
22. Han HD, Mangala LS, Lee JW, Shahzad MM, Kim HS, Shen D, et al. Targeted gene silencing using RGD-labeled chitosan nanoparticles. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2010;16(15):3910-22. Epub 2010/06/12.
23. Parveen S, Mitra M, Krishnakumar S, Sahoo SK. Enhanced antiproliferative activity of carboplatin-loaded chitosan-alginate nanoparticles in a retinoblastoma cell line. *Acta Biomater*. 2010;6(8):3120-31. Epub 2010/02/13.
24. Northfelt DW, Martin FJ, Working P, Volberding PA, Russell J, Newman M, et al. Doxorubicin encapsulated in liposomes containing surface-bound polyethylene glycol: pharmacokinetics, tumor localization, and safety in patients with AIDS-related Kaposi's sarcoma. *Journal of clinical pharmacology*. 1996;36(1):55-63. Epub 1996/01/01.
25. Presant CA SM, Kennedy P, Blayney DW, Flanagan B, Lisak J, et al. . Liposomal daunorubicin treatment of HIV-associated Kaposi's sarcoma. . *Lancet*. 1993;341(8855):1242-3.
26. Reimer P, Tombach B. Hepatic MRI with SPIO: detection and characterization of focal liver lesions. *European radiology*. 1998;8(7):1198-204. Epub 1998/09/02.
27. Bross PF, Beitz J, Chen G, Chen XH, Duffy E, Kieffer L, et al. Approval summary: gemtuzumab ozogamicin in relapsed acute myeloid leukemia. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2001;7(6):1490-6. Epub 2001/06/19.
28. Theuer CP, Leigh BR, Multani PS, Allen RS, Liang BC. Radioimmunotherapy of non-Hodgkin's lymphoma: clinical development of the Zevalin regimen. *Biotechnology annual review*. 2004;10:265-95. Epub 2004/10/27.
29. Gradishar WJ. Albumin-bound paclitaxel: a next-generation taxane. *Expert opinion on pharmacotherapy*. 2006;7(8):1041-53. Epub 2006/05/26.
30. Dinndorf PA, Gootenberg J, Cohen MH, Keegan P, Pazdur R. FDA drug approval

summary: pegaspargase (oncaspar) for the first-line treatment of children with acute lymphoblastic leukemia (ALL). *The oncologist*. 2007;12(8):991-8. Epub 2007/09/04.

31. Lansigan F, Stearns DM, Foss F. Role of denileukin diftitox in the treatment of persistent or recurrent cutaneous T-cell lymphoma. *Cancer management and research*. 2010;2:53-9. Epub 2010/12/29.

32. Saif MW. U.S. Food and Drug Administration approves paclitaxel protein-bound particles (Abraxane(R)) in combination with gemcitabine as first-line treatment of patients with metastatic pancreatic cancer. *JOP : Journal of the pancreas*. 2013;14(6):686-8. Epub 2013/11/13.

33. Peer D, Karp JM, Hong S, Farokhzad OC, Margalit R, Langer R. Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy. *Nature nanotechnology*. 2007;2(12):751-60. Epub 2008/07/26.

34. Allen TM, Cullis PR. Drug delivery systems: entering the mainstream. *Science*. 2004;303(5665):1818-22. Epub 2004/03/20.

35. Caravan P, Ellison JJ, McMurry TJ, Lauffer RB. Gadolinium(III) Chelates as MRI Contrast Agents: Structure, Dynamics, and Applications. *Chemical reviews*. 1999;99(9):2293-352. Epub 2001/12/26.

36. Liu G, Zhang G, Hu J, Wang X, Zhu M, Liu S. Hyperbranched Self-Immolative Polymers (hSIPs) for Programmed Payload Delivery and Ultrasensitive Detection. *Journal of the American Chemical Society*. 2015;137(36):11645-55. Epub 2015/09/04.

37. Sanna V, Pala N, Sechi M. Targeted therapy using nanotechnology: focus on cancer. *International journal of nanomedicine*. 2014;9:467-83. Epub 2014/02/18.

38. Doane TL, Burda C. The unique role of nanoparticles in nanomedicine: imaging, drug delivery and therapy. *Chemical Society reviews*. 2012;41(7):2885-911. Epub 2012/01/31.

39. Kim BY, Rutka JT, Chan WC. Nanomedicine. *The New England journal of medicine*. 2010;363(25):2434-43. Epub 2010/12/17.

40. Riehemann K, Schneider SW, Luger TA, Godin B, Ferrari M, Fuchs H. Nanomedicine--challenge and perspectives. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2009;48(5):872-97. Epub 2009/01/15.

41. Zhang L, Gu FX, Chan JM, Wang AZ, Langer RS, Farokhzad OC. Nanoparticles in medicine: therapeutic applications and developments. *Clinical pharmacology and therapeutics*. 2008;83(5):761-9. Epub 2007/10/25.

42. Langer R. Polymer-controlled drug delivery systems. *Acc Chem Res* 1993;26:537-42. .

43. Tong R, Chiang HH, Kohane DS. Photoswitchable nanoparticles for in vivo cancer chemotherapy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2013;110(47):19048-53. Epub 2013/11/06.

44. Cheng L, Wang C, Feng L, Yang K, Liu Z. Functional nanomaterials for phototherapies of cancer. *Chemical reviews*. 2014;114(21):10869-939. Epub 2014/09/27.

45. Malam Y LM, Seifalian AM. . Liposomes and nanoparticles: nanosized vehicles for drug delivery in cancer. *Trends Pharmacol Sci*. 2009;30(11).

46. Zhang H, Ma Y, Sun XL. Chemically-selective surface glyco-functionalization of liposomes through Staudinger ligation. *Chem Commun (Camb)*. 2009(21):3032-4. Epub 2009/05/23.

47. Noble GT, Stefanick JF, Ashley JD, Kiziltepe T, Bilgicer B. Ligand-targeted

liposome design: challenges and fundamental considerations. *Trends in biotechnology*. 2014;32(1):32-45. Epub 2013/11/12.

48. Al-Jamal WT, Kostarelos K. Liposomes: from a clinically established drug delivery system to a nanoparticle platform for theranostic nanomedicine. *Accounts of chemical research*. 2011;44(10):1094-104. Epub 2011/08/05.

49. Allen TM, Cullis PR. Liposomal drug delivery systems: from concept to clinical applications. *Advanced drug delivery reviews*. 2013;65(1):36-48. Epub 2012/10/06.

50. Cole JT, Holland NB. Multifunctional nanoparticles for use in theranostic applications. *Drug delivery and translational research*. 2015;5(3):295-309. Epub 2015/03/20.

51. Soppimath KS, Aminabhavi TM, Kulkarni AR, Rudzinski WE. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*. 2001;70(1-2):1-20. Epub 2001/02/13.

52. Agnihotri SA, Mallikarjuna NN, Aminabhavi TM. Recent advances on chitosan-based micro- and nanoparticles in drug delivery. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*. 2004;100(1):5-28. Epub 2004/10/20.

53. Bala I, Hariharan S, Kumar MN. PLGA nanoparticles in drug delivery: the state of the art. *Critical reviews in therapeutic drug carrier systems*. 2004;21(5):387-422. Epub 2005/02/22.

54. Gu F, Zhang L, Teply BA, Mann N, Wang A, Radovic-Moreno AF, et al. Precise engineering of targeted nanoparticles by using self-assembled biointegrated block copolymers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2008;105(7):2586-91. Epub 2008/02/15.

55. Oerlemans C, Bult W, Bos M, Storm G, Nijsen JF, Hennink WE. Polymeric micelles in anticancer therapy: targeting, imaging and triggered release. *Pharmaceutical research*. 2010;27(12):2569-89. Epub 2010/08/21.

56. Matsumura Y. Preclinical and clinical studies of NK012, an SN-38-incorporating polymeric micelles, which is designed based on EPR effect. *Advanced drug delivery reviews*. 2011;63(3):184-92. Epub 2010/06/22.

57. Sutton D, Nasongkla N, Blanco E, Gao J. Functionalized micellar systems for cancer targeted drug delivery. *Pharmaceutical research*. 2007;24(6):1029-46. Epub 2007/03/27.

58. Shenoi MM, Shah NB, Griffin RJ, Vercellotti GM, Bischof JC. Nanoparticle preconditioning for enhanced thermal therapies in cancer. *Nanomedicine (Lond)*. 2011;6(3):545-63. Epub 2011/05/06.

59. Zhu L, Zhou Z, Mao H, Yang L. Magnetic nanoparticles for precision oncology: theranostic magnetic iron oxide nanoparticles for image-guided and targeted cancer therapy. *Nanomedicine (Lond)*. 2017;12(1):73-87. Epub 2016/11/24.

60. Conde J, Dias JT, Grazu V, Moros M, Baptista PV, de la Fuente JM. Revisiting 30 years of biofunctionalization and surface chemistry of inorganic nanoparticles for nanomedicine. *Frontiers in chemistry*. 2014;2:48. Epub 2014/08/01.

61. B B. Superparamagnetic agents in magnetic resonance imaging: physicochemical characteristics and clinical applications. A review. . *J Drug Target* 6(3).

62. Campbell JL AJ, Cowell SF et al. . Quasi-cubic magnetite/silica core-shell nanoparticles as enhanced MRI contrast agents for cancer imaging. . *PloS one*. 2011;6(7).

63. Wen G ZX, Chang RM, Xia Q, Cang P, Zhang Y. Superparamagnetic iron oxide (Feridex)-enhanced MRI in diagnosis of focal hepatic lesions. . *Di Yi Jun Yi Da Xue Xue*

Bao 2002;22(5).

64. Clement O SN, Cuenod CA, Frija G. Liver imaging with ferumoxides (Feridex): fundamentals, controversies, and practical aspects. *Top Magn Reson Imaging* 1998;9(3).

65. Johnson L PS, Douek M. . Deposition of superparamagnetic iron-oxide nanoparticles in axillary sentinel lymph nodes following subcutaneous injection. *Histopathology*. 2013;62(3).

66. Kernstine KH SW, Mullan BF et al. MRI with Combidex for mediastinal staging in non-small cell lung carcinoma. . *Ann Thorac Surg* 1999;68(3).

67. Harisinghani MG SS, Hahn PF, Weissleder R, Mueller PR. . MR imaging of lymph nodes in patients with primary abdominal and pelvic malignancies using ultrasmall superparamagnetic iron oxide (Combidex). . *Acad Radiol*. 1998;5((Suppl. 1), ).

68. Reimer P BT. Ferucarbotran (Resovist): a new clinically approved RES-specific contrast agent for contrast-enhanced MRI of the liver: properties, clinical development, and applications. . *Eur Radiol* 2003;13(6).

69. Vogl TJ HR, Schwarz W et al. Magnetic resonance imaging of focal liver lesions. Comparison of the superparamagnetic iron oxide resovist versus gadolinium- DTPA in the same patient. *Invest Radiol* 1996;31(11).

70. Reimer P RE, Daldrup HE et al. . Clinical results with Resovist: a Phase 2 clinical trial. . *Radiology* 1995;195(2).

71. Bullivant JP ZS, Willenberg BJ, Kozissnik B, Batich CD, Dobson J. Materials characterization of Feraheme/ ferumoxytol and preliminary evaluation of its potential for magnetic fluid hyperthermia. . *Int J Mol Sci* 2013;14(9).

72. Maier-Hauff K UF, Nestler D et al. . Efficacy and safety of intratumoral thermotherapy using magnetic iron-oxide nanoparticles combined with external beam radiotherapy on patients with recurrent glioblastoma multiforme. . *J Neuro-Oncol*. 2011;103(2).

73. KIM DH, LEE, S. H., IM, K. H., KIM, K. N., KIM, K. M., SHIM, I. B., LEE, M., H. L, Y.K. Surface-modified magnetite nanoparticles for hyperthermia: Preparation, characterization, and cytotoxicity studies. *Current Applied Physics* 2006;6s1.

74. LEE SJ, J.; SHIN, S.; KIM, J.; KIM, J. . Synthesis and characterization of superparamagnetic maghemite nanoparticles prepared by coprecipitation technique. . *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* 2004;282.

75. Goldman A. *Modern Ferrite Technology* 2006.

76. Shahbazi-Gahrouei D, Abdolahi M, Zarkesh-Esfahani SH, Laurent S, Sermeus C, Gruettner C. Functionalized magnetic nanoparticles for the detection and quantitative analysis of cell surface antigen. *BioMed research international*. 2013;2013:349408. Epub 2013/03/14.

77. Mazario E, Herrasti P, Morales MP, Menendez N. Synthesis and characterization of CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> ferrite nanoparticles obtained by an electrochemical method. *Nanotechnology*. 2012;23(35):355708. Epub 2012/08/17.

78. Chakraborty M, Jain S, Rani V. *Nanotechnology: emerging tool for diagnostics and therapeutics*. *Applied biochemistry and biotechnology*. 2011;165(5-6):1178-87. Epub 2011/08/19.

79. Parveen S, Misra R, Sahoo SK. Nanoparticles: a boon to drug delivery, therapeutics, diagnostics and imaging. *Nanomedicine : nanotechnology, biology, and medicine*. 2012;8(2):147-66. Epub 2011/06/28.

80. McGeough C BA. Diagnostic, prognostic and theranostic genetic biomarkers for

rheumatoid arthritis. *J Clin Cell Immuno*. 2012;6(002).

81. Shinkai M, Yanase M, Honda H, Wakabayashi T, Yoshida J, Kobayashi T. Intracellular hyperthermia for cancer using magnetite cationic liposomes: in vitro study. *Japanese journal of cancer research : Gann*. 1996;87(11):1179-83. Epub 1996/11/01.

82. Yoo D, Jeong H, Noh SH, Lee JH, Cheon J. Magnetically triggered dual functional nanoparticles for resistance-free apoptotic hyperthermia. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2013;52(49):13047-51. Epub 2013/11/28.

83. Salunkhe AB, Khot VM, Pawar SH. Magnetic hyperthermia with magnetic nanoparticles: a status review. *Current topics in medicinal chemistry*. 2014;14(5):572-94. Epub 2014/01/22.

84. Jeon MJ, Ahn CH, Kim H, Chung IJ, Jung S, Kim YH, et al. The intratumoral administration of ferucarbotran conjugated with doxorubicin improved therapeutic effect by magnetic hyperthermia combined with pharmacotherapy in a hepatocellular carcinoma model. *Journal of experimental & clinical cancer research : CR*. 2014;33:57. Epub 2014/07/20.

85. Giustini AJ, Petryk AA, Cassim SM, Tate JA, Baker I, Hoopes PJ. Magnetic Nanoparticle Hyperthermia in Cancer Treatment. *Nano LIFE*. 2010;1(1n02). Epub 2010/03/01.

86. Kumar CS, Mohammad F. Magnetic nanomaterials for hyperthermia-based therapy and controlled drug delivery. *Advanced drug delivery reviews*. 2011;63(9):789-808. Epub 2011/03/31.

87. Chatterjee DK, Diagaradjane P, Krishnan S. Nanoparticle-mediated hyperthermia in cancer therapy. *Therapeutic delivery*. 2011;2(8):1001-14. Epub 2012/04/17.

88. Chu KF, Dupuy DE. Thermal ablation of tumours: biological mechanisms and advances in therapy. *Nature reviews Cancer*. 2014;14(3):199-208. Epub 2014/02/25.

89. Revia RA, Zhang M. Magnetite nanoparticles for cancer diagnosis, treatment, and treatment monitoring: recent advances. *Mater Today (Kidlington)*. 2016;19(3):157-68. Epub 2016/08/16.

90. Zhang J, Shin MC, Yang VC. Magnetic targeting of novel heparinized iron oxide nanoparticles evaluated in a 9L-glioma mouse model. *Pharmaceutical research*. 2014;31(3):579-92. Epub 2013/09/26.

91. Sanjai C, Kothan S, Gonil P, Saesoo S, Sajomsang W. Chitosan-triphosphate nanoparticles for encapsulation of super-paramagnetic iron oxide as an MRI contrast agent. *Carbohydrate polymers*. 2014;104:231-7. Epub 2014/03/13.

92. Naha PC, Zaki AA, Hecht E, Chorny M, Chhour P, Blankemeyer E, et al. Dextran coated bismuth-iron oxide nanohybrid contrast agents for computed tomography and magnetic resonance imaging. *Journal of materials chemistry B*. 2014;2(46):8239-48. Epub 2014/12/09.

93. Jin R, Lin B, Li D, Ai H. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles for MR imaging and therapy: design considerations and clinical applications. *Current opinion in pharmacology*. 2014;18:18-27. Epub 2014/09/01.

94. Wang JJ ZZ, Xiao RZ, Xie T, Zhou GL, Zhan XR, et al. . Recent advances of chitosan nanoparticles as drug carriers. . *International journal of nanomedicine*. 2011;6.

95. Felt O, Buri P, Gurny R. Chitosan: a unique polysaccharide for drug delivery. *Drug development and industrial pharmacy*. 1998;24(11):979-93. Epub 1999/01/07.

96. Lv PP, Wei W, Yue H, Yang TY, Wang LY, Ma GH. Porous quaternized chitosan nanoparticles containing paclitaxel nanocrystals improved therapeutic efficacy in non-

small-cell lung cancer after oral administration. *Biomacromolecules*. 2011;12(12):4230-9. Epub 2011/11/03.

97. Di Martino A, Sittinger M, Risbud MV. Chitosan: a versatile biopolymer for orthopaedic tissue-engineering. *Biomaterials*. 2005;26(30):5983-90. Epub 2005/05/17.

98. KONG LG, Y.; LU, G.; GONG, Y.; ZHAO, N.; ZHANG, X. A study on the bioactivity of chitosan/nano-hydroxyapatite composite scaffolds for bone tissue engineering. . *European Polymer Journal*. 2006;42.

99. Andrade LM GJ GO, Leite MTT, Catarina AM, et al. Nucleoplasmic Calcium Buffering Sensitizes Human Squamous Cell Carcinoma to Anticancer Therapy. . *J Cancer Sci Ther* 2012;4.

100. Rodrigues MA, Gomes DA, Leite MF, Grant W, Zhang L, Lam W, et al. Nucleoplasmic calcium is required for cell proliferation. *The Journal of biological chemistry*. 2007;282(23):17061-8. Epub 2007/04/11.

101. Liao J, Schneider A, Datta NS, McCauley LK. Extracellular calcium as a candidate mediator of prostate cancer skeletal metastasis. *Cancer research*. 2006;66(18):9065-73. Epub 2006/09/20.

102. Kondratskyi A, Yassine M, Kondratska K, Skryma R, Slomianny C, Prevarskaya N. Calcium-permeable ion channels in control of autophagy and cancer. *Frontiers in physiology*. 2013;4:272. Epub 2013/10/10.

103. Bellahcene A, Castronovo V. Increased expression of osteonectin and osteopontin, two bone matrix proteins, in human breast cancer. *The American journal of pathology*. 1995;146(1):95-100. Epub 1995/01/01.

104. Diel IJ, Solomayer EF, Costa SD, Gollan C, Goerner R, Wallwiener D, et al. Reduction in new metastases in breast cancer with adjuvant clodronate treatment. *The New England journal of medicine*. 1998;339(6):357-63. Epub 1998/08/06.

105. Montha W, Maneeprakorn W, Buatong N, Tang IM, Pon-On W. Synthesis of doxorubicin-PLGA loaded chitosan stabilized (Mn, Zn)Fe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles: Biological activity and pH-responsive drug release. *Materials science & engineering C, Materials for biological applications*. 2016;59:235-40. Epub 2015/12/15.

106. Martins ML, Ignazzi R, Eckert J, Watts B, Kaneno R, Zambuzzi WF, et al. Restricted mobility of specific functional groups reduces anti-cancer drug activity in healthy cells. *Scientific reports*. 2016;6:22478. Epub 2016/03/05.

107. Martins ML, FA CA, Silva RIV, Dos Santos DI, Saeki MJ. . Mechanisms of phase formation along the synthesis of Mn–Zn ferrites by the polymeric precursor method. *Ceramics International* 2014b;40.

108. Martins ML, SM TM, Parra JPRL, Landsgesell S, Smith RI, Bordallo HN. Development and characterization of a new bio-nanocomposite (bio-NCP) for diagnosis and treatment of breast cancer. 2014a;584.

**CAPÍTULO II**  
*Dissertação*

## **Lista de abreviaturas**

<b>Mn</b>	<b>Manganês</b>
<b>Zn</b>	<b>Zinco</b>
<b>PSA</b>	<b>Antígeno prostático específico</b>
<b>APA</b>	<b>Hidroxiapatita</b>
<b>Ca/P</b>	<b>Razão massa entre cálcio e fósforo</b>
<b>PTX</b>	<b>Paclitaxel</b>
<b>Gp-P</b>	<b>Glicoproteína P</b>
<b>EPR</b>	<b>Fator de retenção e permeabilidade</b>
<b>ROS</b>	<b>Espécies reativas de oxigênio</b>
<b>bioNCP</b>	<b>Bio-nanocompósito</b>
<b>bioNCP APA</b>	<b>Bio-nanocompósito-hidroxiapatita</b>
<b>bioNCP PTX</b>	<b>bio-nanocompósito-paclitaxel</b>
<b>bioNCP PTX APA</b>	<b>bio-nanocompósito-paclitaxel-hidroxiapatita</b>
<b>RWp</b>	<b>Parâmetro de refinamento de cristais</b>
<b>C-H</b>	<b>Ligação carbono e hidrogênio</b>
<b>C-N</b>	<b>Ligação carbono e nitrogênio</b>
<b>Fe-O</b>	<b>Ligação ferro e oxigênio</b>
<b>PI</b>	<b>Ponto isoelétrico</b>
<b>EDX</b>	<b>Energia dispersiva por raio-X</b>

## Resumo

O câncer de próstata é um dos principais tipos de câncer em todo o mundo, sendo o que causa maior morbidade. Apesar da alta probabilidade de cura nos casos com diagnóstico precoce, essa neoplasia é responsável por mais de 80% dos casos de metástases ósseas e, uma vez detectada, a doença maligna é considerada incurável. Os íons de cálcio são fundamentais da maquinaria celular e sua concentração está intimamente ligada a processos vitais, entre eles a proliferação celular. Visto que as células tumorais são mais sensíveis e dependentes dos níveis de cálcio para manutenção da proliferação, apresentando maior afeição por esse elemento que as células normais, no presente estudo testamos a hipótese de que o revestimento, com cálcio (hidroxiapatita), de nanopartículas magnéticas de ferrita Mn-Zn polimerizadas com quitosana, poderia endereçar o fármaco paclitaxel às células de câncer prostático, levando-as à morte celular. Coerente com nossa hipótese inicial, nossos resultados para as nanopartículas mimetizadas com hidroxiapatita mostraram-se com grande potencial citotóxico para células de câncer de próstata LNCaP, sem, entretanto, afetar pró-osteoblastos murinos da linhagem MC3T3. As nanopartículas contendo apenas paclitaxel (bio-NCP-PTX) promoveram níveis de morte celular muito próximos aos observados com concentração similar de PTX puro, apresentando, portanto, resultado superior ao composto revestido com Ca (bio-NCP-PTX-APA). Por fim, observamos que o núcleo magnético, a matriz polimérica de quitosana revestida ou não com hidroxiapatita, não possuem por si só efeitos tóxicos. Assim, esses resultados indicam que essas nanopartículas têm potencial para carrear quimioterápicos para as células de câncer de próstata.

## **Abstract**

Prostate cancer figures among the most frequent types of cancer in the world, being the one with greatest morbidity. Despite the high probability of cure of early diagnosed cases, this neoplasm is responsible for more than 80% of cases of bone metastases and, once achieved the disease is considered incurable. Calcium ions are fundamental to the cell machinery and their concentration is closely linked to vital processes, among them cell proliferation. Since tumor cells are more sensitive and dependent on calcium levels to maintain proliferation, being more avid for this element than normal cells, in the present study we tested the hypothesis that mimicry of magnetic MN-Zn nanoparticles polymerized with chitosan, with calcium (hydroxyapatite), would be able to address paclitaxel to prostate cancer cells, leading to cell death. In agreement with our hypothesis, our results show that hydroxyapatite-mimicked nanoparticles have a high cytotoxic potential to LNCaP prostate cancer cells, with no toxicity to non malignant pro-osteoblast murine cell line. Nanoparticles containing only paclitaxel (bio-NCP-PTX) promoted cell death in a level close to that induced by similar concentration of pure paclitaxel. It indicates that this composite worked better than that covered by Ca (bio-NCP-PTX-APA). Finally, we observed that the magnetic core, with the polymer matrix of chitosan coated or not with hydroxyapatite, does not have toxic effects alone. Thus, these results indicate that these nanoparticles are a potential carrier of drugs for prostate cancer cells.

## I. INTRODUÇÃO

A International Agency for Research on Cancer (IARC) estimou no relatório GLOBOCAN a ocorrência de cerca de 18,1 milhões de novos casos de câncer no mundo para 2018 e a previsão até 2040 é alarmante, com cerca de 29,5 milhões de novos casos. Entre os tipos mais incidentes de câncer, o de próstata ocupa a quarta posição no *ranking* mundial, sendo responsável por 1,3 milhões de novos casos. Somente em 2018, a soma das mortes provocadas por câncer chega a aproximadamente 9,6 milhões, dos quais 358.989 mil pertencentes ao câncer de próstata (1, 2).

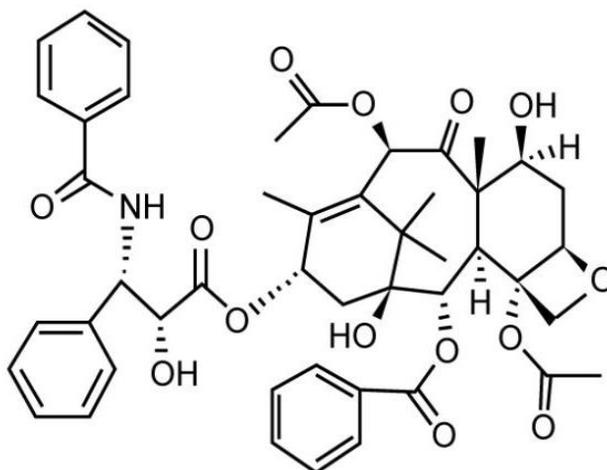
Segundo o Instituto Nacional de Câncer (INCA), no Brasil, a estimativa para 2018 foi de 68.220 mil novos casos de câncer de próstata, ocupando a 2º lugar entre os cânceres mais incidentes em homens, com número de óbitos de aproximadamente 13.772 casos. É considerado um câncer da terceira idade, já que cerca de três quartos dos casos no mundo ocorrem a partir dos 65 anos, possuindo na maioria dos casos uma progressão lenta. No entanto, alguns desses tumores podem crescer de forma rápida, estabelecendo outros sítios de crescimento tumoral, dependendo do seu estadiamento. O câncer de próstata também apresenta grande frequência de recidivas e possui como sítio metastático, o osso, observando em muitos casos elevados níveis séricos de antígeno prostático específico (PSA), mesmo após a realização de prostatectomia. Nessa condição, denominada recidiva bioquímica, nem sempre é possível determinar a localização de células recidivantes, impossibilitando a intervenção radioterápica e tornando difícil a avaliação da eficiência da quimioterapia (3).

Desse modo torna-se de extrema importância a utilização da vigilância ativa, que consiste na realização de exames periódicos para detecção de PSA, exames de toque retal e também biópsias. Os tratamentos usuais para os pacientes com câncer de próstata baseiam-se na cirurgia para retirada parcial ou total da próstata e/ou órgãos adjacentes, na utilização de radiação ionizante e ainda, a terapia hormonal, sendo os casos com doença em estágio avançado empregado a quimioterapia (3).

A quimioterapia é administrada através da utilização de drogas injetáveis ou via oral, que se difundem de forma sistêmica para atingir as células metastáticas. No entanto, outros tipos celulares que possuem divisão rápida também são afetados, como células medulares e intestinais, promovendo efeitos colaterais adversos ao paciente (4 - 8). Nesse contexto, células do sistema imunológico que proliferam de forma intensa ao estímulo imunogênico tornam-se alvos da quimioterapia, promovendo um estado de imunossupressão que pode comprometer a capacidade do paciente de combater o tumor e ainda, favorecer a metástase óssea (9,10).

Entre os quimioterápicos utilizados para tratamento do câncer de próstata encontram-se os taxóis, como docetaxel e paclitaxel (PTX), sendo este último um dos fármacos antitumorais mais eficazes e amplamente utilizados (11). A estrutura química de PTX consiste em um anel taxano que confere à molécula atividade citostática e uma cadeia lateral estereo-específica com dois anéis aromáticos ligados por uma amida (**Figura 1**) (12). Seu mecanismo de ação baseia-se na estabilização dos microtúbulos, inibindo as fases tardias de G2 ou M do ciclo

celular, com conseqüente morte celular. Entretanto, a principal limitação encontrada nos tratamentos com PTX é sua baixa solubilidade em água, necessitando de formulações com diferentes solventes orgânicos, muitas vezes tóxicos e capazes de provocar reações de hipersensibilidade, como é o caso do Cremofor EL (13). Outra fator limitante, é que PTX também atua como substrato da glicoproteína P (gp-P), que acaba por bombear de forma ativa PTX para fora das células, colaborando com a resistência ao fármaco (14). Como tentativa para superar este mecanismo, alguns inibidores da gp-P, como verapamil e PSC 833 foram co-administrados. No entanto, os resultados foram desanimadores devido à toxicidade desses inibidores, ou ainda pela própria farmacocinética e biodistribuição de PTX (15).



**Figura 1:** Estrutura química de PTX. Composta por um anel taxano que confere à molécula atividade citostática (à direita) e uma cadeia lateral estereo-específica com dois anéis aromáticos ligados por uma amida (à esquerda).

Somado aos fatores limitantes do tratamento com o quimioterápico PTX, o câncer de próstata figura entre os principais responsáveis por mais de 80% de metástases ósseas e uma vez detectada, a doença é considerada incurável (16). Nesse estágio, o metabolismo ósseo encontra-se desequilibrado, levando o paciente a um quadro de perda de integridade óssea, dor, fraturas, compressão da raiz nervosa e hipercalcemia, sendo a dor óssea considerada a mais prevalente de todos os tipos de dor associadas ao câncer, muitas vezes acompanhada por um declínio substancial na qualidade de vida do paciente (17, 18).

Em um processo normal, o esqueleto adulto é continuamente reparado através da remodelação óssea, o qual é essencial para a renovação e manutenção estrutural durante o processo de reabsorção dos minerais. A homeostase óssea é estabelecida por um equilíbrio entre a reabsorção feita pelos osteoclastos e a formação óssea através dos osteoblastos, principais processos de remodelação óssea (19-23). A remodelação é estimulada por diversos fatores, incluindo a mobilização de cálcio e a adesão celular (24). O tecido ósseo é caracterizado pela presença de fosfato e cálcio mineral, na forma de hidroxiapatita ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ), referida a seguir como APA, o principal componente mineral e elemento chave para apoio mecânico, pois a associação de APA (parte inorgânica) com as fibras colágenas (parte orgânica) garante a dureza e a resistência do tecido ósseo (25). A APA possui razão de massa de Ca/P igual a 1,67 (26, 27), sendo esta relação de grande significância, uma vez que leves desequilíbrios entre Ca/P podem levar à

formação de outros compostos que afetam diretamente a interação com tecidos biológicos (28).

Diferente das células normais, as células tumorais, principalmente aquelas com predominância de metástases ósseas, são mais sensíveis a alterações nos níveis de cálcio e desequilíbrios na homeostase desse íon podem favorecer o fenótipo maligno, já que essas células necessitam de quantidades maiores deste elemento para manutenção da proliferação celular (29 - 31). Desse modo, o cálcio atua como um mensageiro importante para a regulação do crescimento no microambiente tumoral, favorecendo a motilidade e invasão celular, para escapar à morte, evitar o ataque imunológico, ou para promover a neovascularização (32). Alguns estudos mostram que o alto percentual de células neoplásicas, que se instalam nos ossos, como as de próstata, pode estar relacionado também à grande afinidade destas células por cristais de hidroxiapatita como forma para remodelar a própria rede de sinalização de  $Ca^{2+}$ . (33, 34). Sendo assim, novas abordagens visando essa afinidade podem facilitar, por exemplo, a entrega direcionada de fármacos, bem como a diminuição dos efeitos colaterais, reduzindo as barreiras de toxicidade sistêmica e recidiva da doença, a fim de superar as limitações dos tratamentos quimioterápicos atuais.

Propostas recentes de entrega direcionada de fármacos envolvendo o uso de nanoestruturas podem melhorar a solubilidade de drogas hidrofóbicas, como PTX, e reduzir a toxicidade sistêmica originada pelas altas doses (35). Neste cenário, a nanotecnologia representa uma oportunidade para traçar estratégias visando a

multifuncionalidade de partículas, através da melhora dos perfis farmacocinéticos e farmacodinâmicos das terapêuticas convencionais, aperfeiçoando a eficácia de compostos anticancerígenos já existentes (36), como forma para contornar os mecanismos de escape tumoral e resistência à quimioterapia (37).

Embora grande parte da nanotecnologia preconize o uso de estruturas em escala de 10 a 100 nanômetros (nm) (38) para possibilitar o fluxo entre estruturas celulares, ressalta-se a necessidade de avaliação das propriedades físico-químicas e comportamentais durante o desenvolvimento de nanopartículas (39, 40). Apesar disso, nanoestruturas um pouco maiores que 100nm, têm possibilitado a melhora na eficácia terapêutica de fármacos devido ao tempo de circulação, aumentando a ação destes sobre as células tumorais, visto que essas partículas possuem uma relação superfície-volume maiores, ao mesmo tempo em que diminuem os efeitos tóxicos nas células saudáveis (41-45). Portanto, o tamanho das partículas deve ser otimizado para evitar a rápida eliminação pelas células do sistema imune e o acúmulo em órgãos como fígado e baço, ou ainda, pela excreção através do sistema renal. Nanopartículas na faixa de 100 nm tendem a acumular em tumores pelo aumento de permeabilidade e retenção (EPR), devido a fenestrações de vasos sanguíneos com dimensões de centenas de nanômetros presentes nos tecidos tumorais (46).

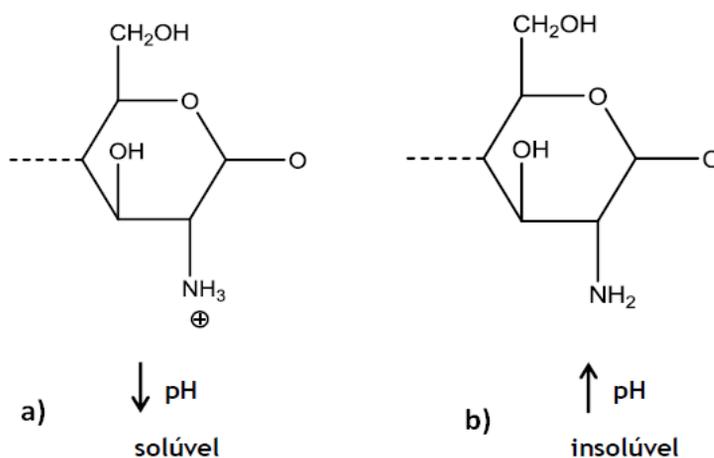
Dentro da gama de nanopartículas estudadas para aplicações biológicas contra o câncer (47-51), as nanopartículas magnéticas possuem grande interesse, uma vez que podem ser revestidas de forma eficiente com polímeros biocompatíveis,

reduzindo um dos problemas mais comuns das sínteses de nanopartículas, a aglomeração (52). Ademais, estes materiais mostram-se também muito eficientes em sistemas de *drug-delivery* (53, 54), na utilização como agentes de contraste de ressonância magnética (55, 56) e ainda, em tratamentos por hipertermia magnética (57), visto que essas partículas absorvem a energia de um campo magnético oscilante, convertendo-a em calor (58).

Durante a síntese desse tipo de nanopartículas, deve-se ter a preocupação em torná-las não-tóxicas, não-imunogênicas e com alta magnetização para que possam ser imobilizadas no tecido alvo. Entre as nanopartículas magnéticas, as de óxido de ferro ou formas oxidadas, são as mais utilizadas para aplicação biológica, devido à versatilidade dos tamanhos, área de superfície efetiva, baixas taxas de sedimentação, fácil difusão tecidual e reduzida interação dipolo-dipolo (58, 59).

Uma estratégia utilizada para otimizar o funcionamento das nanoestruturas metálicas é seu revestimento com polímeros biocompatíveis, como a quitosana, que possui propriedades altamente biocompatíveis, biodegradáveis e não tóxicas (60 - 62), sendo excelentes matrizes para encapsulamento de fármacos (63, 64). A quitosana é um biopolímero hidrofílico obtido a partir da quitina, composto por unidades monoméricas de  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-2-amino-2-desoxi-D-glicose e  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-2-acetamida-2-desoxi-D-glicose (65). As principais fontes naturais de quitina e quitosana encontram-se na carapaça de crustáceos, entretanto, pode ser encontrada também em insetos e na parede celular de fungos. Esse polissacarídeo possui alta hidrofiliabilidade, com cadeia polimérica composta por um grande número de grupos hidroxila e amino, favorecendo sítios de ligação (66).

A solubilidade da quitosana em soluções aquosas ácidas (pH inferior a 6,2) e sua insolubilidade em soluções aquosas neutras ou básicas é uma característica relacionada diretamente a protonação dos grupos amina (Figura 2), dando a este biopolímero um caráter catiônico explorado principalmente para liberação controlada de fármacos (67).



**Figura 2:** Estrutura química da quitosana relacionada a mudanças de pH. Em **a**, a estrutura mostra-se solúvel pela ação do pH acidificado (protonação), e em **b** a estrutura insolúvel em condições de pH neutro ou básico (não protonação). Adaptado de Dash et.al, 2011.

Em estudo *in vivo* de modelo murino de tumor SCC7 de carcinoma de células escamosas, o encapsulamento de PTX em nanopartículas de quitosana modificadas com ácido colânico mostrou uma absorção celular mais rápida, aumentando a solubilidade e aprisionamento do fármaco (68). Um derivado de quitosana mais complexo modificado com mPEG e colesterol (CHO) também

obteve sucesso *in vitro* na síntese com PTX, apresentando citotoxicidade semelhante à PTX livre, mas com capacidade de reduzir a taxa de crescimento tumoral. Esse compósito também mostrou efeito satisfatório *in vivo*, em modelo murino, aumentando a sobrevida de animais inoculados com o tumor CT26 de carcinoma de cólon (69).

Assim, a quitosana é tida como um biopolímero com amplo potencial de uso terapêutico antitumoral (70), principalmente quando pensamos em uma matriz estável para encapsulamento do fármaco PTX. Entretanto, para aumentar a adesão desse transportador às células cancerígenas, modificações na superfície desse sistema são necessárias para garantir a baixa toxicidade às células saudáveis (71). Para este fim, minerais baseados em fosfato de cálcio, dentre os quais a hidroxiapatita, mostram-se como excelentes candidatos. A utilização de APA se deve principalmente às propriedades de baixa toxicidade, biocompatibilidade, alta osteocondutividade, não ser imunogênica, e não possuir atividade inflamatória (72). Dentre estas aplicações, podemos citar o carreamento de drogas (73), o preparo de compósitos com sílica mesoporosa para o tratamento de tumores ósseos (74) e também sua combinação com nanopartículas magnéticas para constituir agentes de hipertermia (75). Nanopartículas de APA possuem excelente adesão às células cancerígenas, proporcionando inclusive redução de volumes tumorais em diferentes linhagens, incluindo câncer de mama, cólon, próstata, fígado e outros (76-82).

Alguns estudos relatam a associação de compósitos de hidroxiapatita e quitosana em nanopartículas menores que 100 nm pelo método de coprecipitação

(83-85), entretanto, pouco se sabe sobre esta combinação com partículas magnéticas para tratamento antitumoral. Portanto, a união das propriedades de APA e quitosana, poderia originar nanopartículas promissoras para sistemas de administração de fármacos direcionados às células tumorais com predomínio de metástases ósseas, visto que essas células possuem alta avidéz por nanocristais de APA (86). Nesse cenário, nosso grupo observou previamente, em ensaio *in vitro*, alguns dos efeitos derivados da combinação de um biopolímero com nanocristais de APA, através do encapsulamento de PTX comercial em nanopartículas de ferrita Mn-Zn (87, 88), sendo fundamental para a compreensão das propriedades físico-químicas do material.

Além disso, os ensaios biológicos prévios indicaram que nanopartículas magnéticas carreadoras de PTX de uso comercial, apresentam forte interação e atividade antitumoral, com alterações morfológicas notáveis em células de câncer de cólon HCT-116. Essas células apresentam aspecto alongado em culturas, devido à adesão à superfície plástica, passando a apresentar aspecto esférico após exposição ao composto contendo PTX, o que indica perda de adesão ou até mesmo morte celular. É importante ressaltar que a adesão celular tem um papel primordial na proliferação e motilidade das células normais e também na metástase das células tumorais, uma vez que a invasividade das linhagens celulares de câncer de cólon são associadas a sua morfologia alongada (89). Ademais, o efeito de nanopartículas à base de Fe em células cancerígenas, incluindo as de cólon, é muitas vezes atribuído a formação de espécies reativas de oxigênio catalisadas por Fe (ROS), desencadeando, por exemplo, autofagia e

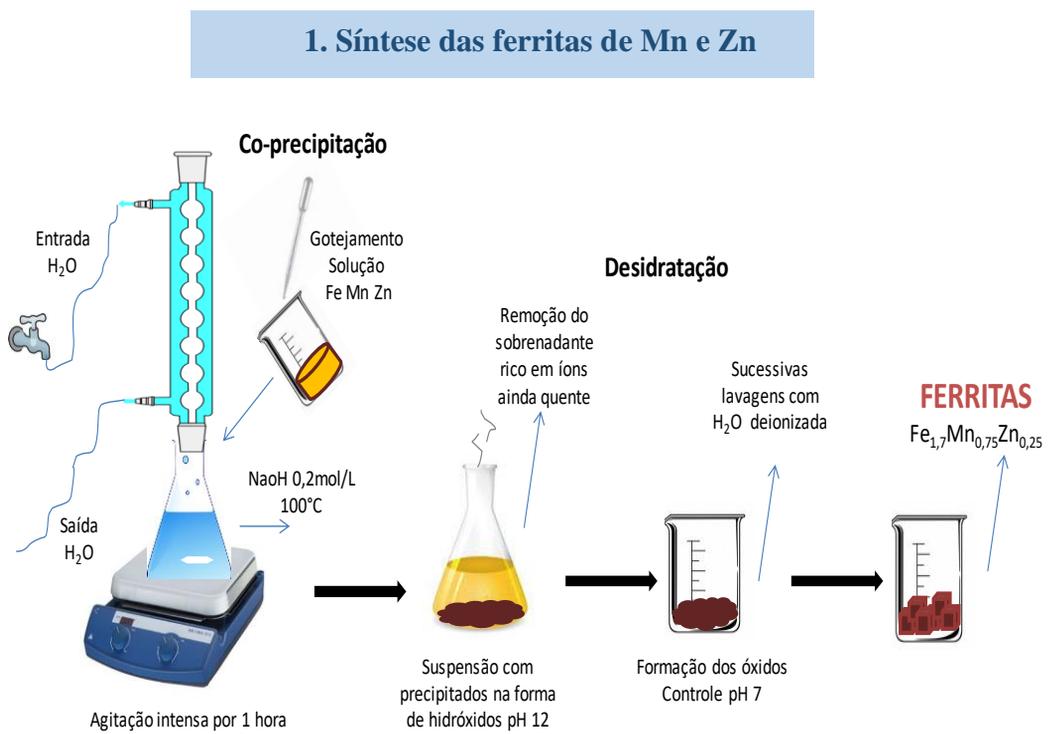
morte celular associada (90, 91). Satisfatoriamente, as nanopartículas não mostraram toxicidade às células saudáveis, como os fibroblastos (ISO 10 993-5) e também, não interagiram com células fagocíticas, como os monócitos (92).

Adicionalmente, esse tipo de nanopartícula pode direcionar o fármaco até o alvo desejado utilizando, por exemplo, um campo magnético externo, e ainda garantir o monitoramento da posição das nanopartículas por gradiômetros ou ressonância magnética. Deste modo, tratamentos de hipertermia magnética usada em combinação com radio e quimioterapia, também podem se tornar praticáveis. Esse efeito otimizado das propriedades magnéticas deve-se à substituição de parte dos íons de  $Fe^{2+}$  (um metal não tóxico), por íons de outros metais, como Mn e Zn, dando origem às nanopartículas de ferrita de Mn e Zn (93).

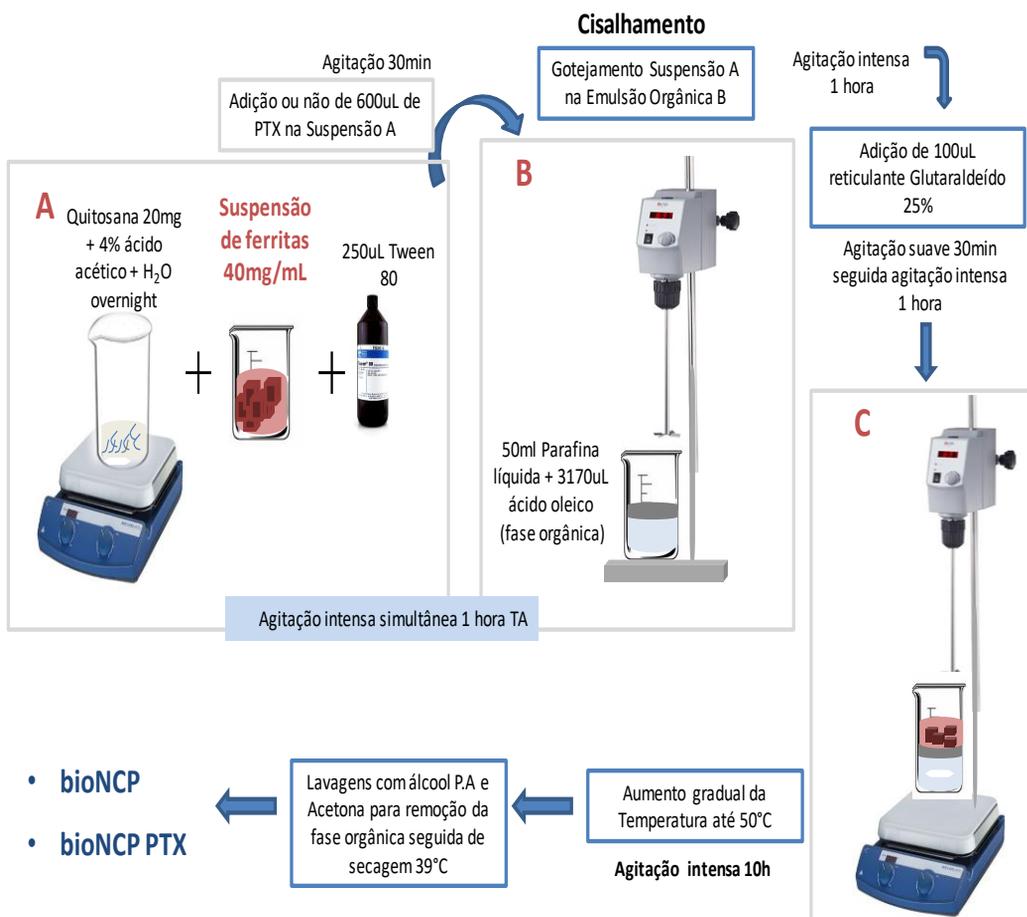
Com base no exposto, hipotetizamos que nanocristais de APA acoplados à superfície de nanopartículas magnéticas de ferrita de Mn-Zn revestidas com quitosana, podem promover o endereçamento de PTX de uso clínico às células tumorais de câncer de próstata devido à afinidade por cálcio, favorecendo a toxicidade do fármaco sem exercer atividade citotóxica às células não tumorais.

## II. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

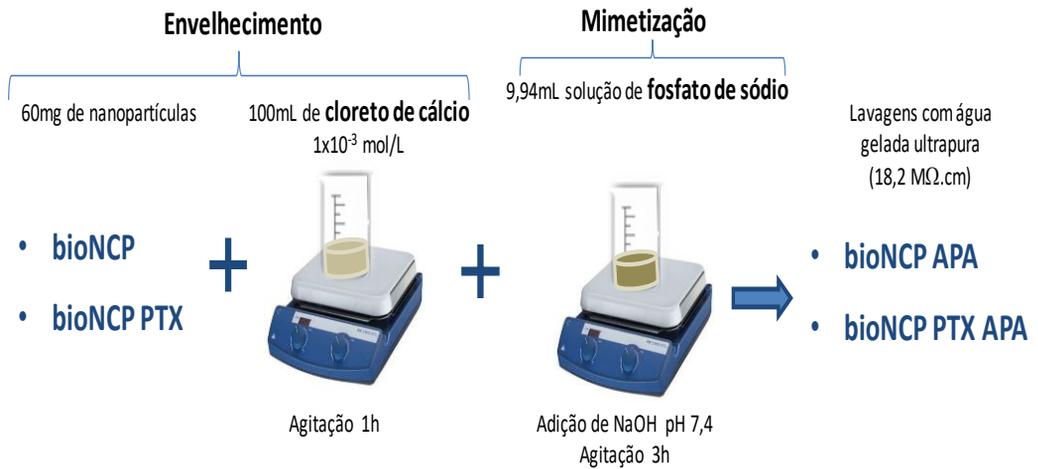
Segue abaixo o esquema representativo do delineamento experimental dividido em 3 etapas de síntese das nanopartículas e suas formulações.



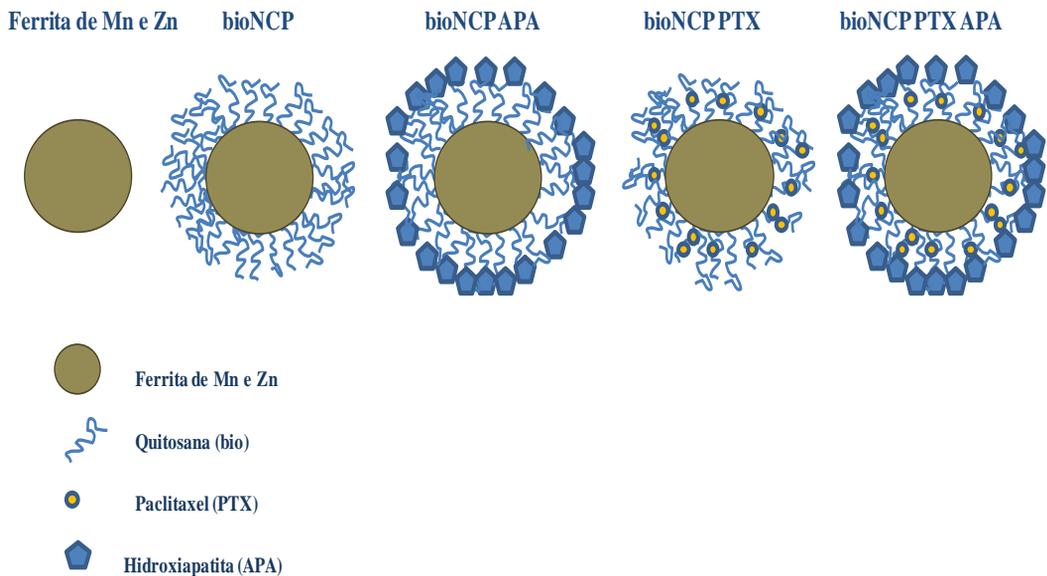
## 2. Síntese polimérica com quitosana e adição de PTX



### 3. Síntese para Revestimento com hidroxiapatita



### Nanopartículas de ferrita de Mn e Zn e suas formulações



### III. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 1. Síntese das nanopartículas de ferrita $\text{Mn}_{0,75}\text{Zn}_{0,25}\text{Fe}_{1,7}\text{O}_4$ por co-precipitação

Modificamos a superfície de nanopartículas de ferrita de Mn e Zn, revestindo-as com quitosana e depositando sobre sua superfície nanocristais de apatita. Para isso, nanopartículas magnéticas de ferrita de Mn e Zn ( $\text{Mn}_{0,75}\text{Zn}_{0,25}\text{Fe}_{1,70}\text{O}_4$ ) foram obtidas pelo método de co-precipitação (87, 93), utilizando-se como sais de partida  $\text{Mn}(\text{NO}_2)_2$ ,  $\text{Zn}(\text{NO}_2)_2$  e  $\text{FeCl}_3$  (Sigma-Aldrich) em 200 mL de solução  $0,2 \text{ mol.L}^{-1}$  de NaOH, previamente aquecidas a  $100^\circ\text{C}$ . A solução dos sais de partida foi gotejada sobre a solução de NaOH, mantida sob condensador com refluxo e em agitação magnética por 1 h. Feito isso, seguimos para a remoção (ainda quente) do sobrenadante rico em íons com o auxílio de ímã magnético e sucessivas lavagens para ajuste de pH próximo à 7. Denominamos o material final obtido de *nanopartículas de ferrita*  $\text{Fe}_{1,7}\text{Mn}_{0,75}\text{Zn}_{0,25}$ .

#### 2. Revestimento polimérico das nanopartículas de ferrita com quitosana

Para revestimento polimérico das nanopartículas de ferrita com quitosana, utilizamos a técnica de dupla emulsão e micelas reversas (94). Para tal, 20 mg de quitosana foram dissolvidos em solução aquosa de ácido acético (4%) overnight e, a esta solução, adicionado 40 mg das nanopartículas de ferrita preparadas

inicialmente (proporção de massa de ferrita/quitosana = 2:1), com adição de 0,25 mL de Tween 80 (tensoativo não-iônico) e agitação por 1 h à temperatura ambiente (T.A). Em seguida, gotejamos a suspensão formada na solução orgânica de óleo de parafina e ácido oleico (tensoativo) na proporção de 16:1 (volume), previamente emulsionada por 1 h à T.A, sob vigorosa agitação em agitador mecânico. Para promover a reticulação da quitosana, adicionamos 0,1 mL de uma solução aquosa de glutaraldeído a 25% e mantivemos sob agitação por mais 1 h. Feito isso, a temperatura foi elevada gradualmente até 50°C e mantida por 10 horas sob agitação mecânica. Em seguida, o sobrenadante foi retirado com auxílio de ímã magnético e as nanopartículas formadas foram lavadas sucessivas vezes com etanol P.A e acetona para remoção dos excedentes e da fase orgânica. Após esse processo, foi realizada a secagem a 39°C em estufa para posterior pesagem e ajuste de massa. O material formado nessa etapa foi denominado *biopolímero-nanocompósito (bio-NCP)*.

### **3. Mimetização das nanopartículas revestidas com hidroxiapatita**

Em seguida, revestimos bio-NCP com nanocristais de hidroxiapatita (APA), utilizando a técnica de mimetização (88). Para isso, 60mg de bio-NCP foram dispersas em 100 mL de solução aquosa de CaCl<sub>2</sub> para promover a adsorção de íons Ca<sup>2+</sup> nos grupos superficiais da quitosana. O tempo referido para este processo foi denominado “tempo de envelhecimento”, ou “*aging time*”, fixado em 1h. Em seguida, adicionamos 9,94mL de ácido fosfórico (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>), mantendo o pH em 7,4 com NaOH, agitando a suspensão a fim de facilitar a reação entre os íons e

os grupos superficiais do polímero e aos íons  $\text{Ca}^{2+}$  já adsorvidos. O tempo dessa reação foi denominado “tempo de mimetização”, sendo fixado em 3h. A proporção de quitosana/hidroxiapatita foi fixada em uma razão mássica = 2 com proporção molar  $\text{Ca/P} = 1,67$ , para mantermos as condições de proporção da hidroxiapatita o mais próximo possível do encontrado biologicamente. Assim, ao final desse processo temos o material denominado de *bio-nanocompósito-hidroxiapatita (bio-NCP-APA)*.

#### **4. Síntese e encapsulamento de PTX nas nanopartículas**

Para a formação do material contendo PTX encapsulado, inseriu-se uma etapa para formação da Suspensão A com a adição de PTX. Em seguida a Suspensão A foi gotejada na fase de Emulsão Orgânica, para formação da Emulsão final em B.

Para isso, uma quantidade suficiente para compor uma nanopartícula com 6% de PTX de uso clínico (relação de massa de ferrita/quitosana) foi adicionado e a suspensão foi mantida sob agitação de 30 min. Após isso, a síntese seguiu o processo até a modificação ou não com nanocristais de apatita, formando-se então os seguintes materiais: *bio-nanocompósito-paclitaxel (bio-NCP-PTX)* e *bio-nanocompósito-paclitaxel-apa (bio-NCP-PTX-APA)*. Todas as nanopartículas foram preparadas sob condições estéreis e caracterizadas física e quimicamente para posterior utilização nos ensaios biológicos a seguir.

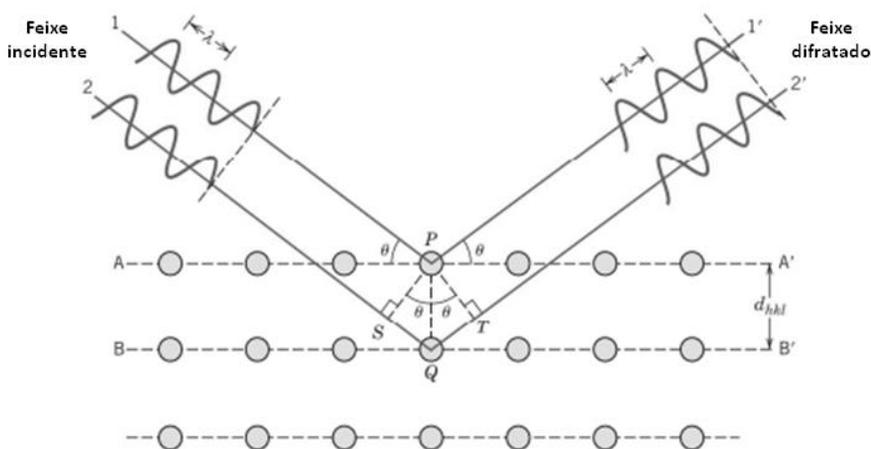
## **5. Quantificação da porcentagem de massa atômica das ferritas por espectroscopia de energia dispersiva de raios-X (EDX)**

Cerca de 5mg de nanopartículas de ferrita secas foram suspensas em isopropanol e agitadas suavemente. Uma gota da suspensão foi adicionada sob um *stub* metálico previamente revestido com uma fina camada de carbono e com uma lamínula de 13mm. O material foi depositado sob a lamínula e metalizado com ouro para posterior mapeamento e quantificação dos elementos químicos presentes, através de análise semiquantitativa feita em microscópio eletrônico de varredura (MEV) (Zeiss EVO LS15), equipado com um detector EDS/EDX (Oxford INCA x-act) da Faculdade de Ciências UNESP-Bauru. A análise consistiu da detecção de ferro, manganês e zinco em 3 regiões da amostra e a comparação das médias das porcentagens destes com o nominal (esperado), durante a síntese.

## **6. Caracterização magnética das ferritas por difratometria de raios-X (DRX)**

As partículas foram caracterizadas mediante difratometria de raios X (DRX) num equipamento Rigaku (Ultima-IV), com fonte de cobre ( $K\alpha_1 = 1,54056 \text{ \AA}$ ), monocromador de grafite pirolítica e goniômetro theta/theta com raio de 285mm, disponível no Departamento de Física e Biofísica do Instituto de Biociências de Botucatu - UNESP. Os dados foram refinados (Rietveld) usando o software Material Studio versão 6.0 para determinação de parâmetro de rede e

crystalinidade. O espalhamento da radiação eletromagnética consiste na interação entre o feixe de raios-X incidente e os elétrons dos átomos componentes de um material (95). Assim, consegue-se detectar os fótons difratados que constituem o feixe difratado, determinando a estrutura cristalina, bem como o tamanho do cristalito de diferentes materiais.

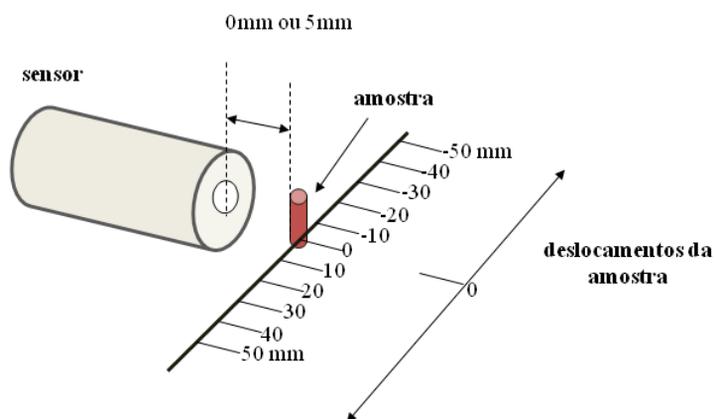


**Figura 3:** Ilustração representativa da Difração de um feixe de raios-X em um cristal. Adaptado de Callister, 2004.

## 7. Caracterização da resposta magnética das ferritas por biosusceptometria de corrente alternada (BAC)

O equipamento utilizado para medidas magnéticas por BAC foi um amplificador da marca Stanford Research Systems, com uma diferença de potencial (ddp) e frequência fixadas em 0,7V e 10kHz, respectivamente. A técnica consiste no deslocamento de amostras de -5,0 cm até 5,0 cm com medição dos sinais a cada variação de 0,5 cm no deslocamento (ver **Figura 4**). Quando um

material com alta suscetibilidade magnética, como as ferritas magnéticas, é aproximado do par de detectores, ocorre o desbalanceamento do fluxo magnético total do sistema. Analisamos três amostras com diferentes proporções de Fe (íon magnético), para definirmos aquela com maior capacidade magnética.



**Figura 4:** Ilustração da técnica de biosusceptometria de corrente alternada (BAC) e respectivo deslocamento da amostra.

## 8. Quantificação de PTX por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) acoplada à espectrometria de massa (LC/MS)

A espectrometria de massas por cromatografia líquida é uma técnica analítica instrumental para análise, de átomos ou moléculas de uma amostra que são ionizados e separados de acordo com a razão massa/carga. A utilização do LC-MS/MS possibilita o controle do íon molecular e de transições iônicas provenientes da fragmentação do mesmo, garantindo a sensibilidade e a especificidade necessárias para a quantificação dos analitos. Para isso, utilizamos

HPLC (UFLC da Shimadzu, equipado com LC20AD, detector triplo quadrupolo da Applied BioSystem, mod.3200 QTRAP e coluna C18). Cerca de 5mg de bioNCP-PTX foi mantida em imersão por diferentes períodos com acetonitrila para extração do fármaco. Após os períodos, as amostras foram filtradas ou centrifugadas para utilização do sobrenadante e identificação da respectiva massa molecular de PTX.

### **9. Quantificação de PTX por espectrofotometria UV-Visível**

Baseia-se em medidas de absorção da radiação eletromagnética, nas regiões visível e ultravioleta do espectro, medindo a quantidade de luz absorvida pela amostra relacionando-a com a concentração do analito de interesse. Os picos de absorbância de PTX encontram-se entre 227nm e 230nm, e para estabelecer a absorbância que seria utilizada fizemos a varredura do espectro em uma concentração de PTX conhecida. Após essa etapa, procedemos a extração de 5mg de bioNCP-PTX em acetonitrila por 24h (96) e centrifugamos a suspensão para retirada do sobrenadante seguida da análise em cubeta de quartzo. A análise foi feita comparando-se os valores de densidade óptica obtidos na curva padrão de PTX de uso clínico com o do sobrenadante de bioNCP-PTX após extração, com leitura em absorbância de 227nm no aparelho de espectrofotometria Biotek (Epoch 2 microplate reader) do Departamento de Microbiologia e Imunologia – Laboratório LABAC UNESP Botucatu.

## **10. Caracterização dos grupamentos funcionais das nanopartículas por espectroscopia de infravermelho (FTIR) com transformada de Fourier**

A caracterização por FTIR foi utilizada para identificação de grupamentos funcionais na superfície das nanopartículas. Esta técnica fundamenta-se nas vibrações moleculares, acompanhada por mudanças no momento bipolar na região do índice de refração (IR), na qual utilizamos intervalo do número de onda de 400 e 4000  $\text{cm}^{-1}$  em um equipamento modelo Nicolet Spectrometer, Nexus 670. Especificamente para bioNCP, puras ou modificadas, as bandas relacionadas aos grupos que contenham óxidos de ferro, manganês e zinco, e as ligações entre carbono, oxigênio e hidrogênio, destacam-se na análise do espectro deste material, podendo-se verificar a efetividade de tratamentos químicos, como por exemplo, a mimetização com hidroxiapatita, bem o encapsulamento de PTX. Para isso, utilizamos a técnica de pastilhamento com brometo de potássio (KBr) de 2mg das amostras e 200mg de KBr macerados em almofariz de ágata (pouca porosidade), seguida da formação de pastilhas por pressão.

## **11. Caracterização da carga superficial e ponto isoelétrico das nanopartículas por zetasizer**

As nanopartículas foram avaliadas em equipamento da Malvern Instruments Inc, o Zetasizer, com colaboração do Instituto de Química da USP – Campus de São Carlos (IQSC-USP). Analisamos a carga superficial (potencial Zeta  $\zeta$ ) e seu comportamento varinado o pH. A técnica baseia-se no espalhamento de luz dinâmico ou DLS, sendo indicado para caracterizar partículas em escala

nanométrica, por medição de mobilidade eletroforética para a determinação do potencial  $\zeta$ . Sendo assim, este método mede quão rápido uma partícula se move em um líquido quando um campo elétrico é aplicado. Assim, conseguimos ter a carga real e mensurar o comportamento de uma partícula sólida em um meio líquido.

## **12. Caracterização morfológica e mapeamento dos elementos químicos das nanopartículas**

Cerca de 5mg de nanopartículas de ferrita secas foram suspensas em isopropanol e agitadas suavemente. Uma gota da suspensão foi adicionada sob um *stub* metálico previamente revestido com uma fina camada de carbono e com uma lamínula de 13mm. O material foi depositado sob a lamínula e metalizado com ouro para posterior mapeamento dos elementos químicos por microscopia eletrônica de varredura (MEV) (num equipamento da FEI, modelo Quanta 200) e Espectroscopia de raios X com energia dispersiva (EDX) (Oxford Inca 250P20). no Centro de Microscopia Eletrônica (CME) do Instituto de Biociências UNESP Botucatu. A análise consistiu da detecção de ferro (Fe), manganês (Mn) e zinco (Zn) representativos do núcleo magnético de ferrita; carbono e cálcio do revestimento com o biopolímero quitosana; cálcio e fosfato como formas de identificação da mimetização com hidroxiapatita.

### **13. Cultura *in vitro* da linhagem tumoral de câncer de próstata LNCaP**

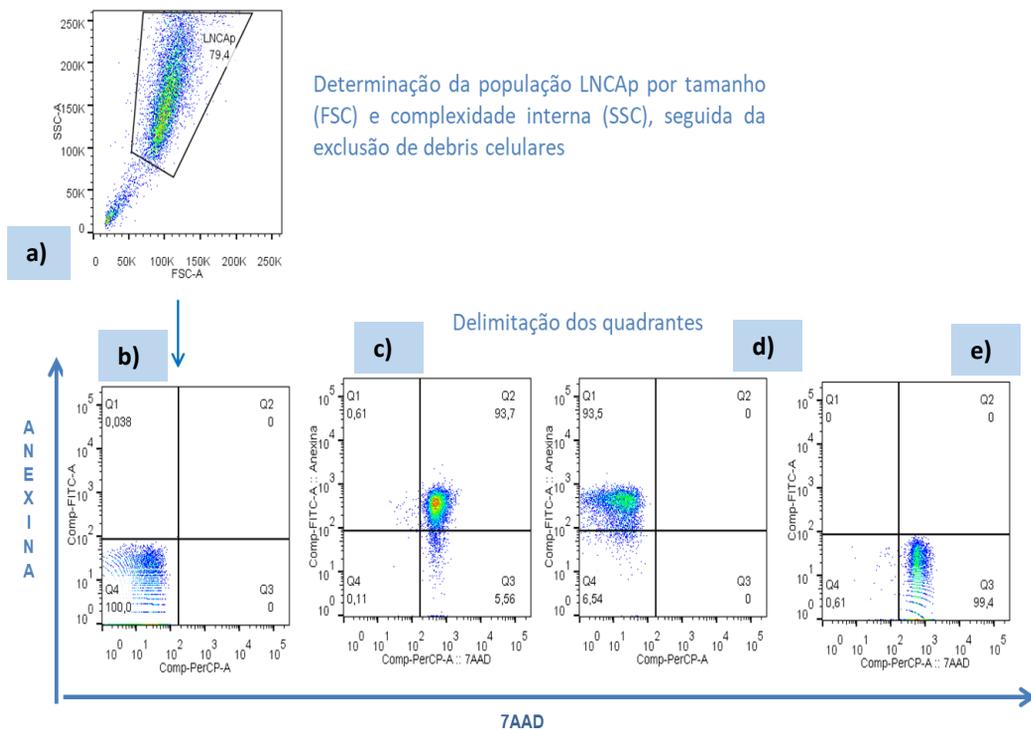
Utilizamos células tumorais da linhagem de adenocarcinoma prostático humano LNCaP (ATCC CRL-1740), validadas pelo Prof. Deilson Elgui de Oliveira, através de análise por PCR (*polymerase-chain reaction*). Essas células foram mantidas em meio de cultura completo [meio RPMI 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), 1% de piruvato de sódio, 1% aminoácidos não essenciais e 25 mM HEPES (Sigma), 1% de antibióticos e antimicóticos (Life Technologies) a 37°C e sob atmosfera de 5% CO<sub>2</sub>, até a formação completa da monocamada celular. As células foram soltas da garrafa com auxílio de tripsina 0,05 % e lavadas em meio completo, seguindo-se o preparo para uso posterior nos ensaios funcionais.

### **14. Determinação da Morte Celular por Citometria de Fluxo**

As células tumorais foram expostas por 24 e 48 horas de tratamento com as nanopartículas (*bioNCP*, *bioNCP PTX*, *bioNCP APA* e *bioNCP PTX APA*) sob a concentração de 150nM, ajustada conforme valor obtido na quantificação de PTX por UV-vis, comparando-se os efeitos com o *Controle negativo* (LNCaP sem tratamento) e somente *PTX* (LNCaP com 150nM de PTX). Após os períodos, as células foram soltas da placa de 12 poços com auxílio de tripsina 0,05 %, recolhidas, lavadas com solução salina (PBS) e centrifugadas. Para reduzir a interferência de partículas agregadas às células na aquisição de eventos, as lavagens foram realizadas com tampão *Rinsing Solution* e as amostras foram filtradas em filtro 0,30um. Ao final, as células foram ressuspensas em 100 µL de

tampão de anexina 10%, seguindo-se marcação com 2,5  $\mu$ L de anexina V marcada com isotiocianato de fluoresceína (FITC) por 15 min à temperatura ambiente ao abrigo de luz. Após, completamos o volume para 200  $\mu$ L com o tampão de anexina V e em seguida adicionamos 3 $\mu$ L de 7-adenosino-actinomicina D (7AAD) (BD Biosciences), marcado com proteína peridina-clorofila (PerCP). A aquisição foi feita no citômetro de fluxo FACS Canto™ II (BD Biosciences) com *software* FACSDiva, sendo os resultados analisados no *software* FlowJo, versão vX.10.6 (Tree Stars Inc.) Células saudáveis (com membrana íntegra) mantêm a fosfatidilserina na camada interna da membrana plasmática, enquanto células que entram em apoptose, passam a expô-la na superfície externa. Assim, a anexina conjugada com isotiocianato de fluoresceína (FITC) consegue marcar células em apoptose inicial. O 7AAD conjugado em PerCP, por sua vez, é um intercalante de DNA, que atinge o ácido nucleico de células cuja membrana está perfurada ou rompida e, portanto, marca células em apoptose tardia ou necrose.

A combinação desses marcadores permite que façamos a diferenciação entre células em estágio apoptose inicial (anexina V positiva, 7AAD negativo), e células mortas por apoptose tardia ou necrose (anexina V positiva, 7AAD positivo) e ainda, reconhecer a população de células viáveis (anexina V negativo, 7AAD negativo). A **Figura 5** mostra a estratégia de aquisição e análise dos dados de morte celular.



**Figura 5:** Gate de análise para ensaio de Morte Celular. Em **a**, a população de interesse por tamanho (FSC) e complexidade interna (SSC); na figura **b**, o quadrante Q4 relaciona-se a população viva/não marcada; em **c**, o quadrante Q2 mostra a população duplo positiva para anexina/7AAD; em **d** e **e**, população positiva para anexina e positiva para 7AAD, respectivamente.

## 15. Caracterização morfológica da interação das nanopartículas com as células tumorais

Após o contato com os nanopartículas por 24 e 48 horas, as células foram lavadas com PBS e fixadas com solução de glutaraldeído. O processamento das células em lamínula consistiu inicialmente da desidratação dupla em soluções de concentração crescente de etanol por 10 min (7,5% 15%, 30%, 50%, 70%, 90% e

100%) e secagem em condições acima do ponto crítico (secagem supercrítica) em atmosfera de CO<sub>2</sub>. Então, as lamínulas foram então metalizadas com ouro (Au) e analisadas quanto a alterações morfológicas superficiais por microscopia eletrônica de varredura (MEV) (num equipamento da FEI, modelo Quanta 200) do Centro de Microscopia Eletrônica (CME) do Instituto de Biociências UNESP Botucatu.

## **16. Ciclo celular da linhagem tumoral de câncer de próstata LNCaP**

Para verificar se o tratamento combinado interfere no ciclo celular, as células da linhagem LNCaP foram cultivadas e tratadas com as nanopartículas por 24 e 48 horas. Após tratamentos, as células foram tripsinizadas, lavadas com PBS e centrifugadas a 1500rpm por 5 minutos. O *pellet* foi ressuspenso e fixado sob agitação com etanol 70% a 4°C e mantido em freezer por 1h. Após a fixação, os tubos foram centrifugados e lavados com 2mL de PBS-BSA (0,5%). Após nova centrifugação, as células fixadas foram marcadas com solução de iodeto de propídeo (PI) (50µg/mL) e RNase A (10mg/mL), para o volume final de 100µL, por 1h a 37°C. Após incubação, as células foram adquiridas em citômetro de fluxo *FACSCanto™ II (BD Biosciences)* com software *FACSDiva (BD Biosciences)*. A porcentagem de células nas fases do ciclo celular G0/G1, S e G2/M foi determinada usando o *software FlowJo, versão vX.10.6 (Tree Stars Inc.)*.

## **17. Determinação da Viabilidade celular de pró-osteoblastos MC3T3 por MTT**

Com o objetivo de avaliar a toxicidade dos compósitos sobre células não tumorais ávidas por Ca, optamos por investigar seu efeito sobre a viabilidade de células pro-osteoblasto murinas da linhagem MC3T3. Após tratamentos dos pró-osteoblastos por 24 ou 48 horas de exposição às nanopartículas, retirou-se o meio contido nos poços e adicionou-se a solução de MTT à concentração de 1mg/mL. Após adição, a placa de 96 poços foi mantida por 3 horas em estufa de Co<sub>2</sub>. Após 3 horas, o meio contendo a solução de MTT foi retirado dos poços e adicionado 0,1mL de álcool absoluto, seguida da leitura em espectrofotômetro à 570nm. A análise foi feita com base nas absorbâncias obtidas comparadas com o grupo sem tratamento. Foram realizadas 6 repetições do ensaio em triplicata.

## **18. Análise estatística**

Os dados parciais foram submetidos ao teste de análise de variância seguida de *One-way* ANOVA com *post-test* de Tukey, considerando-se significativas as diferenças com menos de 5% de probabilidade de erro ( $\alpha \leq 0.05$ ).

## IV. RESULTADOS

### 1. Porcentagem de massa atômica das ferritas próxima ao valor nominal

A porcentagem de massa atômica demonstrada nos resultados a seguir foram obtidas quantificando-se 3 regiões (A, B e C) de uma mesma amostra. Assim, conseguimos comparar a massa nominal que foi adicionada no momento inicial da síntese das ferritas, com o produto final ferrita  $Mn_{0,75} Zn_{0,25}Fe_{1,7}$ . Os resultados apresentados na **Tabela 1**, mostram os valores obtidos por espectroscopia de energia dispersiva de raios-X (EDX), em ensaio quantitativo, onde observamos as médias nominais para os elementos químicos Mn, Fe e Zn muito próximas da amostra de nanopartículas de ferrita produzida.

**Tabela 1: Média da % atômica de Mn, Fe e Zn da amostra de ferrita produzida comparada com o nominal (esperado)**

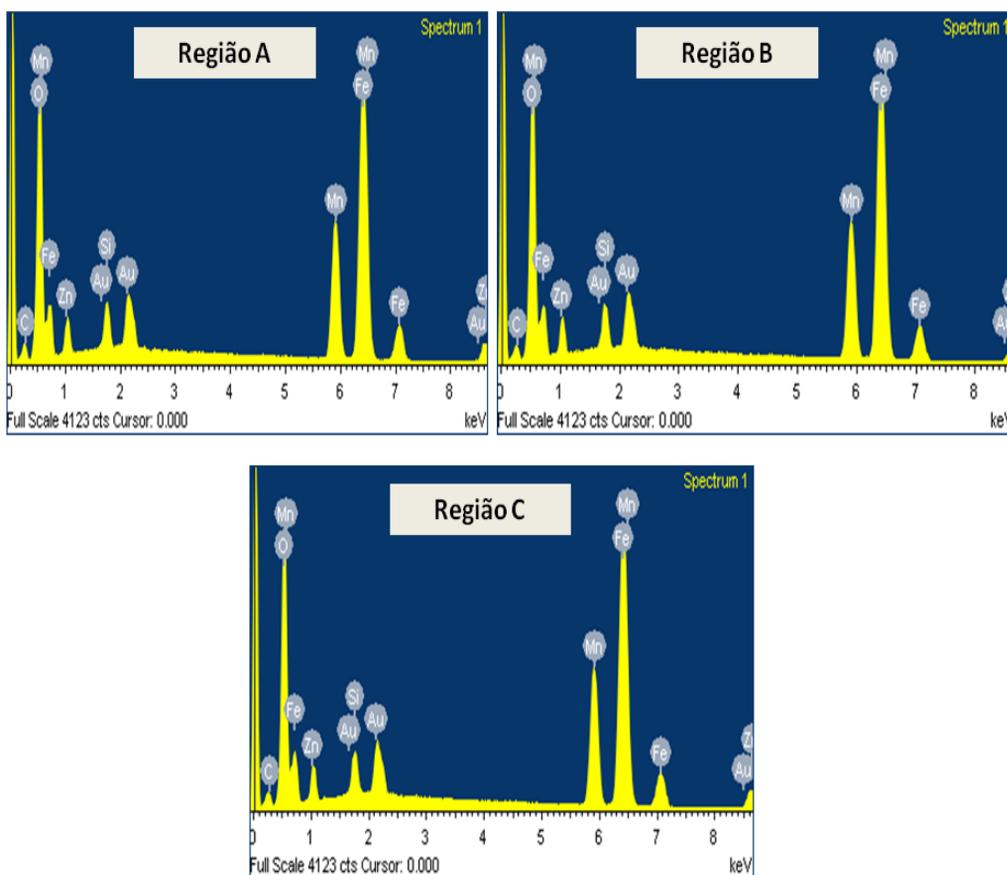
Element	App Conc.	Intensity Corrn.	Weight%	Weight% Sigma	Atomic%
Mn K - A	39.70	0.9893	26.51	0.20	27.26
Mn K - B	39.40	0.9893	26.30	0.20	27.06
Mn K - C	40.30	0.9895	26.57	0.20	27.33
Fe K - A	96.22	1.0155	62.59	0.26	63.32
Fe K - B	96.40	1.0155	62.70	0.26	63.44
Fe K - C	96.94	1.0158	62.26	0.25	63.00
Zn K - A	14.82	0.8984	10.90	0.25	9.42
Zn K - B	14.96	0.8985	11.00	0.25	9.51
Zn K - C	15.40	0.8988	11.18	0.25	9.67
Totals			100.00		

Elemento	Mn	Fe	Zn
Nominal $Mn_{0,75} Zn_{0,25}Fe_{1,7}$	27,78	62,96	9,26
Média da % Atômica das Regiões A B C Amostra ( $Mn_{0,75} Zn_{0,25}Fe_{1,7}$ )	27,22	63,25	9,53

Para detectarmos os elementos químicos presentes na amostra de ferrita, realizamos um espectro mapeando a distribuição bem definida de elétrons dos átomos de interesse (**Figura 6**). Para isso, um feixe de elétrons foi bombardeado para remover dos átomos um elétron do seu nível de energia, promovendo sua desestabilização orbital. Para que ocorra novamente a estabilização dos átomos, um elétron de órbita de maior energia preenche o vazio deixado pelo elétron removido pelo feixe. Nesse processo, o excesso de energia é emitido como fóton de raio-X e lido em linhas características dos números atômicos de cada elemento químico. Dessa forma, é possível identificar cada elemento emissor de energia.

Deve-se notar que os demais elementos que constam no mapeamento, como por exemplo o ouro (Au), são decorrentes do próprio processo de metalização das amostras. Também se observa presença de silício (Si), decorrente da composição dos eletrodos do equipamento.

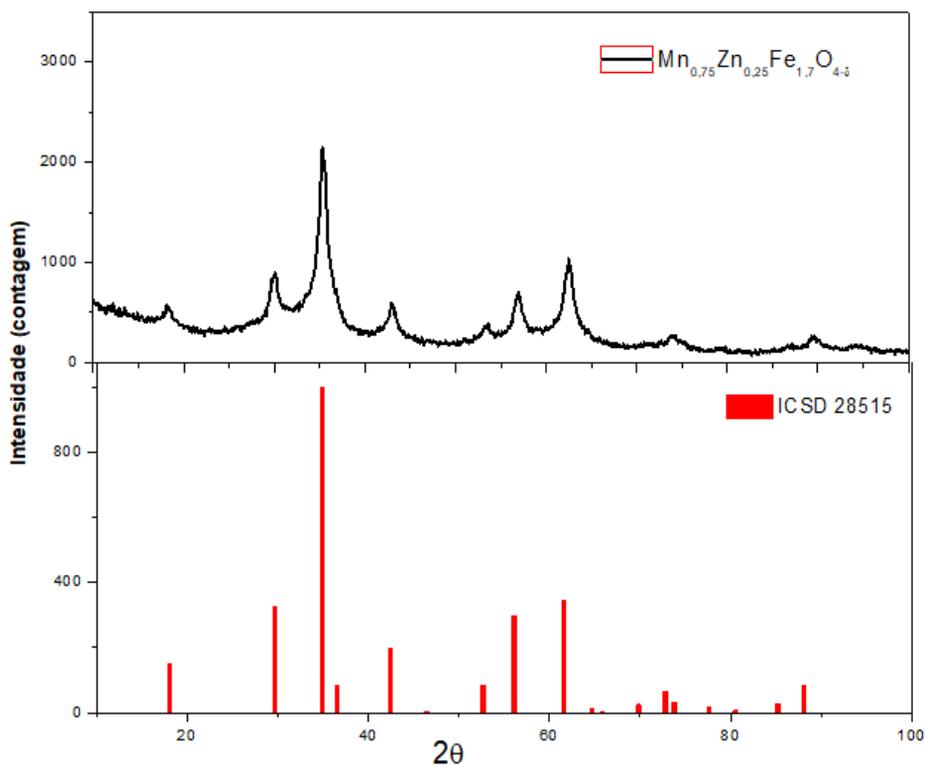


**Figura 6:** Mapeamento dos elementos químicos nas Regiões A, B e C da amostra de ferrita, indicando a presença de Fe, Mn e Zn com homogeneidade da amostra.

## 2. Padrão de difração de ferritas magnéticas monofásicas

As fases cristalinas das nanopartículas de ferrita foram investigadas por difração de raios-X (DRX). Todos os refinamentos estruturais foram realizados pelo método de Rietveld utilizando o pacote de software GSAS (LARSON e VON DREELE, 2004) com parâmetros de entrada obtidos no “*Inorganic Crystal Structure Database*” (ICSD). Na **Figura 7** são mostrados os difratogramas da amostra sintetizada bem como o padrão característico da ferrita de manganês e

zinco baseado no arquivo ICSD 28515. Pode-se notar que a amostra é considerada monofásica devido aos picos comparativos e característicos elevados muito similares ao encontrado no padrão de ferritas em espinélio, apresentando algumas pequenas interferências na linha de base. Este fenômeno é considerado comum em amostras contendo ferro devido à irradiação por cobre da metodologia.



**Figura 7:** Dados obtidos de DRX da ferrita amostral (preto) e a comparação com a esperada em ICSD 28515 (vermelho).

O pico máximo observado na ferrita amostral (preto), relaciona-se ao grau de cristalinidade da amostra que foi diretamente proporcional ao tamanho do

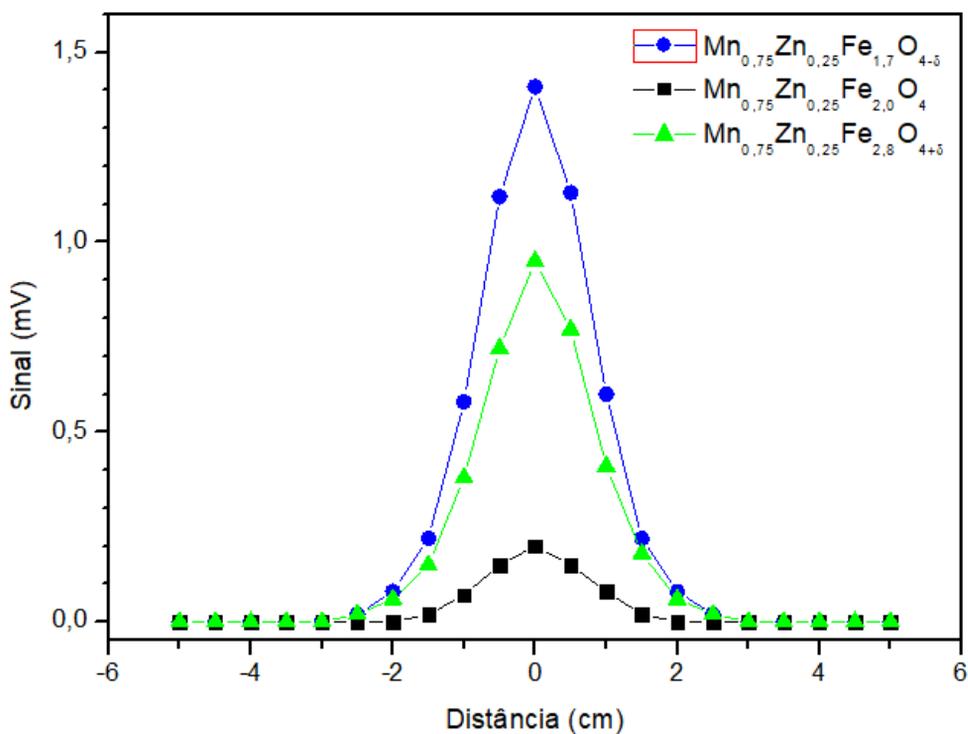
crystalito. A **Tabela 2** mostra exatamente os valores obtidos para a síntese com duração de 60min, submetida à concentração de NaOH de 0,2mol/L para precipitação dos óxidos. O Rwp (6,76%), e o parâmetro de rede, são fatores estabelecidos da DRX que refletem o melhor progresso do refinamento do cristal, sua expressão analítica envolve as intensidades calculadas e observadas.

**Tabela 2: DRX após refinamento do cristal de ferrita simulando os parâmetros adotados durante a síntese por co-precipitação.**

Descrição	Tempo (min)	[NaOH] (Mol/L)	Tamanho Cristal (Å)	RWP (%)	Parâmetro de rede (Å)
Mn <sub>0,75</sub> Zn <sub>0,25</sub> Fe <sub>1,7</sub>	60	0,20	86,9097	6,76	8,4304

### 3. Resposta magnética para diferentes proporções de Fe

Após a análise de três amostras de ferritas magnéticas com diferentes quantidades de ferro por DRX, verificamos por biosusceptometria de corrente alternada (BAC) a influência da quantidade de ferro na resposta magnética destas nanopartículas em temperatura ambiente. Os dados da **Figura 8** mostram que a nanopartícula de ferrita com Fe<sub>1,7</sub> possui maior sinal magnético em resposta a um campo elétrico do que as demais no ponto 0.



**Figura 8:** BAC das ferritas com variação nas quantidades de Fe e suas respectivas respostas magnéticas, demonstrando que Fe em menores quantidades apresentam maior suscetibilidade.

#### 4. Eficiência de encapsulamento de paclitaxel

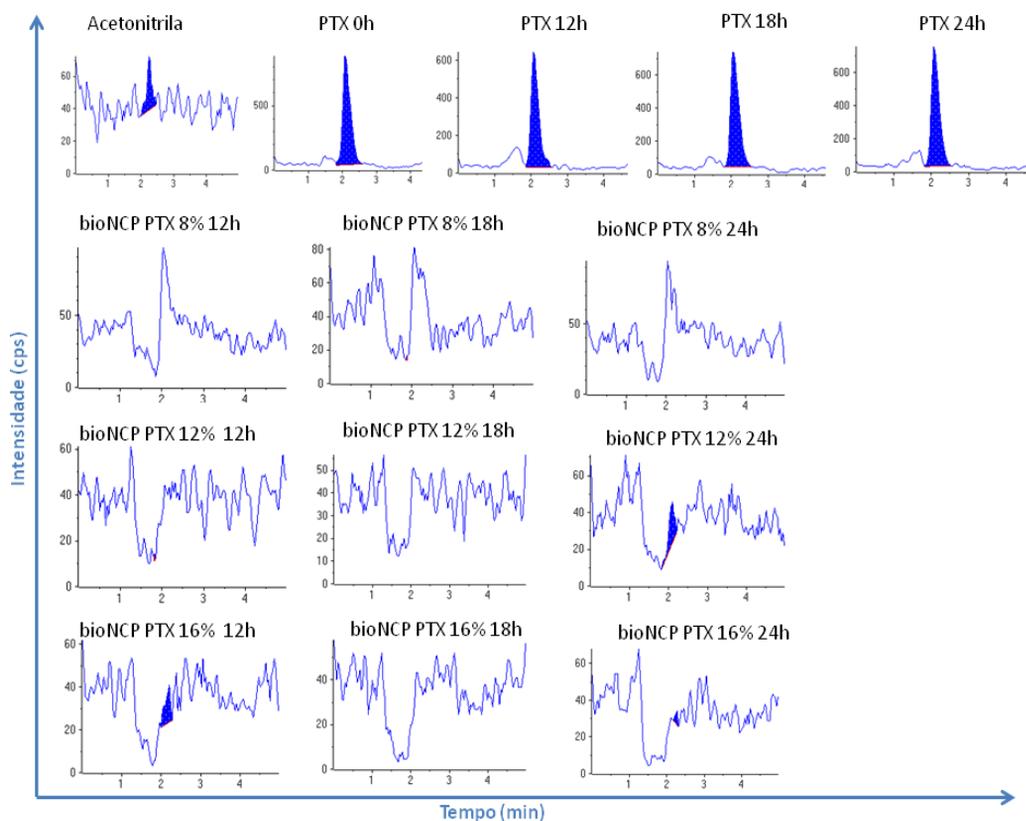
Os métodos analíticos encontrados na literatura para extração e quantificação de PTX estão relacionados à cromatografia e diante disto, inicialmente fizemos a extração de paclitaxel por essa técnica em 3 períodos diferentes (12 horas, 18 horas e 24 horas) em acetonitrila (grau HPLC) das nanopartículas bio-NCP-PTX. Após cada período foi realizada leitura em equipamento de LC/MS para detecção da massa molecular de PTX.

Os dados apresentados na **Tabela 3** mostram que não foi possível a detecção do fármaco utilizando esta metodologia, quando comparamos os dados das nanopartículas (N/A) com os valores padrão de PTX puro para 0 hora, 12 horas, 18 horas e 24 horas de extração, e ainda, com o respectivo controle de acetonitrila.

**Tabela 3: Quantificação de PTX por LC/MS após extração em acetonitrila**

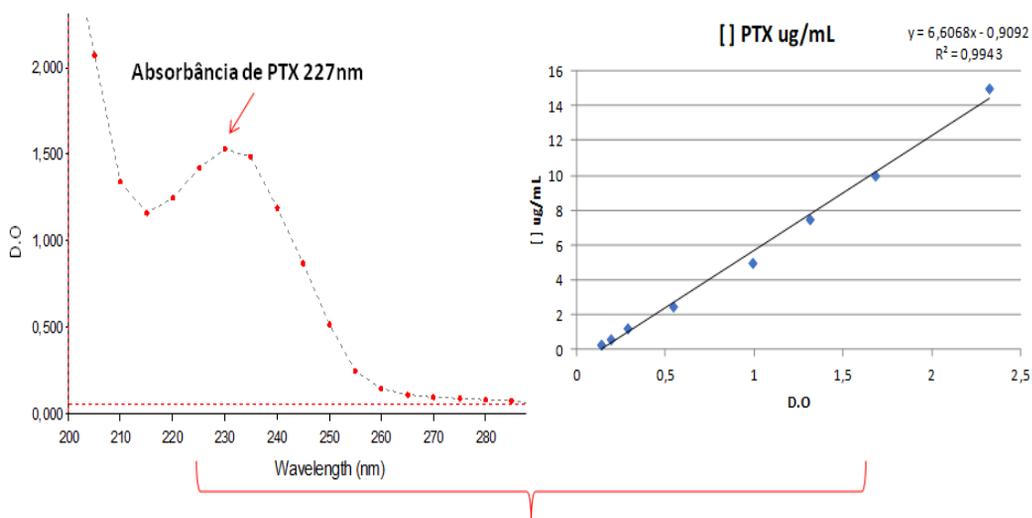
Amostra	Cálculo Concentração (ug/mL) ou ppm	Analyte RT
Branco (acetonitrila)	0.000	2.25
PTX 0h	0.485	2.08
PTX 12h	0.323	2.08
PTX 18h	0.402	2.05
PTX 24h	0.386	2.08
bioNCP PTX 8% (F/Q) 12h	N/A	0.00
bioNCP PTX 8% (F/Q) 18h	N/A	1.89
bioNCP PTX 8% (F/Q) 24h	N/A	2.70
bioNCP PTX 12% (F/Q) 12h	N/A	1.82
bioNCP PTX 12% (F/Q) 18h	N/A	2.46
bioNCP PTX 12% (F/Q) 24h	N/A	2.09
bioNCP PTX 16% (F/Q) 12h	N/A	2.20
bioNCP PTX 16% (F/Q) 18h	N/A	2.35
bioNCP PTX 16% (F/Q) 24h	N/A	2.27

Apesar de amplamente utilizada e muito sensível, a cromatografia por LC/MS não foi capaz de detectar os picos característicos da massa de PTX no sobrenadante das nanopartículas (**Figura 9**).



**Figura 9:** Picos de caracterização de PTX puro nos grupos controles (0h, 12h, 18h, 24h) e nas nanopartículas após extração em acetonitrila obtidos por LC/MS, em 12, 18 e 24h de extração.

Dessa forma realizamos o mesmo procedimento de extração por 24h em acetonitrila, seguida da centrifugação e coleta do sobrenadante para análise em UV-visível com comprimento de onda de 227nm em cubeta de quartzo (**Figura 10**).



PTX obtido =  $5,87 \text{ ug/mL} \times \text{diluição (5)} = 29,3 \text{ ug}$  em 5mg de bioNCP PTX

PTX esperado = 100% do ptx adicionado na síntese inicial, correspondente a 5mg de bioNCP PTX = 343ug

$$\text{Eficiência de encapsulamento} = \left( \frac{\text{PTX obtido}}{\text{PTX esperado}} \right) \times 100 \rightarrow \left( \frac{29,3 \text{ ug}}{343 \text{ ug}} \right) \times 100 \rightarrow \text{8,5\% de PTX em 5mg de bioNCP PTX}$$

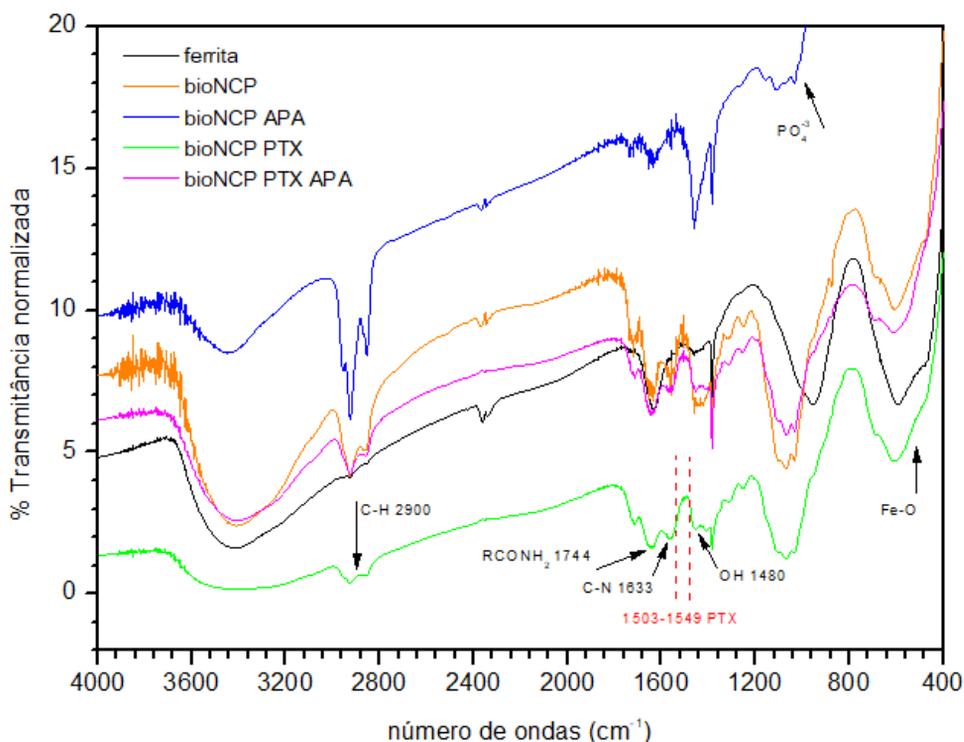
**Figura 10:** Quantificação de PTX por UV-visível após extração em acetonitrila.

Os resultados indicaram que houve a incorporação de cerca de 8,5% de fármaco a cada 5mg de nanopartículas, correspondendo a 29,3ug de PTX. A concentração de trabalho utilizada nos experimentos de morte celular foi baseada no ensaio de citotoxicidade de PTX para células de câncer de próstata LNCaP do nosso grupo (97).

## **5. Análise dos grupamentos funcionais como forma de verificação das etapas de síntese**

Na **Figura 11** são mostrados os espectros de FTIR para as nanopartículas e suas diferentes etapas de síntese. As setas indicando a banda em  $2900\text{ cm}^{-1}$  são atribuídas às ligações C-H, enquanto a banda em  $1744\text{ cm}^{-1}$  atribuída aos radicais amida do biopolímero quitosana. Já a banda em  $1633\text{ cm}^{-1}$  refere-se à vibração correspondente a ligação C-N devido à formação de bases de Schiff durante o processo de reticulação com glutaraldeído (98).

Apesar da região estreita no final do espectro, a banda em aproximadamente  $565\text{ cm}^{-1}$  pode ser atribuída ao estiramento das ligações Fe-O característica das ferritas. As etapas iniciais tanto de preparação das ferritas por co-precipitação, quanto do revestimento polimérico com quitosana e sua reticulação, mostram-se satisfatórias, assim como o encapsulamento de PTX de acordo com a banda  $1503\text{ a }1549\text{ cm}^{-1}$  em vista da identificação dos grupos funcionais característicos. A etapa seguinte, de mimetização com hidroxiapatita, mostra-se um pouco mais difícil para identificação, devido à presença dos grupos hidroxila OH e amina  $\text{NH}_2$  do polímero. Adotamos a banda do grupo fosfato entre  $1100\text{ e }800\text{ cm}^{-1}$ , usada para verificar a eficiência de adsorção de cálcio



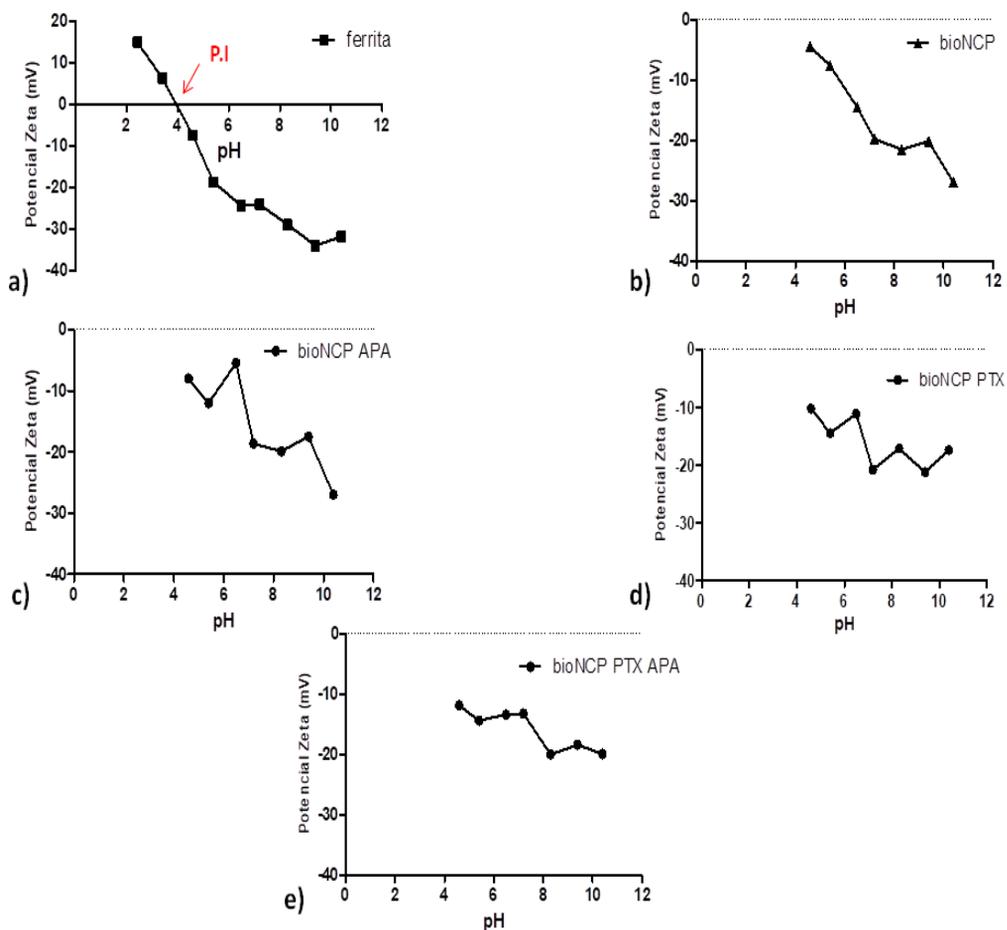
**Figura 11:** FTIR das nanopartículas e suas etapas de síntese para identificação de grupos funcionais. A seta na linha azul identifica o possível grupamento fosfato (mimetização com APA) e as setas na linha verde indicam respectivamente, ligações C-H, quitosana (amina e OH), reticulação com glutaraldeído, PTX e Fe.

## 6. Carga elétrica superficial nas nanopartículas e seu comportamento em alterações de pH

Pensando em aplicações biológicas, a importância de estudarmos o comportamento das cargas superficiais de partículas não está apenas relacionada a sua dispersão em um meio líquido, mas também em saber qual carga a partícula assume frente a alterações de pH, principalmente entre 7,2 e 7,4 (pH fisiológico) e

pH mais ácido entre 4,0 e 6,0 (microambiente tumoral). O PI para a nanopartícula de ferrita (**a**) ocorre em pH 4,0 e ao acidificar ainda mais esse pH a partícula assume cargas positivas. Observamos a mesma tendência nas demais partículas (**b**, **c**, **d**, **e**) sob o mesmo pH e ressaltamos o comportamento mais próximo das cargas positivas em bioNCP (**b**), partícula que tem seu revestimento polimérico catiônico ideal em pH acidificado. O conhecimento das cargas superficiais dos elementos utilizados durante a síntese auxilia não só nos processos químicos, mas também na compreensão dos efeitos biológicos. As nanopartículas possuem carga superficial -20mV em pH fisiológico e aproximadamente -10mV em pH similar ao microambiente tumoral (mais ácido) (**Figura 12**).

Nota-se no resultado obtido para essa partícula (**e**) que a carga superficial -10mV comporta-se da mesma forma tanto no pH fisiológico, quanto em pH ácido, revelando que a mimetização com hidroxiapatita mantém de certa forma a estabilidade das cargas frente a alterações no pH.

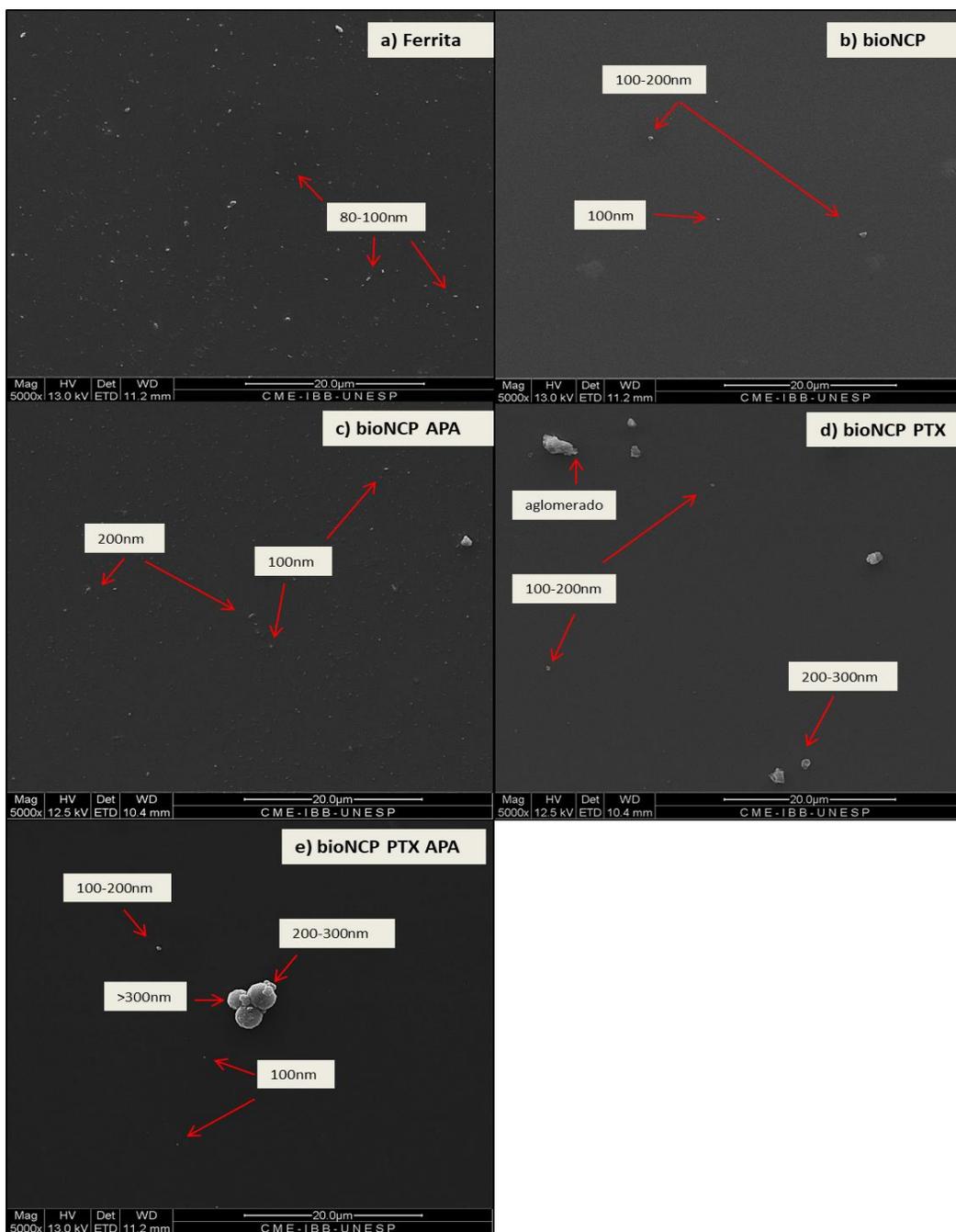


**Figura 12:** Potencial zeta e PI das nanopartículas magnéticas e as condições de pH.

## 7. Morfologia das nanopartículas

Os resultados obtidos para a verificação da morfologia das nanopartículas e suas devidas etapas de síntese são mostrados na **Figura 13**. Para as nanopartículas de ferrita (Figura 13-a) obtivemos cristais de tamanho médio de 80-100nm ainda que seja possível observar nanopartículas menores. Na Figura 13-b, observamos o aumento do tamanho das partículas devido o revestimento com o biopolímero quitosana, revelando a eficiência do método e também a variação no tamanho médio (partículas entre 100nm e 200nm). Em 13-c, as

nanopartículas recebem uma fina camada de hidroxiapatita, no entanto esse processo não levou a grandes alterações no tamanho médio das partículas, mas preservou a heterogeneidade visando resposta imunológica não direcionada. Já em 13-**d**, a adição do fármaco de uso clínico paclitaxel promoveu o aumento considerável das partículas, variando de 100 até 300nm. Observamos ainda, a formação de alguns aglomerados de partículas que podem ter sido originados devido a interação das cargas dos elementos. Observamos os mesmos achados na Figura 13-**e** para a formação da partícula completa bioNCP PTX APA, com a heterogeneidade no tamanho das partículas e a interação entre as cargas.

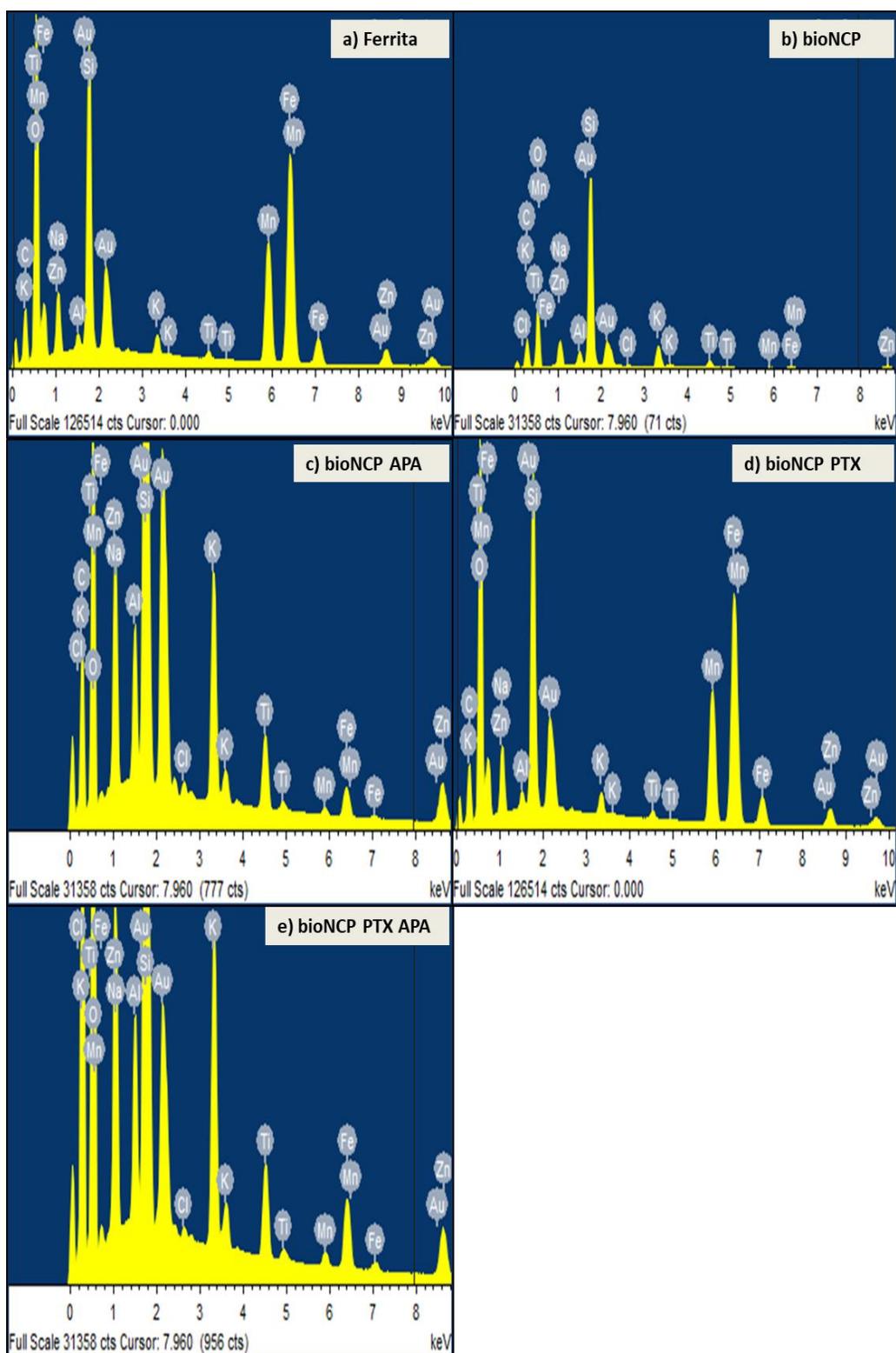


**Figura 13:** Morfologia das nanopartículas. Em (a), ferritas com tamanho de 80-100nm; em (b), nanopartículas bioNCP com tamanho de 100-200nm; em (c), as nanopartículas revestidas com fina camada de hidroxiapatita (bioNCP APA); já em (d), a adição de PTX promoveu aumento do tamanho 100-300nm e a presença de aglomerados; e (e), a partícula completa bioNCP PTX APA com características próximas do observado em (d).

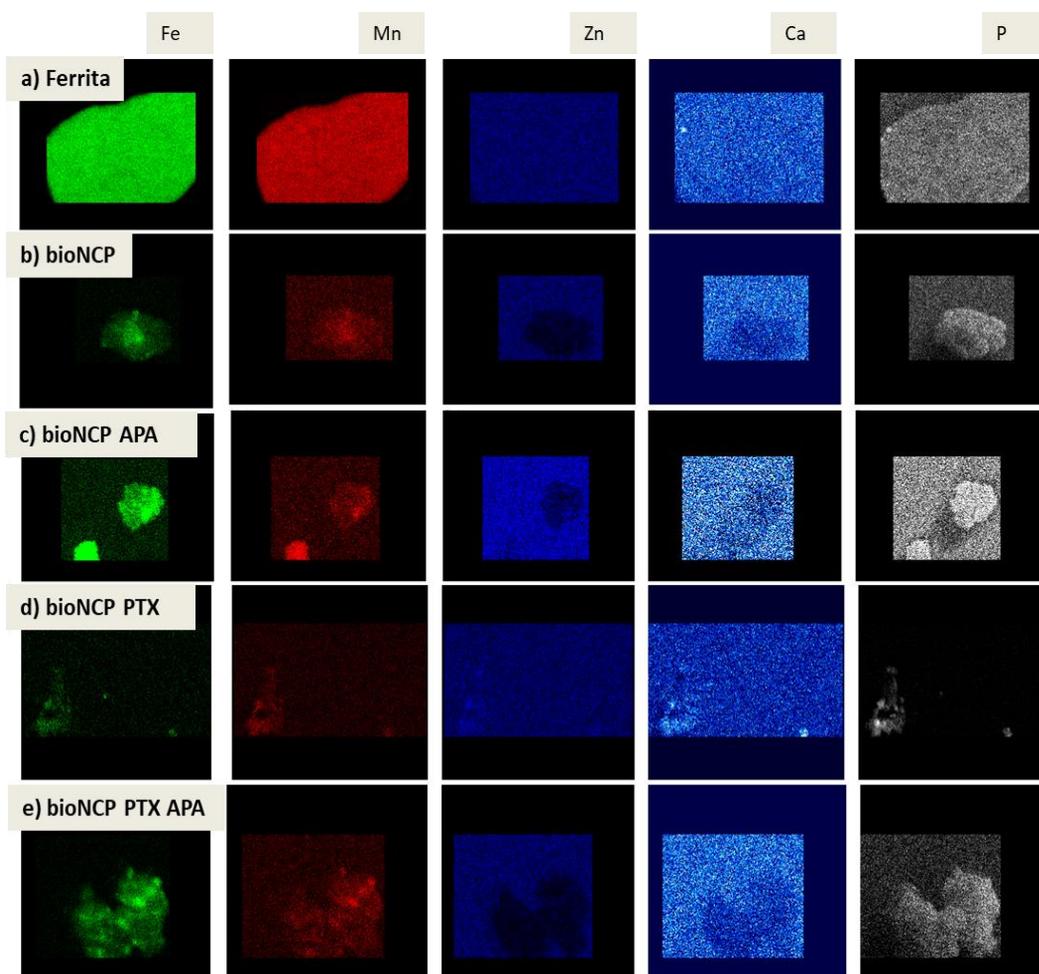
## 8. Mapeamento e contraste dos elementos químicos das nanopartículas

Na **Figura 14**, observam-se os referentes espectros de mapeamento dos elementos químicos presentes nas nanopartículas, como Fe (ferro), Mn (manganês) e Zn (zinco), característicos das ferritas. Observamos ainda, elementos como Au usado na metalização de partículas magnéticas, Al (alumínio) presente no *stub* metálico, Si (silício) e Ti (titânio), referentes a elementos do equipamento, o C (carbono) presente na fita de adesão do *stub* e também Na (sódio), Cl (cloro) e K (potássio) decorrentes de materiais da síntese.

Nota-se num primeiro momento, que não foi possível a detecção dos espectros dos elementos Ca (cálcio) e P (fósforo) nas partículas revestidas com hidroxiapatita (APA). No entanto, na **Figura 15** é possível visualizarmos o contraste dos elementos mapeados, principalmente nos que apresentam Ca (azul claro) e P (cinza) mais expressivo, seguindo-se os contrastes em verde para Fe, vermelho para Mn, azul escuro para Zn. É importante ressaltarmos que a técnica possui limitações de detecção, pois o feixe de elétrons que incide sobre a amostra necessita de uma área amostral de cerca de 2 $\mu$ m. Sendo a maioria das nossas partículas menores, optamos por mapear estruturas que estivessem agregadas, utilizando uma magnitude de 5000x.



**Figura 14:** Espectros dos elementos químicos encontrados nas nanopartículas. Notar os principais elemento Fe, Mn e Zn presentes nas nanopartículas.



**Figura 15:** Contraste dos elementos químicos encontrados nas nanopartículas. Embora a técnica apresente limitações, nota-se a presença dos elementos característicos das ferritas estudadas (Fe, Mn e Zn), com destaque para a detecção de fosfato como indicativo de revestimento com hidroxiapatita em **15-c** e **15-e**, sugerido também pelo contraste de cálcio.

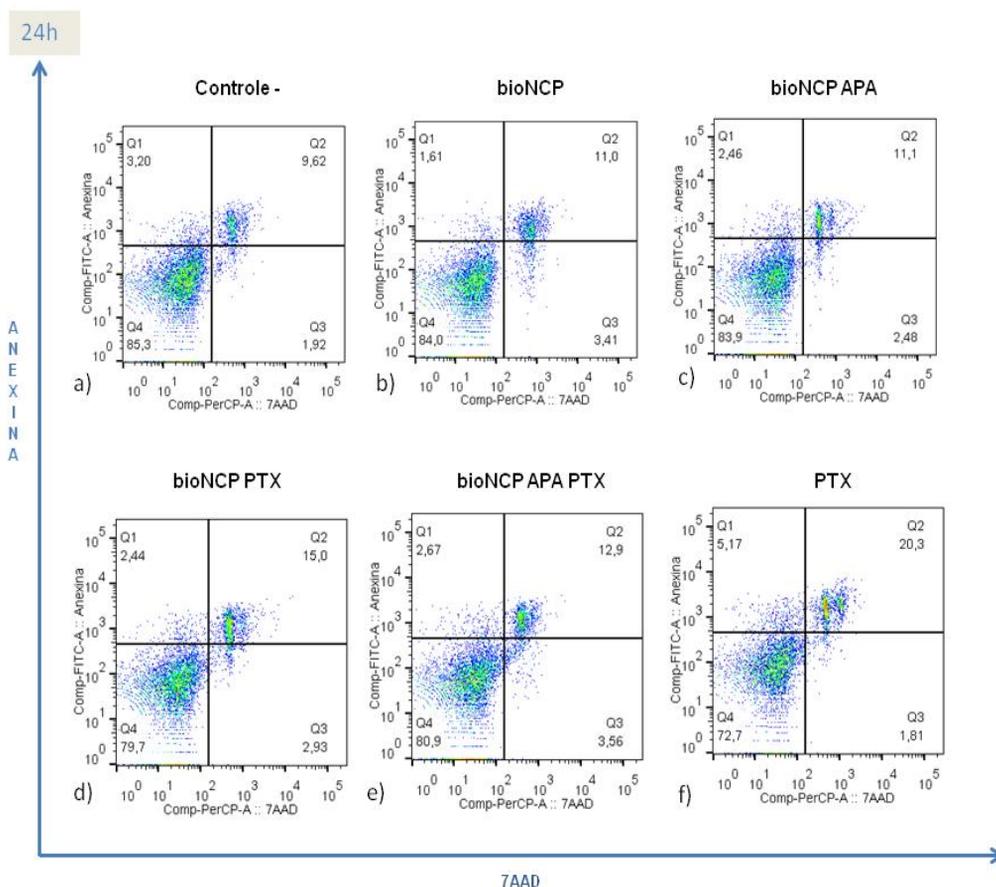
## 9. A Morte celular mediada pelo endereçamento de paclitaxel em nanopartículas magnéticas de Fe, Mn e Zn

Os resultados dos tratamentos com as nanopartículas em suas diferentes combinações foram obtidos por citometria de fluxo de células marcadas com anexinaV/7AAD (n=6), com aquisição de 10.000 eventos. A anexina V conjugada

liga-se à fosfatidilserina.

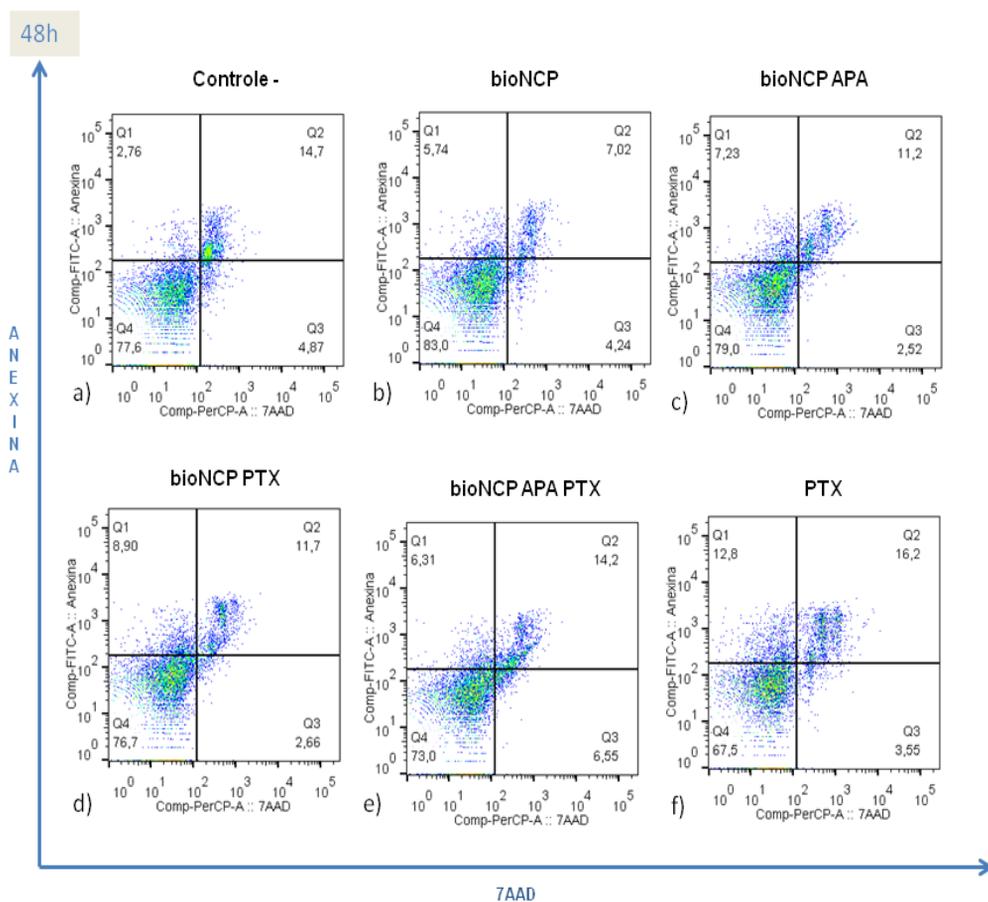
Na **Figura 16** temos um ensaio representativo das células de câncer de próstata LNCaP submetidas aos tratamentos com as nanopartículas e suas formulações por um período de 24 horas. Em 16-**a**, o grupo Controle Negativo com as células tumorais que não receberam tratamento, onde nota-se que essas possuem uma morte total basal que varia de 10 a 20% (Q1+Q2+Q3), mas que não compromete o desenvolvimento das comparações entre os demais tratamentos.

De um modo geral, em 24 horas as nanopartículas que não possuem PTX (**b, c**) também se enquadram no limiar de morte basal do grupo Controle negativo (**a**), mostrando que tanto o revestimento com o biopolímero quitosana (bioNCP), quanto a mimetização com hidroxiapatita (bioNCP APA) não promovem toxicidade as células. Já em **d**, no quadrante Q2 observamos cerca de 15% de morte associada a apoptose tardia/necrose nas células tratadas com bioNCP PTX e ainda, cerca de 5% de morte por apoptose inicial (Q1+Q3). Resultados similares foram obtidos para as células tratadas com bioNCP PTX APA. O grupo PTX corresponde a um controle para verificação da ação direta de PTX puro sobre a viabilidade das células.



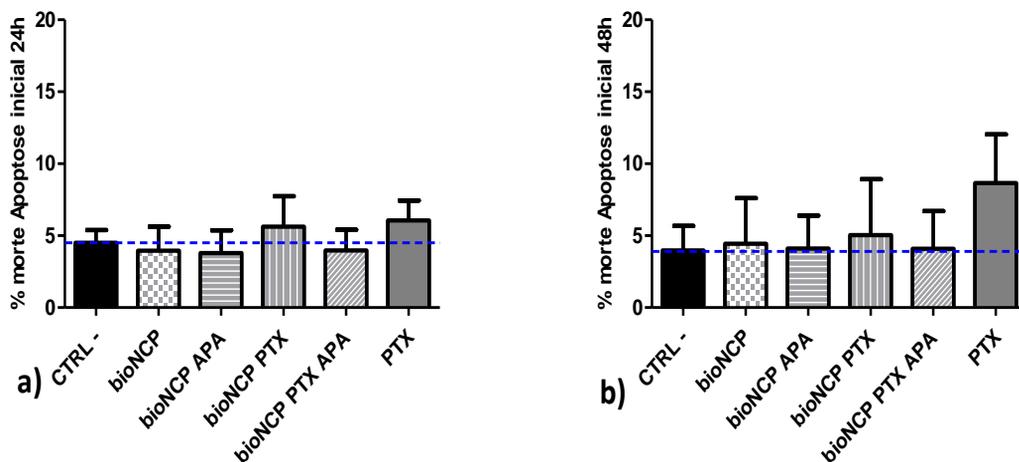
**Figura 16:** Apoptose e Morte de células tumorais LNCap submetidas aos tratamentos com nanopartículas e seus respectivos controles (negativo e PTX), por 24 horas.

Diferente do resultado obtido em 24 horas de tratamento, na **Figura 17** observamos que a exposição das células às nanopartículas por 48 horas promove redução sutil de apoptose tardia/necrose (quadrante Q2 da Figura 17-d) para bioNCP PTX e também no controle PTX, com tendência ao aumento no grupo bioNCP PTX APA. Nota-se um aumento da morte associada à apoptose inicial de um modo geral, seguindo o que ocorre com o grupo controle PTX.



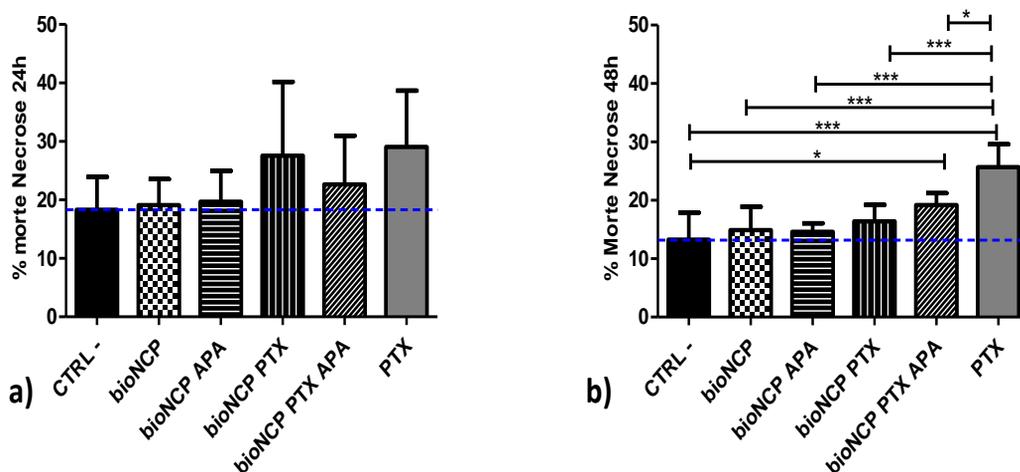
**Figura 17:** Apoptose e Morte de células tumorais LNCap submetidas aos tratamentos com nanopartículas e seus respectivos controles (negativo e PTX), por 48 horas

Os perfis de morte celular decorrentes do tratamento com os diferentes compósitos estão sumarizados na **Figura 18**, em que apresentamos a morte associada por apoptose inicial mediante tratamento com as nanopartículas por 24 horas (18-a). A Figura 18-b, mostra os resultados de apoptose inicial ocasionada pelo tratamento com as nanopartículas por 48 horas.



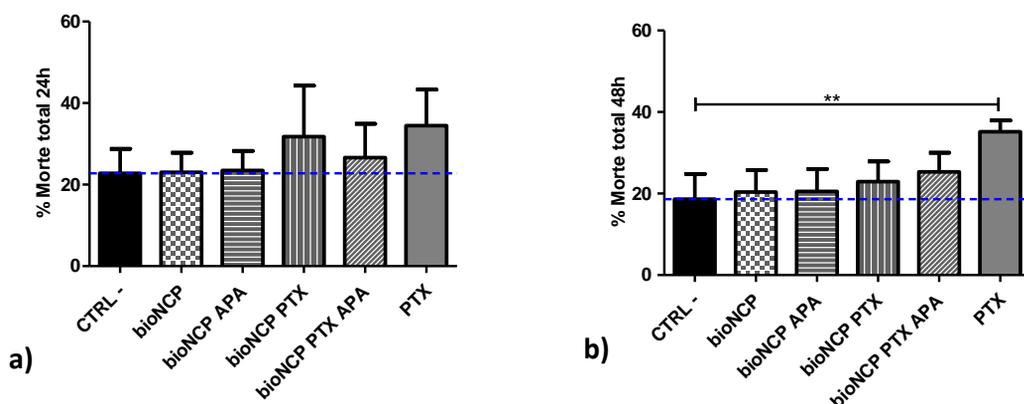
**Figura 18:** Efeito dos tratamentos com as nanopartículas sobre a % de morte celular por Apoptose Inicial em 24 e 48 horas. Nota-se em **a**, uma tendência a toxicidade em bioNCP PTX e o controle PTX puro. Já em **b**, a toxicidade do controle PTX puro aumentou, no entanto, em ambos os casos os resultados não foram significativos.

Quando analisamos os resultados de morte celular por apoptose tardia/necrose frente aos tratamentos com as nanopartículas por 24 e 48 horas (**Figura 19**), observamos o mesmo comportamento da morte por apoptose inicial, sendo que bioNCP PTX provoca porcentagem de morte muito similar ao controle PTX puro (19-a). Em 19-b, nota-se um aumento da capacidade de morte celular provocada pelo controle PTX puro e da nanopartícula completa bioNCP PTX APA na análise após 48h de exposição aos tratamentos.



**Figura 19:** Efeito dos tratamentos com as nanopartículas sobre a % de morte celular por Apoptose tardia/Necrose em 24 e 48 horas. Em **a**, apesar do desvio padrão proeminente observamos comportamentos de toxicidade similar para bioNCP PTX e PTX puro. Em **b**, a liberação em 48 horas de PTX pela bioNCP PTX APA mostra-se significância quando comparada ao grupo controle negativo, enquanto o controle PTX puro mantém sua toxicidade. \*  $p < 0,05$ ; \*\*\* $p < 0,0001$ .

Por fim, a análise de morte total das células tumorais frente aos tratamentos com nanopartículas magnéticas (soma de apoptose inicial e morte celular) mostra que os tratamentos com bioNCP PTX e PTX puro por 24 horas tiveram efeito citotóxico maior que os demais, seguido por bioNCP PTX APA (Figura 20-a), enquanto a análise após 48 h de exposição mostra aumento de ação dos compósitos ( $p < 0,001$ ) embora tenha havido redução da eficiência de morte celular provocada por bioNCP PTX (20-b). BioNCP PTX APA, por sua vez, revela-se como uma nanopartícula promissora na liberação de fármaco, tendendo ao aumento da citotoxicidade de acordo com o tempo de exposição.

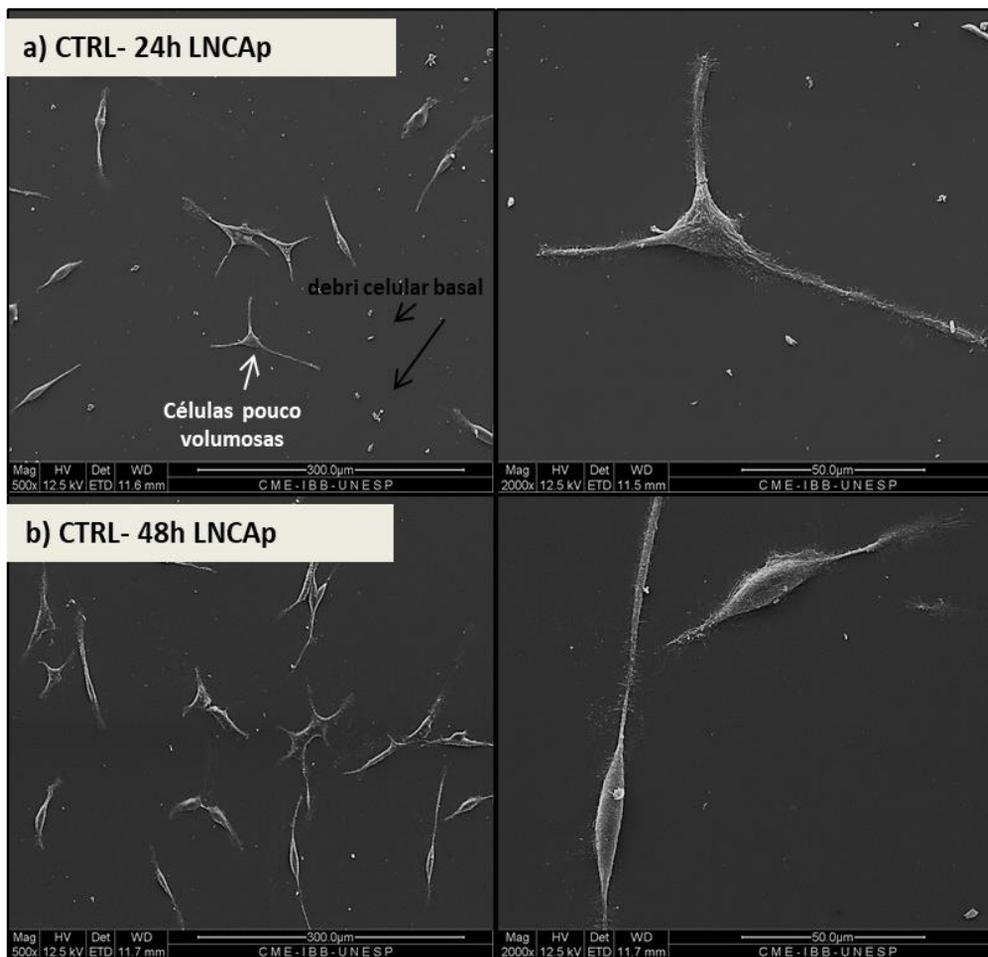


**Figura 20:** Morte total das células tumorais submetidas a tratamento com nanopartículas magnéticas. Em **a**, observamos comportamentos de toxicidade similar para bioNCP PTX e PTX puro. Em **b**, a liberação em 48 horas de PTX pela bioNCP PTX APA mostra-se tendência ao aumento quando comparada ao grupo controle negativo, enquanto o controle PTX puro mantém sua toxicidade, no entanto de forma significativa comparando-se aos demais grupos. \*\* $p < 0,001$ .

## 10. Interação entre as células de câncer de próstata e nanopartículas magnéticas de Fe, Mn e Zn

Os resultados para a interação das células submetidas aos tratamentos com as nanopartículas por 24 e 48 horas são apresentados a seguir. As imagens foram obtidas por análise em MEV. Na **Figura 21**, observamos que as células dos Controles de 24 e 48 horas, possuem morfologia com pouco volume celular e leve alongamento. Corroborando os ensaios de morte celular, notamos a presença de alguns debris celulares indicando uma morte basal da própria linhagem, mas que

não comprometeu a interpretação de resultados quando comparados aos grupos tratados com as nanopartículas.

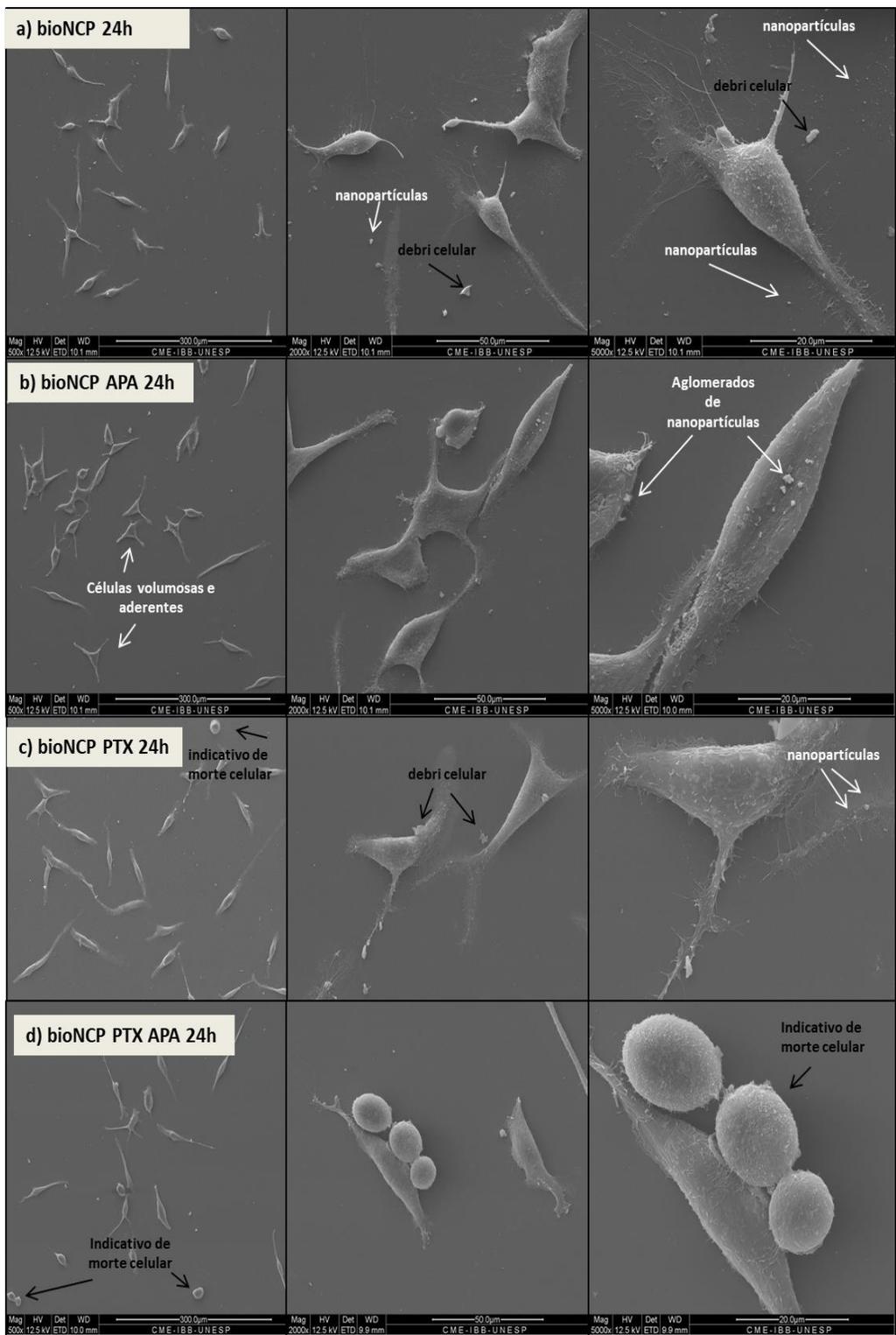


**Figura 21:** Controle negativo das células LNCaP submetidas aos tratamentos com nanopartículas por 24 e 48 horas. As imagens são expressas na magnitude de 500x e 2000x, respectivamente.

Na **Figura 22**, observamos os tratamentos com as nanopartículas por 24 horas. De um modo geral observamos que os tratamentos provocaram aumento do volume celular quando comparados aos controles negativos (**Figura 21**), especialmente nas células tratadas com as partículas revestidas com hidroxiapatita

(APA), o que pode ser indicativo da interação com as nanopartículas.

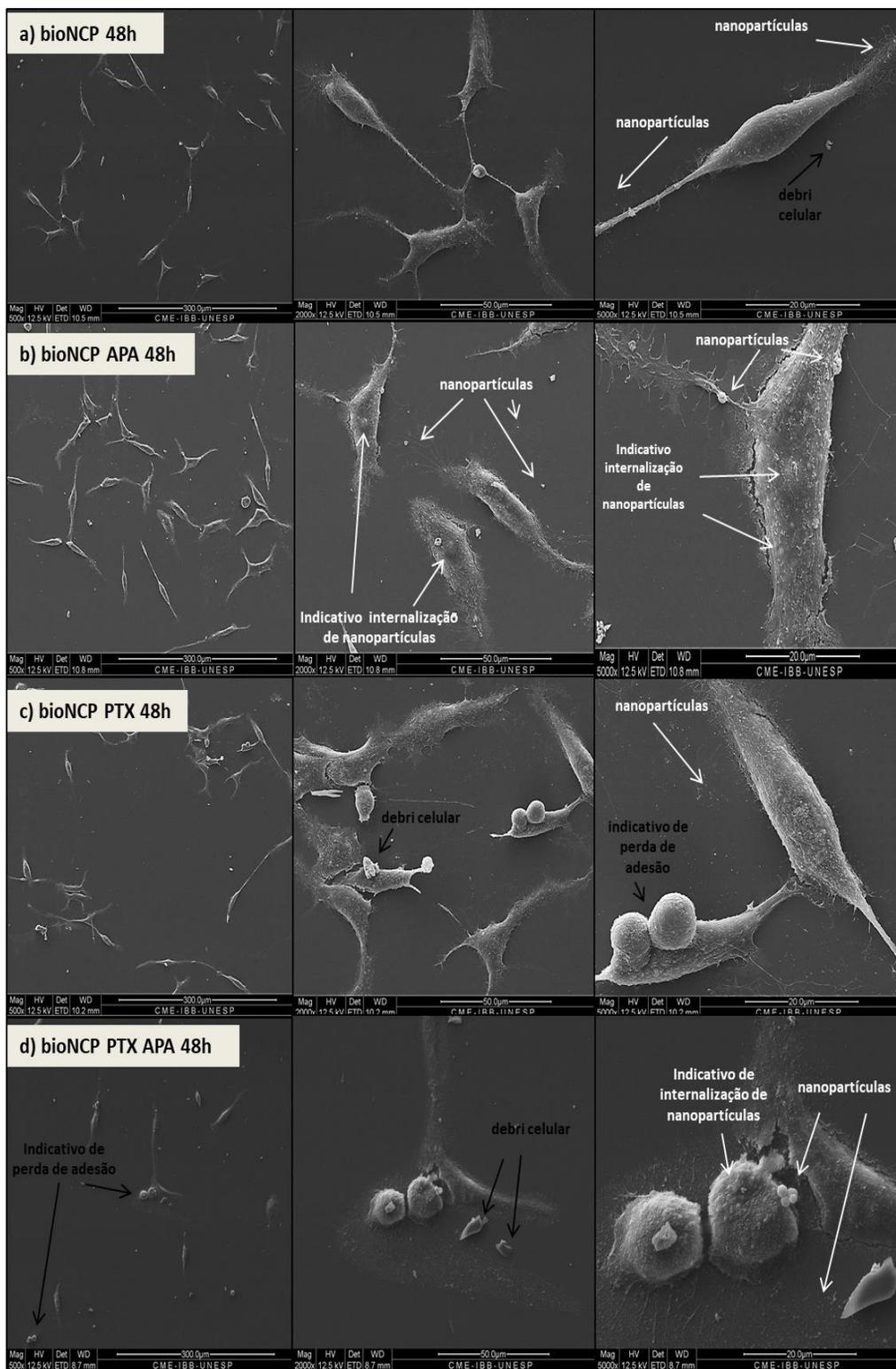
Nos grupos tratados com bioNCP (22-**a**) e bioNCP APA (22-**b**), não foram observadas células com a morfologia que indicasse perda de adesão celular ou morte, corroborando com a baixa toxicidade e a biocompatibilidade do biopolímero quitosana e da hidroxiapatita. Nota-se nos tratamentos com as partículas contendo PTX, a formação de debris celulares e alguns focos indicativos de perda de adesão celular.



**Figura 22:** Células submetidas aos tratamentos com as nanopartículas por 24 horas. As imagens são expressas na magnitude de 500x, 2000x e 5000x, respectivamente.

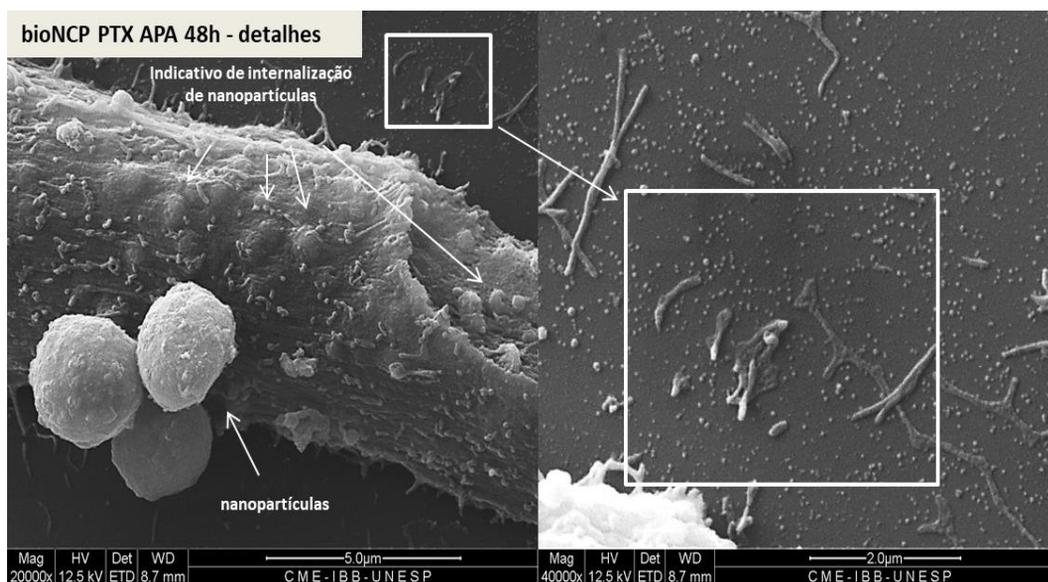
A **Figura 23** mostra as células tratadas 48 horas com as nanopartículas. As imagens revelam células com um volume celular mais proeminente e aparentemente mais aderidas. No grupo tratado com bioNCP APA, nota-se a presença de nanopartículas sobre a superfície celular e também regiões pontuais volumosas nas células que podem indicar a presença de partículas internalizadas. Esse achado mostrou-se mais evidente quando comparado ao mesmo tratamento no período de 24 horas, indicando que o tempo de exposição possui influência sobre os efeitos celulares. No grupo tratado com bioNCP PTX, nota-se claramente uma tendência a morte celular similar ao tratado por 24 horas, o que corrobora com os dados obtidos no ensaio por citometria de fluxo.

Finalmente, a exposição a bioNCP PTX APA resulta em alterações morfológicas bem interessantes e que denotam a interação das nanopartículas com as células tumorais. Vemos o indicativo do processo de perda de adesão celular ou morte, (destacado pelas setas pretas), a presença de muitos debris celulares e ainda muitos pontos de elevação na superfície celular que podem indicar a interação dessas nanopartículas com as células. Esses resultados, mais evidenciados no tratamento por 48 horas, remetem a afinidade de LNCaP pela hidroxiapatita e também a liberação de PTX de forma controlada.



**Figura 23:** Células submetidas aos tratamentos com as nanopartículas por 24 horas. As imagens são expressas na magnitude de 500x, 2000x e 5000x, respectivamente.

Surpreendentemente, na **Figura 24** quando aumentamos a magnitude (20.000x) da região indicada com as setas brancas de interação e possível internalização das nanopartículas, vemos claramente os processos descritos até aqui. Células bastante granuladas, e a presença constante de nanopartículas de variados tamanhos, sugeridas tanto como internalizadas quanto na superfície celular. Nota-se também ao fundo da imagem, regiões que indicam possivelmente a presença de grandes quantidades de nanopartículas (quadro branco em destaque com aumento de 40.000x).

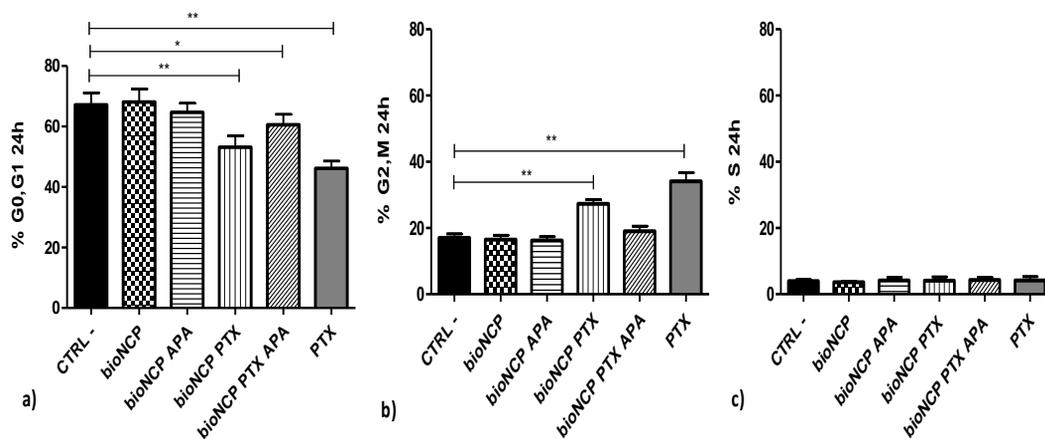
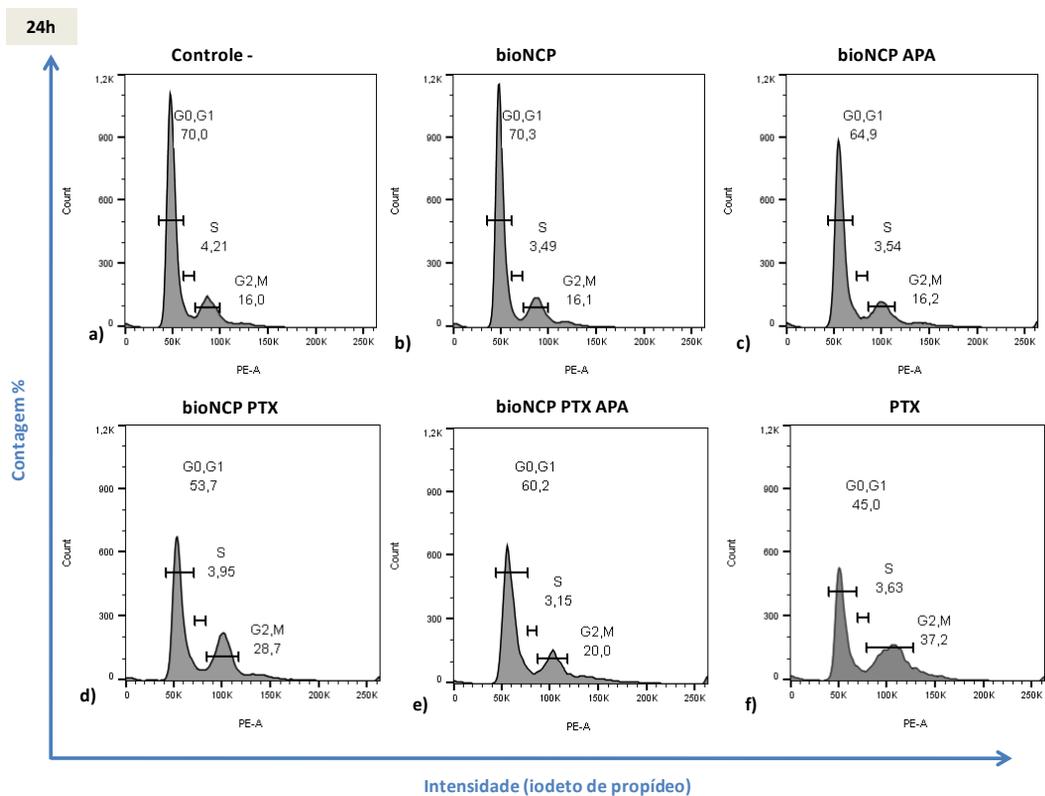


**Figura 24:** Células submetidas ao tratamento com bioNCP PTX APA 48 horas. A imagem dos detalhes foi obtida em magnitude de 20.000x e 40.000x.

## **11. O efeito das nanopartículas de ferrita Mn e Zn carregadas com PTX sobre o ciclo celular de LNCaP**

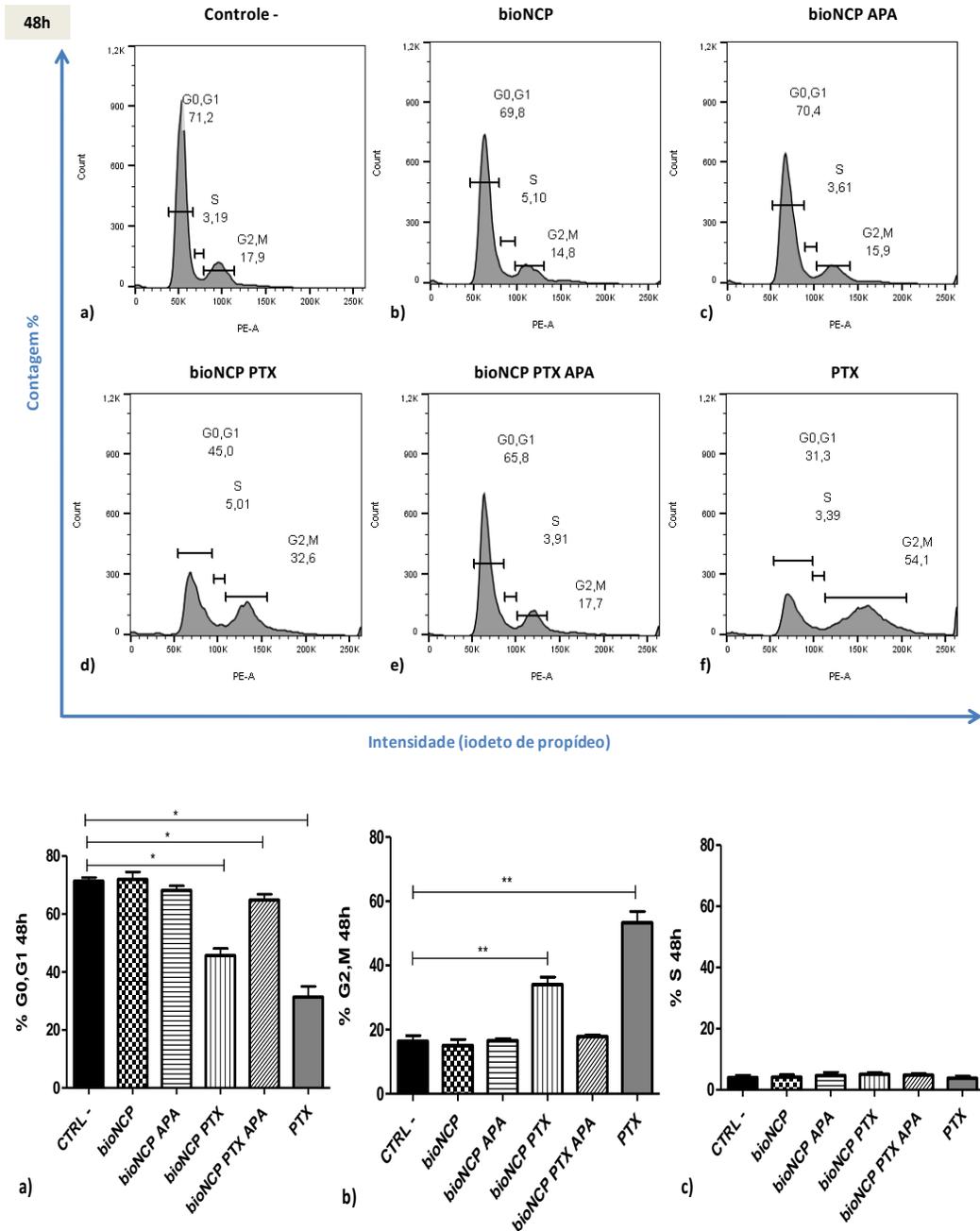
Os resultados para ciclo celular em 24 horas de exposição das células submetidas aos compósitos mostram que os grupos controles (bioNCP, bioNCP APA) não sofreram modificação significativa, o que comprova a biocompatibilidade dos revestimentos poliméricos e com hidroxiapatita (**Figura 25**). Em contraste, nota-se que houve efeito de PTX dos compósitos bioNCP PTX (50%) e para bioNCP PTX APA (60%), comprometendo de forma sutil o crescimento da célula já nessa fase. O efeito de PTX puro (45%) é ainda mais influente sobre as células, quando comparado aos controles (70%), o que corrobora com o efeito encontrado no ensaio de morte celular.

O efeito principal de PTX é sobre a fase G2, M, momento em que a célula cresce ainda mais, produz proteínas e organelas, começando a se reorganizar para a mitose. No entanto, pode-se observar alterações devido a concentração de fármaco usado, como é o caso de concentrações >100nM. Nesse caso, vemos um aumento na intensidade sobre G2, M. Esse efeito foi significativo para bioNCP PTX (30%) e seu controle PTX puro (40%), já bioNCP PTX APA, mostrou pouco efeito sobre essa fase (25%), assemelhando-se ao controle negativo.



**Figura 25:** Ciclo celular de células LNCaP expostas *in vitro* por 24 h aos compósitos. A primeira imagem refere-se a um experimento representativo (contagem% x intensidade). O grupo controle refere-se às células sem nenhum tratamento. O grupo PTX refere-se às células expostas ao PTX puro na concentração de 150nM, similar ao contido nos compósitos bioNCP PTX e bioNCP PTX APA. Análise realizada por citometria de fluxo com base na marcação de ácido nucleico com iodeto de propídeo. n=6; \*p< 0,05; \*\* p<0,001.

Em 48 horas de tratamento, vemos o mesmo comportamento sobre o ciclo celular, no entanto o tempo de exposição favorece ainda mais o efeito sobre G2,M para bioNCP PTX (40%) e PTX puro (55%).

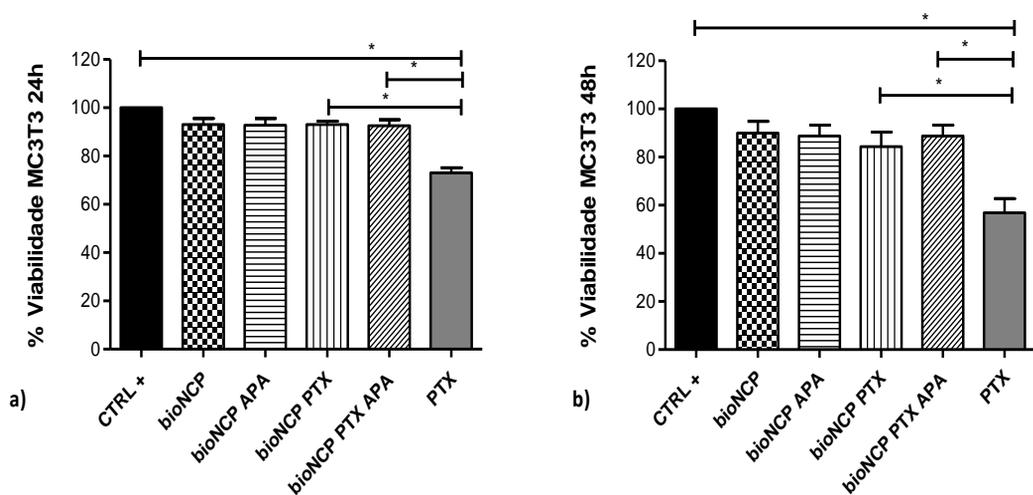


**Figura 26:** Ciclo celular de células LNCaP expostas *in vitro* por 48 h aos compósitos. A primeira

imagem refere-se a um experimento representativo (contagem% x intensidade). O grupo controle refere-se às células sem nenhum tratamento. O grupo PTX refere-se às células expostas ao PTX puro na concentração de 150nM, similar ao contido nos compósitos bioNCP PTX e bioNCP PTX APA. Análise realizada por citometria de fluxo com base na marcação de ácido nucleico com iodeto de propídeo. n=6; \*p≤ 0,05; \*\* p≤0,001.

## 12. Efeito sobre a viabilidade de pró-osteoblastos murinos MC3T3

Nossos resultados sobre a viabilidade de pró-osteoblastos murinos MC3T3 submetidos a exposição aos compósitos por 24 e 48 horas (**Figura 27**), mostram que os grupos controles (bioNCP, bioNCP APA) não interferem na viabilidade celular, reforçando mais uma vez a biocompatibilidade dos revestimentos adotados nesse estudo. Ainda, quando comparamos o efeito nos grupos tratados com bioNCP PTX e bioNCP PTX APA com o controle PTX puro, vemos que o encapsulamento favorece a manutenção da viabilidade celular de células saudáveis como os pró-osteoblastos, mesmo após 48 horas de exposição aos compósitos.



**Figura 29:** Viabilidade celular de células murinas MC3T3 expostas *in vitro* por 24 e 48 horas aos

compósitos. O grupo controle refere-se às células sem nenhum tratamento. O grupo PTX refere-se às células expostas ao PTX puro na concentração de 150nM, similar ao contido nos compósitos bioNCP PTX e bioNCP PTX APA. n=6; \*p≤ 0,05.

## VI. DISCUSSÃO

O primeiro desafio do presente estudo foi a escolha e padronização do método de síntese dos nanocompósitos propostos para o carregamento de PTX. Observamos que a média da porcentagem atômica da amostra de ferrita de Mn e Zn produzida neste estudo proporcionou uma perda de material mínima durante a síntese e também uma distribuição uniforme dos elementos das ferritas quando comparamos a amostra nominal (padrão) com a amostra produzida e quantificada em 3 regiões da mesma amostra, assim como o mapeamento dos elementos presentes por EDX (88, 93). Atribuímos esses resultados muito próximos ao nominal devido ao método de co-precipitação, amplamente utilizado em indústrias de diferentes países, como no Japão (99), tratando-se de uma síntese promissora por ser um processo de via química e de fácil aplicação. A síntese por co-precipitação tende a formar menos aglomerados que as demais, mantendo o material final na forma de pó (100). Além disso, torna os cátions formados mais homogêneos (101, 102), favorecendo a formação da estrutura característica de ferritas cerâmicas do tipo espinélio, constituídas não só por ferro, mas também por outros metais, e que pode possibilitar elevada propriedade eletromagnética (103).

As principais vantagens durante a co-precipitação são a criação de materiais muito puros e com boa qualidade nominal do produto final (104, 105). Nas sínteses por co-precipitação, a morfologia e a proporção dos elementos das partículas têm relação direta com a natureza da base utilizada e da temperatura da reação, sendo que partículas maiores estão relacionadas a temperaturas mais altas, daí a preocupação em mantermos a temperatura o mais estável em 100°C, a fim de obtermos cristais com tamanho reduzido.

A difração de raios-X utilizada para investigar a fase cristalina da ferrita de espinélio mostrou que se trata de um material monofásico, ou seja, próximo do padrão característico ICSD 28515 para ferritas de Mn e Zn, observado através dos picos comparativos. A obtenção da fase da ferrita Mn-Zn é relatada usando diferentes métodos de síntese, porém sempre com a presença de segunda fase, ou seja, nem todo material produzido pode ser considerado ferrita (106-109). A obtenção de ferrita Mn-Zn monofásica é um processo desafiador e, apesar de não termos encontrado o padrão ouro para a ferrita produzida, os resultados são corroborados pelos dados prévios do grupo com o material desenvolvido durante anos de estudo com ferritas monofásicas de Mn e Zn, e suas aplicações (86-88).

Quando observamos a capacidade dessas ferritas de responderem a estímulo magnético por biosusceptometria de corrente alternada (BAC) comparadas a ferritas com ferro estequiométrico ( $\text{Fe}_{2,0}$ ) e ferritas com ferro em excesso ( $\text{Fe}_{2,8}$ ) temos que nem sempre a resposta magnética é proporcional a quantidade de Fe presente. Como previamente estabelecido pelo grupo as ferritas utilizadas são representadas pela fórmula geral  $\text{Mn}_{(1-x)}\text{Zn}_x\text{Fe}_{(2-y)}\text{O}_4$ , onde a

variação de "y" mostra que as nanopartículas apresentam deficiência de Fe na estrutura, mesmo quando são sintetizadas em composição estequiométrica (Fe = 2). Para  $y = 0,30$ , ou seja,  $Fe_{1,7}$  a deficiência de Fe induzida no processo de síntese, produz nanopartículas com um grau de cristalização mais elevado e maiores concentrações de Fe no espinélio, suscetíveis ao maior campo magnético. Apesar de alguns grupos também terem encontrado propriedades magnéticas promissoras para serem usadas em aplicações médicas, como a hipertermia ou a ressonância magnética, poucos são os estudos ainda encontrados na literatura envolvendo essas propriedades (110-114).

A eficiência de encapsulamento de paclitaxel não foi obtida quando optamos por técnicas de cromatografia (105-107), mesmo efetuando a síntese com elevadas concentrações de PTX (8%, 12% e 16% em relação à massa de ferrita/quitosana), pois quantidades elevadas do fármaco adicionado durante a síntese não garantem o encapsulamento do mesmo. Podemos atribuir esse efeito a concentração micelar crítica (CMC) da quitosana influenciada pelo uso de tensoativos, também conhecidos como surfactantes, como o ácido oleico (catiônico) e o tween 80 (não iônico) utilizados em nossa síntese. São moléculas que possuem uma parte apolar (solubilidade da molécula em óleo) ligada a outra polar (solubilidade da molécula em água). Sua principal característica é diminuir a tensão interfacial entre dois líquidos, adsorvendo-se nas interfaces sólido-líquido, líquido-líquido e líquido-gás (115). A CMC é definida como a menor concentração em que se observa o tensoativo em equilíbrio com as micelas, que são agregados moleculares, em soluções coloidais, em equilíbrio com as

moléculas de monômeros polares e apolares das quais são formadas. As micelas reversas, nas quais desenvolvemos este trabalho, são formadas em solventes apolares em que as cabeças hidrofílicas se voltam para o centro, cercadas pelas caudas hidrofóbicas (116, 117).

Diante dos resultados apresentados, fizemos a síntese de uma nova nanopartícula com 6% de fármaco em relação à massa de ferrita/quitosana. Assim, reduzimos o volume de PTX de uso clínico encapsulado pelas quitosanas e estabelecemos a CMC suficiente para formar as micelas reversas e garantir o encapsulamento do fármaco. O mesmo procedimento foi repetido com as devidas alterações mencionadas e analisado por UV-visível a 227nm, no qual obtivemos uma porcentagem de incorporação considerada boa, quando comparado por exemplo a nanotubos de carbono (97).

Dessa forma, ao buscarmos os grupamentos funcionais da polimerização com quitosana, o encapsulamento de paclitaxel, o revestimento com hidroxiapatita e o grupo funcional característico das ferritas por FTIR, foi possível a identificação das etapas de síntese. No entanto, apesar de não observarmos o deslocamento das moléculas de água pelo cálcio dos grupos OH entre 3750 e 3250  $\text{cm}^{-1}$ , e embora isso não confirme com precisão a adsorção de íons  $\text{Ca}^{2+}$ , alguns autores indicam que há relação na redução da quantidade de água ancorada nesses grupos funcionais (118). Para nossos resultados de mimetização com hidroxiapatita, adotamos à banda do grupo fosfato entre 1100 e 800  $\text{cm}^{-1}$ , usada para verificar a eficiência de adsorção de cálcio (119).

De um modo geral, nanopartículas possuem cargas em sua superfície que

se comportam de maneiras distintas frente às alterações de pH. Sendo assim, a dispersão de partículas está relacionada diretamente ao seu potencial zeta ( $\zeta$ ), devendo este ser distante de 0 e próximo a +30 ou -30 mV, o que indica alto grau de estabilidade. No entanto, quando a carga superficial líquida é igual a 0 (ponto isoelétrico - PI), a principal função das cargas superficiais é impedir a formação de agregados através da repulsão de cargas, evitando assim a atração entre as partículas devido a forças de Van der Waals (120, 121).

As nanopartículas produzidas mostraram-se ideais para tratamentos de células tumorais, uma vez que a liberação do fármaco paclitaxel é dependente da acidificação do microambiente para dissolução do revestimento polimérico. Esses resultados são muito interessantes, pois apesar de termos uma carga negativa menor em pH acidificado, essas partículas conseguem liberar o fármaco de forma não abrupta, ao mesmo tempo em que estabelecem uma relação de interação através da sua superfície (negativa) com a membrana tumoral (positiva). Isso nos mostra que apesar de uma menor interação de cargas, esse não foi o fator predominante da morte celular tumoral, mas sim a chave para dissolução do polímero em pH ácido facilitando a liberação do fármaco.

Ao analisarmos o perfil de morte causada pela exposição das células tumorais de câncer de próstata LNCaP por 24 e 48 horas, observamos que o perfil de morte por apoptose inicial provocado pelo tratamento com bioNCP PTX por 24 horas mostra-se muito semelhante ao encontrado na mesma concentração para as células tratadas com PTX puro, sendo que as nanopartículas sem fármaco encapsulado não mostraram toxicidade direta. Apesar desses resultados não

apresentarem significância estatística, são muito empolgantes do ponto de vista do encapsulamento do fármaco, pois representam que o revestimento com o biopolímero quitosana foi parcialmente desfeito mediante pH acidificado do microambiente tumoral, liberando assim, parte do fármaco para que exerça ação similar à concentração controle do PTX puro. A liberação de fármacos de forma controlada em nanopartículas é o ponto chave das novas pesquisas para tratamento do câncer, especialmente quando falamos de micelas poliméricas, como as de quitosana. De acordo com as propriedades estruturais mencionadas anteriormente, as micelas poliméricas de quitosana são capazes de promover a liberação controlada do fármaco incorporado (122), uma vez que exibem um perfil de ionização/dissociação dependente do pH (123).

Para o período de 48 horas de tratamento, curiosamente, observa-se a manutenção da porcentagem de morte celular por apoptose inicial devido o tratamento com bioNCP PTX e uma tendência ao aumento no grupo tratado com PTX puro. *A priori*, é possível que esse resultado indique que o polímero de bioNCP PTX possa não ter sido desfeito totalmente no período apresentando, já que se trata de uma liberação controlada. A morte por necrose em 24 ou 48 horas, mostrou indicativos de que o controle PTX puro possui uma toxicidade superior, já que se trata de um contato mais direto com as células, enquanto bioNCP PTX mostrou-se com potencial reduzido. Surpreendentemente, o tratamento com bioNCP PTX APA levou ao aumento da morte por necrose em 48 horas, próximo ao encontrado para o fármaco puro. Em um quadro geral, a morte total provocada pelas nanopartículas apresentadas nesse estudo possui predominância em 24 horas

para bioNCP PTX e seu controle PTX puro similar ao encontrado no período de 48 horas, mas com a inserção de um possível potencial de bioNCP PTX APA, corroborando os resultados das imagens encontradas por MEV.

Assim, as etapas de revestimento mostram-se efetivas mais uma vez em promover a liberação controlada do fármaco ao longo da variação temporal. Ademais, a linhagem tumoral LNCaP utilizada possui um ápice de proliferação em cerca de 48 horas, fato este que pode ter influenciado na redução do efeito observado para bioNCP PTX. Entretanto, esse desafio fisiológico pode ter favorecido o efeito de bioNCP PTX APA que possui, além do revestimento com quitosana, um revestimento externo de hidroxiapatita (similar ao cálcio) e que pode estar funcionando como um gatilho para a interação com a nanopartículas, já que o cálcio faz parte da maquinaria de proliferação celular. Entretanto, acreditamos que a camada de hidroxiapatita depositada sobre a nanopartícula foi ligeiramente grosseira, o que dificultou a liberação do fármaco de forma mais significativado nos períodos apresentados.

Do ponto de vista terapêutico, o enigma do câncer de próstata é uma complexa perturbação de múltiplas vias e mecanismos regulatórios e, diante de tal complexidade, a integração do sinal biológico pelo íon cálcio  $\text{Ca}^{2+}$ , revela-se de forma interessante. A variação da concentração extracelular de cálcio influencia na propagação intracelular de um sinal mediado por este elemento (124) e também na importação de outros presentes no núcleo (125), sendo visto como eventos físico-químicos inerentes da homeostase entre a célula e seu ambiente. Portanto, faz-se necessário o cuidado para estabelecermos o limite desta relação quando pensamos

por exemplo, na proporção de cálcio a ser mimetizado na nanopartícula durante a síntese, pois receptores de superfície acoplados a proteína G (GPCR), como o receptor de quimiocina cisteína (CXCR4), favorece a migração e invasão celular tumoral, interage mediante sinalização de cálcio, e tem sido implicado no tropismo ósseo de células de câncer de próstata (126).

Utilizar o cálcio como um atrativo às células tumorais de câncer de próstata exige conhecimento acerca do potencial de ação deste íon e também sobre a célula envolvida, bem como a relação que ambos estabelecem. Sabe-se que o  $\text{Ca}^{2+}$  regula a proliferação, diferenciação e apoptose, importantes processos que modulam a resposta celular (127). Em células de câncer de próstata, a modulação do  $\text{Ca}^{2+}$  funciona principalmente através do receptor extracelular sensível ao cálcio (CaSR), receptor acoplado à proteína G envolvido na sinalização transmembrana (128, 129).

Níveis elevados de cálcio como, por exemplo, em células de próstata PC-3, promovem a ação da molécula antiapoptótica Akt, favorecendo a proliferação e adesão/migração celular. Já na linhagem LNCaP, níveis elevados de cálcio exercem efeitos moderados (130). Essas observações podem servir de base para “estimular o interesse” das células com perfil mais agressivo, como as PC-3, pelos nanocarreadores (131), pois essas células apresentam maior expressão do receptor CaSR em sua membrana (132, 133).

O equilíbrio entre a morte celular, proliferação e diferenciação é crucial para a manutenção da homeostase. Os três tipos básicos de morte celular, puderam ser apenas distinguidos de acordo com critérios morfológicos, enzimológicos e

funcionais. A morte celular apoptótica, incluindo condensação da cromatina, fragmentação nuclear, encolhimento celular, formação de membrana plasmática e formação de corpos apoptóticos. A morte celular autofágica, com a geração de energia e metabólitos pela digestão de organelas ou macromoléculas. E por fim, a necrose, caracterizada pelas poucas alterações morfológicas estereotipadas, mas que eventualmente resulta no arredondamento da célula (134, 135).

Durante muito tempo, a necrose foi considerada um modo acidental de morte celular. No entanto, recentemente é reconhecida como um tipo de morte que pode ser regulada de forma programada através de vias de transdução de sinal (136-138). Múltiplas linhas de evidências em estudos para o câncer indicam que a necrose pode ser um evento programado, pois pode ser induzida através de receptores específicos da membrana plasmática, pela regulação por fatores genéticos, epigenéticos e farmacológicos (139); alteração do *burst* oxidativo, hiperpolarização da membrana mitocondrial, permeabilização da membrana lisossomal e permeabilização da membrana plasmática (140); e ainda, a inativação de caspases responsáveis por uma mudança da apoptose para morfologias de morte celular com características mistas de necrose e apoptose ou necrose completa (141). Assim como a apoptose, genes específicos evoluíram para regular a morte celular necrótica (142, 143). Estudos identificaram adaptadores de receptores de morte, incluindo receptor de interação da proteína quinase 1 (RIPK1) e receptor de fator de necrose tumoral (TNF), como reguladores essenciais da morte celular necrótica (144-148), relatados em células de câncer de próstata resistentes a andrógeno (149).

A ação das nanopartículas de ferrita de Mn e Zn sobre o ciclo celular de LNCaP mostra uma condição dose-dependente. As células que entram na mitose pelo efeito de concentrações de paclitaxel elevadas formam fusos anormais. Em vez de montar uma parada mitótica a longo prazo, essas células entram na anáfase e dividem seus cromossomos em múltiplas direções. As células filhas resultantes são aneuplóides, e uma parte delas morre, presumivelmente devido à perda de um ou mais cromossomos essenciais (150). Estudo realizado por Hernandez-Vargas et.al, 2007 mostrou efeito similar sobre o ciclo celular de docetaxel para células de câncer de mama humano MCF-7 em concentrações >100nM (151).

Abal et. al, descreveu a análise padrão de citometria para medir a paragem do ciclo celular pelos taxanos como um pico semelhante para as células em G2/M e células tetraplóides pós-mitóticas, com um pico de conteúdo de DNA tetraplóide (152). Em conclusão, concentrações elevadas de paclitaxel são capazes de sustentar um bloco mitótico terminal, induzindo a apoptose. Por outro lado, baixas concentrações de paclitaxel podem ser suficientes para retardar a progressão mitótica, mas não para induzir uma parada mitótica (153).

O ensaio de MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5 difeniltetrazólio é utilizado para determinar a viabilidade celular, podendo ser um indicador indireto de citotoxicidade, uma vez que mede a atividade da redutase mitocondrial em células vivas, através do MTT reduzido pela atividade metabólica celular ligada ao NADH e NADPH, formando cristais de formazan de coloração azul. Desta maneira, conseguimos mensurar a quantidade de formazan por espectrofotometria, sendo esta diretamente proporcional ao número de células

viáveis. Ao analisarmos o efeito das nanopartículas sobre a viabilidade de células saudáveis como os pró-osteoblastos vimos que apesar de as nanopartículas terem um efeito citotóxico reduzido ao longo desse estudo quando comparamos ao PTX puro, elas não apresentaram toxicidade para células saudáveis, tanto na formulação bioNCP PTX quanto na partícula completa bioNCP PTX APA. Além disso, os grupos controles bioNCP e bioNCP APA confirmaram que os revestimentos são biocompatíveis e não-tóxicos.

Sendo o tecido ósseo um excelente alvo para o câncer de próstata, acredita-se que a interação CXCR4/CXCL12 seja um componente no direcionamento e adesão de células tumorais aos ossos. Os osteoblastos são células do tecido ósseo importantes no processo de remodelação óssea e que expressam a quimiocina CXCL12, capaz de interagir com o receptor CXCR4 expresso na maioria das células de câncer de próstata com predominância de metastáticas. Os osteoblastos mantêm as células tumorais em um estado quiescente, e desequilíbrios nessa relação podem favorecer a inserção da célula tumoral no tecido ósseo (154). Assim, a ausência de toxicidade sobre osteoblastos é uma característica bastante positiva dos compósitos estudados, pois em uma eventual utilização terapêutica, essas nanoestruturas entrarão em íntimo contato com células normais circunjacentes ao tumor.

Diante dos resultados apresentados, concluímos que as nanopartículas produzidas possuem potencial como carreadores de PTX e ainda contam com um núcleo com boa susceptibilidade a campo magnético, o que pode favorecer tratamentos como hipertermia magnética. Apesar de observarmos nitidamente uma

maior interação das células de câncer de próstata com as partículas revestidas com cálcio na forma de hidroxiapatita, faz-se necessário novas formulações dessa síntese. Por fim, as nanopartículas produzidas nesse estudo mostram-se não só como um sistema para entrega de PTX às células tumorais, mas também como um agente inócuo às células saudáveis, que aliado as propriedades magnéticas tornam-se ferramentas multifuncionais contra o câncer.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians*. 2018;68(6):394-424.
2. Ferlay J, Colombet M, Soerjomataram I, Mathers C, Parkin DM, Pineros M, et al. Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. *International journal of cancer*. 2018.
3. Inca. Estimativa e Mortalidade 2018, Câncer de próstata. 2018 [cited 2018 novembro]; Available from: <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/prostata>.
4. Society, AC. Chemotherapy Side Effects. 2016 02/15/2016 [cited 2016 09/27].
5. Castel M., et al. [Cardiotoxicity of chemotherapies]. *Presse Med*, 2013. 42(1): p. 26-39.
6. Pieniazek A, et al. Oxidative stress induced in rat liver by anticancer drugs doxorubicin, paclitaxel and docetaxel. *Adv Med Sci*, 2013. 58(1): p. 104-11.
7. Turkoglu S, Simsek V, Abaci A. Possible anaphylactic reaction to taxus stent: a case report. *Catheter Cardiovasc Interv*, 2005. 66(4): p. 554-6.
8. Breidenbach M, et al. Hematological side-effect profiles of individualized chemotherapy regimen for recurrent ovarian cancer. *Anticancer Drugs*, 2003. 14(5): p. 341-6.
9. Rasmussen L, Arvin A. Chemotherapy-induced immunosuppression. *Environ Health Perspect*, 1982. 43: p. 21-5.
10. Steele TA. Chemotherapy-induced immunosuppression and reconstitution of immune function. *Leuk Res*, 2002. 26(4): p. 411-4.
11. Jordan M, Wilson, L. Microtubules as a target for anticancer drugs. *Nature Reviews Cancer*. 2004;4:253-65.
12. Horwitz SB. Mechanism of action of taxol. *Trends in pharmacological sciences*. 1992;13(4):134-6.

13. Gelderblom H VJ, Nooter K, Sparreboom A. Cremophor EL: the drawbacks and advantages of vehicle selection for drug formulation. *Eur J Cancer*. 2001;37:1590–8.
14. Gallo JM, Li S, Guo P, Reed K, Ma J. The effect of P-glycoprotein on paclitaxel brain and brain tumor distribution in mice. *Cancer research*. 2003;63(16):5114-7.
15. Berg SL, Tolcher A, O'Shaughnessy JA, Denicoff AM, Noone M, Ognibene FP, et al. Effect of R-verapamil on the pharmacokinetics of paclitaxel in women with breast cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 1995;13(8):2039-42.
16. Houston SJ, Rubens RD. The systemic treatment of bone metastases. *Clinical orthopaedics and related research*. 1995(312):95-104.
17. Lester J, Dodwell D, McCloskey E, Coleman R. The causes and treatment of bone loss associated with carcinoma of the breast. *Cancer Treat Rev*. 2005;31(2):115-42.
18. Coleman RE. Clinical features of metastatic bone disease and risk of skeletal morbidity. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2006;12(20 Pt 2):6243s-9s.
19. Rodan, GA., The development and function of the skeleton and bone metastases. *Cancer*, 2003. 97: 726-732. doi:10.1002/cncr.11147
20. Roodman GD. Mechanisms of Bone Metastasis. *New England Journal of Medicine*. 2004;350(16):1655-64.
21. Raisz LG, Seeman E. Causes of Age-Related Bone Loss and Bone Fragility: An Alternative View. *Journal of Bone and Mineral Research*. 2001;16(11):1948-52.
22. Takeda S, Karsenty G. Central control of bone formation. *J Bone Miner Metab*. 2001. 19: 195. <https://doi.org/10.1007/s007740170042>.
23. Tanaka Y, Okada Y, Nakamura T. Inter-and intracellular signaling in secondary osteoporosis. *J. Bone Miner Metab*. 2003. 21:61. <https://doi.org/10.1007/s007740300010>
24. Mundy GR, Chen D, Zhao M, Dallas S, Xu C, Harris S. Growth Regulatory Factors and Bone. *Rev. Endocr. Metab. Disord.*, 2001, 2, 105.
25. Hirabayashi J, Tateno H, Onuma Y, Ito Y. A Novel Probe as Surface Glycan Marker of Pluripotent Stem Cells: Research Outcomes and Application to Regenerative Medicine. *Advanced healthcare materials*. 2015;4(16):2520-9.
26. Farzadi A, et al. Synthesis and characterization of hydroxyapatite  $\beta$ -tricalcium phosphate nanocomposites using microwave irradiation. *Ceramics International*. 2011;37:65-71.
27. Ravarian R, Moztarzadeh F, Hashjin MS, Rabiee SM, Khoshakhlagh P, Tahriri M. Synthesis, characterization and bioactivity investigation of bioglass/hydroxyapatite composite. *Ceramics International*. 2010;36(1):291-7.
28. Best SM, Porter AE, Thian ES, Huang J. Bioceramics: Past, present and for the future. *Journal of the European Ceramic Society*. 2008;28(7):1319-27.
29. Andrade LM GJ, Gonçalves OX, Leite MTT, Catarina AM, et al. Nucleoplasmic Calcium Buffering Sensitizes Human Squamous Cell Carcinoma to Anticancer Therapy. *J Cancer Sci Ther*. 2012;4:131-9.
30. Rodrigues MA GD, Leite MF, Grant W, Zhang L, Lam W, Cheng YC, Bennett AM, Nathanson MH. Nucleoplasmic calcium is required for cell proliferation. *J Biol Chem*. 2007;8(23):17061-8.
31. Liao J, Schneider A, Datta NS, McCauley LK. Extracellular calcium as a candidate mediator of prostate cancer skeletal metastasis. *Cancer research*. 2006;66(18):9065-73. Epub 2006/09/20.
32. Kondratskyi A, Yassine M, Kondratska K, Skryma R, Slomianny C, Prevarskaya

- N. Calcium-permeable ion channels in control of autophagy and cancer. *Frontiers in physiology*. 2013;4:272. Epub 2013/10/10.
33. Bellahcene A, Castronovo V. Increased expression of osteonectin and osteopontin, two bone matrix proteins, in human breast cancer. *The American journal of pathology*. 1995;146(1):95-100. Epub 1995/01/01.
34. Diel IJ, Solomayer EF, Costa SD, Gollan C, Goerner R, Wallwiener D, et al. Reduction in new metastases in breast cancer with adjuvant clodronate treatment. *The New England journal of medicine*. 1998;339(6):357-63. Epub 1998/08/06.
35. Ma P, Mumper RJ. Paclitaxel Nano-Delivery Systems: A Comprehensive Review. *Journal of nanomedicine & nanotechnology*. 2013;4(2):1000164.
36. Wicki A, Witzigmann D, Balasubramanian V, Huwyler J. Nanomedicine in cancer therapy: challenges, opportunities, and clinical applications. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*. 2015;200:138-57.
37. Hubbs AF, Mercer RR, Benkovic SA, Harkema J, Sriram K, Schwegler-Berry D, et al. Nanotoxicology--a pathologist's perspective. *Toxicologic pathology*. 2011;39(2):301-24.
38. Barani H, Montazer M. A review on applications of liposomes in textile processing. *Journal of liposome research*. 2008;18(3):249-62.
39. 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;5(3):164-8.
40. Tong R, Chiang HH, Kohane DS. Photoswitchable nanoparticles for in vivo cancer chemotherapy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2013;110(47):19048-53. Epub 2013/11/06.
41. Cheng L, Wang C, Feng L, Yang K, Liu Z. Functional nanomaterials for phototherapies of cancer. *Chemical reviews*. 2014;114(21):10869-939. Epub 2014/09/27.
42. Carmeliet P, Jain RK. Principles and mechanisms of vessel normalization for cancer and other angiogenic diseases. *Nature reviews Drug discovery*. 2011;10(6):417-27. Epub 2011/06/02.
43. Langer R. Polymer-controlled drug delivery systems. *Acc Chem Res*. 1993;26(10):537-42.
44. Perrault SD, Walkey C, Jennings T, Fischer HC, Chan WC. Mediating tumor targeting efficiency of nanoparticles through design. *Nano letters*. 2009;9(5):1909-15.
45. Ling D, Lee N, Hyeon T. Chemical synthesis and assembly of uniformly sized iron oxide nanoparticles for medical applications. *Accounts of chemical research*. 2015;48(5):1276-85.
46. Hanafi-Bojd MY, Moosavian Kalat SA, Taghdisi SM, Ansari L, Abnous K, Malaekheh-Nikouei B. MUC1 aptamer-conjugated mesoporous silica nanoparticles effectively target breast cancer cells. *Drug development and industrial pharmacy*. 2018;44(1):13-8.
47. 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;32(4):524-32.
48. 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;159:375-85.
49. 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.
50. 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;8(34):22442-50.
51. Grass RN, Athanassiou EK, Stark WJ. Covalently functionalized cobalt nanoparticles as a platform for magnetic separations in organic synthesis. *Angewandte Chemie*. 2007;46(26):4909-12.
52. Chertok B, Moffat BA, David AE, Yu F, Bergemann C, Ross BD, et al. Iron oxide nanoparticles as a drug delivery vehicle for MRI monitored magnetic targeting of brain tumors. *Biomaterials*. 2008;29(4):487-96.
53. Sun C, Lee JS, Zhang M. Magnetic nanoparticles in MR imaging and drug delivery. *Advanced drug delivery reviews*. 2008;60(11):1252-65.
54. Andreas K, Georgieva R, Ladwig M, Mueller S, Notter M, Sittlinger M, et al. Highly efficient magnetic stem cell labeling with citrate-coated superparamagnetic iron oxide nanoparticles for MRI tracking. *Biomaterials*. 2012;33(18):4515-25.
55. Lim EK, Huh YM, Yang J, Lee K, Suh JS, Haam S. pH-triggered drug-releasing magnetic nanoparticles for cancer therapy guided by molecular imaging by MRI. *Advanced materials*. 2011;23(21):2436-42.
56. Fortin JP, Wilhelm C, Servais J, Menager C, Bacri JC, Gazeau F. Size-sorted anionic iron oxide nanomagnets as colloidal mediators for magnetic hyperthermia. *Journal of the American Chemical Society*. 2007;129(9):2628-35.
57. Laurent S, Forge D, Port M, Roch A, Robic C, Vander Elst L, et al. Magnetic iron oxide nanoparticles: synthesis, stabilization, vectorization, physicochemical characterizations, and biological applications. *Chemical reviews*. 2008;108(6):2064-110.
58. Gao S, Shi Y, Zhang S, Jiang K, Yang S, Li Z, et al. Biopolymer-Assisted Green Synthesis of Iron Oxide Nanoparticles and Their Magnetic Properties. *The Journal of Physical Chemistry C*. 2008;112(28):10398-401.
59. Chaudhury A, Das S. Recent advancement of chitosan-based nanoparticles for oral controlled delivery of insulin and other therapeutic agents. *AAPS PharmSciTech*. 2011;12(1):10-20.
60. Wang JJ, Zeng ZW, Xiao RZ, Xie T, Zhou GL, Zhan XR, et al. Recent advances of chitosan nanoparticles as drug carriers. *International journal of nanomedicine*. 2011;6:765-74.
61. Elgqvist J. Nanoparticles as Theranostic Vehicles in Experimental and Clinical Applications-Focus on Prostate and Breast Cancer. *International journal of molecular sciences*. 2017;18(5).
62. Yu X, Pishko MV. Nanoparticle-based biocompatible and targeted drug delivery: characterization and in vitro studies. *Biomacromolecules*. 2011;12(9):3205-12.
63. Lv PP, Wei W, Yue H, Yang TY, Wang LY, Ma GH. Porous quaternized chitosan nanoparticles containing paclitaxel nanocrystals improved therapeutic efficacy in non-small-cell lung cancer after oral administration. *Biomacromolecules*. 2011;12(12):4230-9. Epub 2011/11/03.
64. Senel S, McClure SJ. Potential applications of chitosan in veterinary medicine. *Advanced drug delivery reviews*. 2004;56(10):1467-80.
65. Service RF. Tissue engineers build new bone. *Science*. 2000;289(5484):1498-500.
66. Dash M, Chiellini F, Ottenbrite RM, Chiellini E. Chitosan—A versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications. *Progress in Polymer Science*.

2011;36(8):981-1014.

67. Kim K, Kim JH, Park H, Kim YS, Park K, Nam H, et al. Tumor-homing multifunctional nanoparticles for cancer theragnosis: Simultaneous diagnosis, drug delivery, and therapeutic monitoring. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*. 2010;146(2):219-27.
68. Jang MK, Jeong YI, Nah JW. Characterization and preparation of core-shell type nanoparticle for encapsulation of anticancer drug. *Colloids and surfaces B, Biointerfaces*. 2010;81(2):530-6.
69. Shukla SK, Mishra AK, Arotiba OA, Mamba BB. Chitosan-based nanomaterials: a state-of-the-art review. *International journal of biological macromolecules*. 2013;59:46-58.
70. Pathi SP, Lin DD, Dorvee JR, Estroff LA, Fischbach C. Hydroxyapatite nanoparticle-containing scaffolds for the study of breast cancer bone metastasis. *Biomaterials*. 2011;32(22):5112-22.
71. Szcześ A, Hołysz L, Chibowski E. Synthesis of hydroxyapatite for biomedical applications. *Advances in Colloid and Interface Science*. 2017;249:321-30.
72. Barroug A NH, Errassifi F, Sarda S, Cazalbou S, Combes C, Rey C, Glimcher nd MJ Controlled adsorption and release onto calcium phosphates materials and drug delivery applications. *MATEC Web of Conferences*. 2013;5(03002):1-3.
73. Iafisco M, Margiotta N. Silica xerogels and hydroxyapatite nanocrystals for the local delivery of platinum-bisphosphonate complexes in the treatment of bone tumors: a mini-review. *Journal of inorganic biochemistry*. 2012;117:237-47.
74. Muzquiz-Ramos EM, Cortes-Hernandez DA, Escobedo-Bocardo JC, Zugasti-Cruz A, Ramirez-Gomez XS, Osuna-Alarcon JG. In vitro and in vivo biocompatibility of apatite-coated magnetite nanoparticles for cancer therapy. *Journal of materials science Materials in medicine*. 2013;24(4):1035-41.
75. Andronescu E, Fikai M, Voicu G, Fikai D, Maganu M, Fikai A. Synthesis and characterization of collagen/hydroxyapatite: magnetite composite material for bone cancer treatment. *Journal of materials science Materials in medicine*. 2010;21(7):2237-42.
76. Han Y, Li S, Cao X, Yuan L, Wang Y, Yin Y, et al. Different inhibitory effect and mechanism of hydroxyapatite nanoparticles on normal cells and cancer cells in vitro and in vivo. *Scientific reports*. 2014;4:7134.
77. Yuan Y LC, Qian J, Wang J, Zhang Y. Size-mediated cytotoxicity and apoptosis of hydroxyapatite nanoparticles in human hepatoma HepG2 cells. *Biomater*. 2011;31:730 – 40.
78. Liang ZW, Guo BF, Li Y, Li XJ, Li X, Zhao LJ, et al. Plasmid-based Stat3 siRNA delivered by hydroxyapatite nanoparticles suppresses mouse prostate tumour growth in vivo. *Asian journal of andrology*. 2011;13(3):481-6.
79. Venkatesan P, Puvvada N, Dash R, Prashanth Kumar BN, Sarkar D, Azab B, et al. The potential of celecoxib-loaded hydroxyapatite-chitosan nanocomposite for the treatment of colon cancer. *Biomaterials*. 2011;32(15):3794-806.
80. Meena R KK, Rani M, Paulraj R. Effects of hydroxyapatite nanoparticles on proliferation and apoptosis of human breast cancer cells (MCF-7). *J Nanopart Res*. 2012;14:712.
81. Jin J, Zuo G, Xiong G, Luo H, Li Q, Ma C, et al. The inhibition of lamellar hydroxyapatite and lamellar magnetic hydroxyapatite on the migration and adhesion of breast cancer cells. *Journal of materials science Materials in medicine*. 2014;25(4):1025-31.
82. Chen F WZ, Lin C. Preparation and characterization of nano-sized hydroxyapatite

particles and hydroxyapatite/chitosan nano-composite for use in biomedical materials. *Materials Letters*.57:858–61.

83. Hu Q, Li B, Wang M, Shen J. Preparation and characterization of biodegradable chitosan/hydroxyapatite nanocomposite rods via in situ hybridization: a potential material as internal fixation of bone fracture. *Biomaterials*. 2004;25(5):779-85.

84. Pena J I-BI, Martínez A, Vallet-Regí M. New method to obtain chitosan/apatite materials at room temperature. *Solid state sciences*. 2006;8:513 – 9.

85. Frohbergh ME, Katsman A, Botta GP, Lazarovici P, Schauer CL, Wegst UG, et al. Electrospun hydroxyapatite-containing chitosan nanofibers crosslinked with genipin for bone tissue engineering. *Biomaterials*. 2012;33(36):9167-78.

86. Martins ML FA, Cavalheiro AA, Silva RIV, Dos Santos DI, Saeki MJ. Mechanisms of phase formation along the synthesis of Mn–Zn ferrites by the polymeric precursor method. *Ceramics International*. 2014b;40:16023–31.

87. Martins ML SM, Telling MTF, Parra JPRL, Landsgesell S, Smith RI, Bordallo HN. Development and characterization of a new bio-nanocomposite (bio-NCP) for diagnosis and treatment of breast cancer. 2014a;584:514–9.

88. Martins ML ea. Encapsulation of paclitaxel into a bio-nanocomposite. A study combining inelastic neutron scattering to thermal analysis and infrared spectroscopy. *EPJ Web Conf*. 2015;83, 02011.

89. Palmieri V ea. Biomechanical investigation of colorectal cancer cells. *Appl Phys Lett*. 2014;105, 123701.

90. Dixon SJ, Stockwell BR. The role of iron and reactive oxygen species in cell death. *Nature chemical biology*. 2014;10(1):9-17.

91. Martins ML, Ignazzi R, Eckert J, Watts B, Kaneno R, Zambuzzi WF, et al. Restricted mobility of specific functional groups reduces anti-cancer drug activity in healthy cells. *Scientific reports*. 2016;6:22478. Epub 2016/03/05.

92. A. G. Modern ferrite technology 2006.

93. Zhao D WX, Zeng X, Xia Q, Tang J. Preparation and inductive heating property of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>–chitosan composite nanoparticles in an AC magnetic field for localized hyperthermia. *Journal of Alloys and Compounds*.477:739 – 43.

94. Maitra AN GP, De TK, Sahoo SK., inventor; Process for the preparation of highly monodispersed hydrophilic polymeric nanoparticles of size less than 100 nm1999.

95. Callister J, William D., . *Ciência e Engenharia dos Materiais: Uma Introdução*. Rio de Janeiro2002.

96. Liu J, Liu P, Zhang X, Pan D, Zhang P, Zhang M. Synthesis and properties of single domain sphere-shaped barium hexa-ferrite nano powders via an ultrasonic-assisted co-precipitation route. *Ultrasonics sonochemistry*. 2015;23:46-52.

97. Comparetti EJ, Pedrosa VA, Kaneno R. Carbon Nanotube as a Tool for Fighting Cancer. *Bioconjugate chemistry*. 2018;29(3):709-18.

98. Klinkaewnarong J, Swatsitang E, Masingboon C, Seraphin S, Maensiri S. Synthesis and characterization of nanocrystalline HAp powders prepared by using aloe vera plant extracted solution. *Current Applied Physics*. 2010;10(2):521-5.

99. Fu Y-P, Wen S-B, Lu C-H. Preparation and Characterization of Samaria-Doped Ceria Electrolyte Materials for Solid Oxide Fuel Cells. *Journal of the American Ceramic Society*. 2007;91(1):127-31.

100. Zhang T ZW, Bu X, Wang Y, Qiu F. Controlled fabrication of hierarchical MgAl<sub>2</sub>O<sub>4</sub> spinel/carbon fiber composites by crystal growth and calcination processes. *Ceramics International*. 2015.

101. Zeng M. CO-precipitation synthesis of iron-containing garnets Y<sub>3</sub>Al<sub>5</sub>–xFexO<sub>12</sub>

and their magnetic properties. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*. 2015;393:370-5.

102. Yadav RS, Havlica J, Hnatko M, Šajgalík P, Alexander C, Palou M, et al. Magnetic properties of  $\text{Co}_{1-x}\text{Zn}_x\text{Fe}_2\text{O}_4$  spinel ferrite nanoparticles synthesized by starch-assisted sol-gel autocombustion method and its ball milling. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*. 2015;378:190-9.

103. Gimenes R et al. Structural and magnetic characterization of  $\text{Mn}_x\text{Zn}_{1-x}\text{Fe}_2\text{O}_4$  ( $x = 0.2; 0.35; 0.65; 0.8; 1.0$ ) ferrites obtained by the citrate precursor method. *Cerâmica Internacional* 2012;38 (1):741-6.

104. ZAPATA A HG. Effect of zinc concentration on the microstructure and relaxation frequency of Mn-Zn ferrites synthesized by solid state reaction. *Ceramics International*. 2013;39:7853-60.

105. Ebrahimi S, Masoudpanah SM. Effects of pH and citric acid content on the structure and magnetic properties of MnZn ferrite nanoparticles synthesized by a sol-gel autocombustion method 2014. 77-81 p.

106. Lasheras X, Insausti M, Gil de Muro I, Garaio E, Plazaola F, Moros M, et al. Chemical Synthesis and Magnetic Properties of Monodisperse Nickel Ferrite Nanoparticles for Biomedical Applications. *The Journal of Physical Chemistry C*. 2016;120(6):3492-500.

107. Rodrigues AR, Gomes IT, Almeida BG, Araujo JP, Castanheira EM, Coutinho PJ. Magnetic liposomes based on nickel ferrite nanoparticles for biomedical applications. *Physical chemistry chemical physics : PCCP*. 2015;17(27):18011-21.

108. Tomitaka A JM-H, Bae S-T, Takemura Y. Evaluation of Magnetic and Thermal Properties of Ferrite Nanoparticles for Biomedical Applications. *Journal of Magnetism [Internet]*. June 2011:164-8.

109. Ruthradevi T, Akbar J, Suresh Kumar G, Thamizhavel A, Kumar GA, Vatsa RK, et al. Investigations on nickel ferrite embedded calcium phosphate nanoparticles for biomedical applications. *Journal of Alloys and Compounds*. 2017;695:3211-9.

110. Biehl P, von der Lühe M, Dutz S, Schacher F. Synthesis, Characterization, and Applications of Magnetic Nanoparticles Featuring Polyzwitterionic Coatings. *Polymers*. 2018;10(1):91.

111. Badea I, Ciutaru D, Lazar L, Nicolescu D, Tudose A. Rapid HPLC method for the determination of paclitaxel in pharmaceutical forms without separation. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. 2004;34(3):501-7.

112. Sun P, Wang X, Alquier L, Maryanoff CA. Determination of relative response factors of impurities in paclitaxel with high performance liquid chromatography equipped with ultraviolet and charged aerosol detectors. *Journal of chromatography A*. 2008;1177(1):87-91.

113. Volk KJ, Hill SE, Kerns EH, Lee MS. Profiling degradants of paclitaxel using liquid chromatography-mass spectrometry and liquid chromatography-tandem mass spectrometry substructural techniques. *Journal of chromatography B, Biomedical sciences and applications*. 1997;696(1):99-115.

114. Daltin D. *Tensoativos* 2011.

115. Sosnik A, Menaker Raskin M. Polymeric micelles in mucosal drug delivery: Challenges towards clinical translation. *Biotechnology Advances*. 2015;33(6, Part 3):1380-92.

116. Huo M, Zhang Y, Zhou J, Zou A, Yu D, Wu Y, et al. Synthesis and characterization of low-toxic amphiphilic chitosan derivatives and their application as micelle carrier for antitumor drug. *International journal of pharmaceutics*.

2010;394(1):162-73.

117. Cong Khang V, V. Korovkin M, G. Ananyeva L. Identification of clay minerals in reservoir rocks by FTIR spectroscopy 2016. 012004 p.

118. Klinkaewnarong J, Swatsitang E, Masingboon C, Seraphin S, Maensiri S. Synthesis and characterization of nanocrystalline HAp powders prepared by using aloe vera plant extracted solution. *Current Applied Physics*. 2010;10(2):521-5.

119. Matsumoto S, Fujii S, Kikuchi A. Arl4c is a key regulator of tubulogenesis and tumorigenesis as a target gene of Wnt-beta-catenin and growth factor-Ras signalling. *Journal of biochemistry*. 2017;161(1):27-35.

120. 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;51(3):801-11.

121. Mei L, Zhang Z, Zhao L, Huang L, Yang XL, Tang J, et al. Pharmaceutical nanotechnology for oral delivery of anticancer drugs. *Advanced drug delivery reviews*. 2013;65(6):880-90.

122. Gaucher G, Satturwar P, Jones MC, Furtos A, Leroux JC. Polymeric micelles for oral drug delivery. *European journal of pharmaceuticals and biopharmaceutics : official journal of Arbeitsgemeinschaft fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik eV*. 2010;76(2):147-58.

123. Bootman MD. Calcium signaling. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 2012;4(7):a011171.

124. Cautain B, Hill R, de Pedro N, Link W. Components and regulation of nuclear transport processes. *The FEBS journal*. 2015;282(3):445-62.

125. Taichman RS, Cooper C, Keller ET, Pienta KJ, Taichman NS, McCauley LK. Use of the stromal cell-derived factor-1/CXCR4 pathway in prostate cancer metastasis to bone. *Cancer research*. 2002;62(6):1832-7.

126. Brown EM, MacLeod RJ. Extracellular calcium sensing and extracellular calcium signaling. *Physiological reviews*. 2001;81(1):239-97.

127. Maly IV, Hofmann WA. Calcium and Nuclear Signaling in Prostate Cancer. *International journal of molecular sciences*. 2018;19(4).

128. Sanders JL, Chattopadhyay N, Kifor O, Yamaguchi T, Brown EM. Ca(2+)-sensing receptor expression and PTHrP secretion in PC-3 human prostate cancer cells. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism*. 2001;281(6):E1267-74.

129. Cheng JQ, Lindsley CW, Cheng GZ, Yang H, Nicosia SV. The Akt/PKB pathway: molecular target for cancer drug discovery. *Oncogene*. 2005;24(50):7482-92.

130. Dhanasekaran SM, Barrette TR, Ghosh D, Shah R, Varambally S, Kurachi K, et al. Delineation of prognostic biomarkers in prostate cancer. *Nature*. 2001;412(6849):822-6.

131. Chen CJ, Barnett JV, Congo DA, Brown EM. Divalent cations suppress 3',5'-adenosine monophosphate accumulation by stimulating a pertussis toxin-sensitive guanine nucleotide-binding protein in cultured bovine parathyroid cells. *Endocrinology*. 1989;124(1):233-9.

132. Chang W, Pratt S, Chen TH, Nemeth E, Huang Z, Shoback D. Coupling of calcium receptors to inositol phosphate and cyclic AMP generation in mammalian cells and *Xenopus laevis* oocytes and immunodetection of receptor protein by region-specific antipeptide antisera. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*. 1998;13(4):570-80.

133. Hotchkiss RS, Strasser A, McDunn JE, Swanson PE. Cell death. *The New*

England journal of medicine. 2009;361(16):1570-83.

134. Galluzzi L, Bravo-San Pedro JM, Vitale I, Aaronson SA, Abrams JM, Adam D, et al. Essential versus accessory aspects of cell death: recommendations of the NCCD 2015. *Cell death and differentiation*. 2015;22(1):58-73.

135. Vandenabeele P, Galluzzi L, Vanden Berghe T, Kroemer G. Molecular mechanisms of necroptosis: an ordered cellular explosion. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2010;11(10):700-14.

136. Galluzzi L, Kepp O, Kroemer G. RIP kinases initiate programmed necrosis. *Journal of molecular cell biology*. 2009;1(1):8-10.

137. Li J, McQuade T, Siemer AB, Napetschnig J, Moriwaki K, Hsiao YS, et al. The RIP1/RIP3 necrosome forms a functional amyloid signaling complex required for programmed necrosis. *Cell*. 2012;150(2):339-50.

138. Galluzzi L, Kroemer G. Necroptosis: a specialized pathway of programmed necrosis. *Cell*. 2008;135(7):1161-3.

139. Vanden Berghe T, Vanlangenakker N, Parthoens E, Deckers W, Devos M, Festjens N, et al. Necroptosis, necrosis and secondary necrosis converge on similar cellular disintegration features. *Cell death and differentiation*. 2010;17(6):922-30.

140. Kroemer G, Galluzzi L, Vandenabeele P, Abrams J, Alnemri ES, Baehrecke EH, et al. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell death and differentiation*. 2009;16(1):3-11.

141. Golstein P, Kroemer G. Cell death by necrosis: towards a molecular definition. *Trends in biochemical sciences*. 2007;32(1):37-43.

142. Festjens N, Vanden Berghe T, Vandenabeele P. Necrosis, a well-orchestrated form of cell demise: signalling cascades, important mediators and concomitant immune response. *Biochimica et biophysica acta*. 2006;1757(9-10):1371-87.

143. Holler N, Zaru R, Micheau O, Thome M, Attinger A, Valitutti S, et al. Fas triggers an alternative, caspase-8-independent cell death pathway using the kinase RIP as effector molecule. *Nature immunology*. 2000;1(6):489-95.

144. Chan FK, Shisler J, Bixby JG, Felices M, Zheng L, Appel M, et al. A role for tumor necrosis factor receptor-2 and receptor-interacting protein in programmed necrosis and antiviral responses. *The Journal of biological chemistry*. 2003;278(51):51613-21.

145. Lin Y, Choksi S, Shen HM, Yang QF, Hur GM, Kim YS, et al. Tumor necrosis factor-induced nonapoptotic cell death requires receptor-interacting protein-mediated cellular reactive oxygen species accumulation. *The Journal of biological chemistry*. 2004;279(11):10822-8.

146. Temkin V, Huang Q, Liu H, Osada H, Pope RM. Inhibition of ADP/ATP exchange in receptor-interacting protein-mediated necrosis. *Molecular and cellular biology*. 2006;26(6):2215-25.

147. Meng MB, Wang HH, Cui YL, Wu ZQ, Shi YY, Zaorsky NG, et al. Necroptosis in tumorigenesis, activation of anti-tumor immunity, and cancer therapy. *Oncotarget*. 2016;7(35):57391-413.

148. Deeraaksa A, Pan J, Sha Y, Liu XD, Eissa NT, Lin SH, et al. Plk1 is upregulated in androgen-insensitive prostate cancer cells and its inhibition leads to necroptosis. *Oncogene*. 2013;32(24):2973-83.

149. Weaver BA. How Taxol/paclitaxel kills cancer cells. *Mol Biol Cell*. 2014 Sep 15;25(18):2677-81. doi: 10.1091/mbc.E14-04-0916. PubMed PMID: 25213191; PubMed Central PMCID: PMC4161504.

150. Hernández-Vargas H, Palacios J, Moreno-Bueno G. Molecular profiling of docetaxel cytotoxicity in breast cancer cells: uncoupling of aberrant mitosis and

apoptosis. *Oncogene*. 2007;( 26): 2902–2913

151. Abal M, Andreu J, Barasoain I. Taxanes: Microtubule and Centrosome Targets, and Cell Cycle Dependent Mechanisms of Action. *Current Cancer Drug Targets*, (2003)3(3), 193–203.doi:10.2174/1568009033481967

152. Chen, J. G.; Horwitz, S. B. Differential Mitotic Responses to Microtubule-Stabilizing and -Destabilizing Drugs. *Cancer Res*. 2002, 62, 1935-1938.

153. Torres, K.; Horwitz, S. B. Mechanisms of Taxol-Induced Cell Death Are Concentration Dependent. *Cancer Res*. 1998, 58, 3620-3626.

154. Wang N, Docherty FE, Brown HK, Reeves KJ, et.al. Prostate cancer cells preferentially home to osteoblast-rich areas in the early stages of bone metastasis: evidence from in vivo models. *J. Bone Miner. Res.*29(12), 2014:2688–2696.