

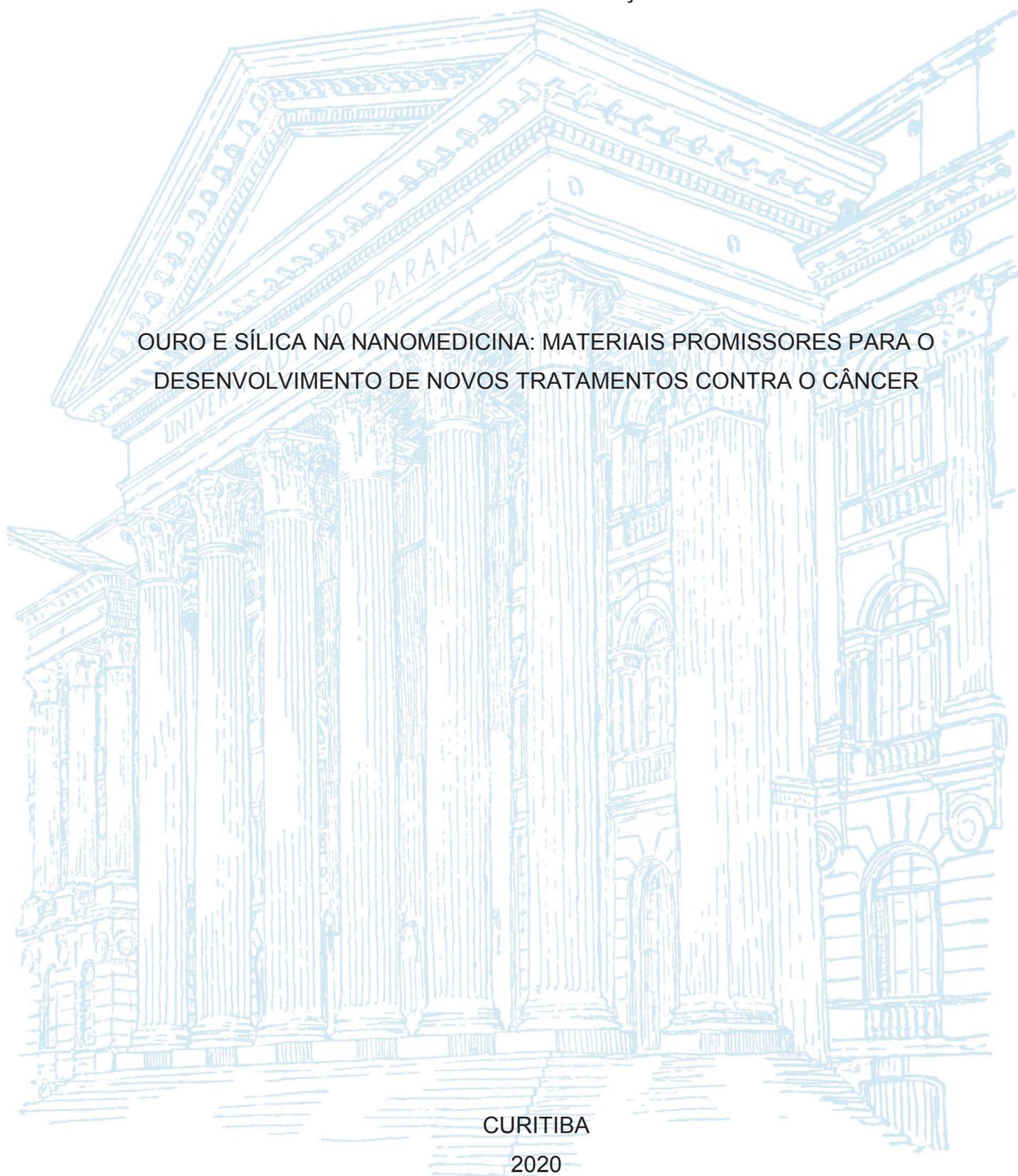
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

JENIFER PENDIUK GONÇALVES

OURO E SÍLICA NA NANOMEDICINA: MATERIAIS PROMISSORES PARA O
DESENVOLVIMENTO DE NOVOS TRATAMENTOS CONTRA O CÂNCER

CURITIBA

2020



JENIFER PENDIUK GONÇALVES

OURO E SÍLICA NA NANOMEDICINA: MATERIAIS PROMISSORES PARA O
DESENVOLVIMENTO DE NOVOS TRATAMENTOS CONTRA O CÂNCER

Tese apresentada ao curso de Pós-Graduação em
Biologia Celular e Molecular, Setor de Ciências
Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como
requisito parcial à obtenção do título de Doutor.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Carolina Camargo de
Oliveira

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Izabel Cristina Riegel
Vidotti Miyata

CURITIBA

2020

FICHA CATALOGRÁFICA

Universidade Federal do Paraná. Sistema de Bibliotecas.
Biblioteca de Ciências Biológicas.
(Rosilei Vilas Boas – CRB/9-939).

Gonçalves, Jenifer Pendiuk.

Ouro e sílica na nanomedicina: materiais promissores para o desenvolvimento de novos tratamentos contra o câncer. / Jenifer Pendiuk Gonçalves. – Curitiba, 2020.

129 f. : il.

Orientadora: Carolina Camargo de Oliveira.

Coorientadora: Izabel Cristina Riegel Vidotti Miyata.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular.

1. Nanopartículas. 2. Nanotecnologia. 3. Ouro. 4. Sílica. 5. Câncer – Tratamento. I. Título. II. Oliveira, Carolina Camargo de. III. Miyata, Izabel Cristina Riegel Vidotti. IV. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular.

CDD (20. ed.) 616.994

TERMO DE APROVAÇÃO



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO BIOLOGIA CELULAR E
MOLECULAR - 40001016007P8

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **JENIFER PENDIUK GONÇALVES** intitulada: **Ouro e sílica na nanomedicina: materiais promissores para o desenvolvimento de novos tratamentos contra a o câncer**, sob orientação da Profa. Dra. CAROLINA CAMARGO DE OLIVEIRA, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de doutor está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 30 de Março de 2020.

Assinatura Eletrônica

01/04/2020 16:53:35.0

CAROLINA CAMARGO DE OLIVEIRA

Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

06/04/2020 17:10:15.0

GISELI KLASSEN

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

22/04/2020 16:31:13.0

ARANDI GINANE BEZERRA JUNIOR

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

01/04/2020 16:49:59.0

ALESSANDRA MELO DE AGUIAR

Avaliador Interno (INSTITUTO CARLOS CHAGAS/FIOCRUZ)

Assinatura Eletrônica

15/04/2020 14:01:42.0

LUCIANE REGINA CAVALLI

Avaliador Externo (INSTITUTO DE PESQUISA PELÉ PEQUENO PRÍNCIPE)

Rua Cel Francisco H. dos Santos, 100. - CURITIBA - Paraná - Brasil

CEP 81531-990 - Tel: (41) 3361-1676 - E-mail: pgbiocel@ufpr.br

Acesse <https://www.prppg.ufpr.br/siga/visitante/autenticacaoassinaturas.jsp> e insira o código 39113 para validar Assinaturas do Documento

AGRADECIMENTOS

Eu gostaria primeiramente de agradecer àqueles que foram diretamente importantes para o desenvolvimento desse trabalho num contexto científico e profissional...

Caro, é praticamente impossível te agradecer em palavras por esses muitos anos de aprendizado. Obrigada por sempre me dar liberdade para ter minhas próprias ideias e por embarcar nelas comigo, por confiar a mim a execução das suas ideias, por todos os “eu faria tudo diferente” que me fizeram repensar e fazer melhor. Você é um incentivo para que a cada dia eu supere um pouco mais os meus limites. Um dos meus objetivos de vida era mandar um texto para você corrigir e recebe-lo de volta com um “tá ótimo” logo de primeira. Algumas poucas vezes eu consegui e isso me deixa muito feliz. Acho que a combinação entre as nossas muitas características semelhantes e algumas diferentes fez uma ótima equipe. Espero que possamos continuar trabalhando juntas por muito tempo ainda, como colegas ;)

Izabel, você foi uma ótima surpresa que esse Doutorado me trouxe. Obrigada por todos os seus ensinamentos, por me acolher no seu grupo com tanto carinho e pela disponibilidade em me ajudar sempre (teve até bate e volta para Campinas para me ajudar com experimento). Assim como a Caro, você me desafia e me inspira a mostrar o meu melhor.

Helô, obrigada pela paciência de ser a primeira a me ensinar a sintetizar nanopartículas (com o carinho de saber que eu não entendia quase nada de química) e por me acompanhar remotamente ao longo desses anos de Doutorado.

Edvaldo, Fer e Célia, obrigada pelo acolhimento, pelos palpites de trabalho, pelo respeito que têm por mim e por incentivarem um clima construtivo (pessoal e científico) dentro do grupo. Edvaldo, obrigada por confiar a mim e à Caro parte dos seus financiamentos para pesquisa, esse trabalho teria sido impossível sem a sua generosidade. Fer, obrigada pelo bem que você faz para a minha autoestima, saiba que eu também sou sua fã.

Ander, obrigada pela parceria e por toda a sua ajuda durante esses anos, eu certamente teria feito muito menos sem você. Obrigada por participar do meu projeto com carinho e responsabilidade, por dividir seu projeto comigo e por me permitir ser sua coorientadora.

Equipe do *in vivo*, obrigada a todos que em algum momento me ajudaram (buscar camundongos, carregar caixas, injetar células, tratamento no final de semana, medir tumor, coletar amostra, levar sangue no hospital e tudo mais) durante os experimentos com animais, vocês fizeram esses momentos muito mais tranquilos.

Daniel e Gustavo, obrigada pela parceria científica ao longo desses 10 anos juntos no laboratório. Houve momentos em que acreditei que fôssemos competidores de verdade (o que sempre fomos num clima de brincadeira), mas depois acabei percebendo que isso nos incentivou a dar o nosso melhor sempre e isso mostrou que somos bem diferentes. Portanto, competir não faz sentido nenhum, pois somos bem melhores nos complementando e trabalhando juntos.

Yasmin, João e Aline, obrigada por toda a ajuda nessa correria dos últimos meses, a participação de cada um de vocês foi essencial para completar esse trabalho.

Stellee, obrigada pela parceria, companhia e amizade ao longo desses anos, por todos os ensinamentos, colaborações e incentivo. Mesmo quando eu achei que seria impossível sequer enxergar a veia de um camundongo, você disse “eu te ensino, você consegue”, e hoje (literalmente milhares de injeções depois) cá estamos.

Camundongos, obrigada pela vida de vocês, espero que um dia todos os seres vivos possam colher os frutos desse sacrifício. E obrigada a todos que colaboraram com o projeto “Minha toca minha vida”, doando rolinhos de papel para que os camundongos pudessem ter um lar mais confortável.

Obrigada a todos os nossos colaboradores durante o desenvolvimento desse projeto, que disponibilizaram gratuitamente seus equipamentos, reagentes, e funcionários para nos auxiliar: Centro de Microscopia do ICC/Fiocruz (Bia e Profs. Lia e Maurilio) pelo processamento das amostras biológicas para MET; Grupo de Catálise e Reatividade Química do Instituto de Química e Biotecnologia da UFAL (Ábner e Prof. Mário) pela síntese dos nanobastões; Grupo de Química Ambiental da UFPR (Mayara e Prof. Marco) e Tecpar (Éder e Amanda) pelas análises de ICP-OES; Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (Prof. Mateus) pelas análises de SAXS; Prof^a. Alexandra Acco do Departamento de Farmacologia da UFPR peja ajuda no planejamento dos experimentos *in vivo* e das análises do sangue dos animais; e Hospital Veterinário da UFPR (Olair e Prof^a Rosangela) pelas análises do sangue dos camundongos.

Obrigada Katharina e Shuai por me receberem no *Max Planck Institute for Polymer Research*, por todos os ensinamentos e por me mostrarem que eu consigo trabalhar em áreas completamente fora da minha zona de conforto.

Obrigada a todo o pessoal do CTAF-UFPR, CME-UFPR e Biotério da UFPR pelos excelentes serviços prestados.

Obrigada CAPES pela bolsa de Doutorado e ao Programa CAPES-PDSE pela bolsa de Doutorado Sanduíche no Exterior.

Professores Doutores Arandi Ginane Bezerra Junior, Alessandra Melo de Aguiar, Luciane Regina Cavalli, Giseli Klassen e Francisco Filipak Neto, obrigada por tão prontamente aceitarem avaliar o nosso trabalho.

Obrigada minha Comissão de defesa (Yasmin e Ander) por se disponibilizarem com tanto carinho para organizar defesa e comemoração. Assim que a pandemia de COVID-19 passar, vamos usar toda essa energia e criatividade para comemorar.

Gostaria também de agradecer àqueles que me deram suporte emocional e psicológico durante essa empreitada...

Gustavo, acho que parceria resume bem o que nós temos. Obrigada por estar sempre ao meu lado e me apoiar a cada decisão tomada (até as mais malucas, que geralmente tomamos juntos), por compartilhar dos meus momentos de fraqueza e também dos de conquista, por todos os nossos cafés da manhã científicos (que me deram muitas ideias), por estar presente até mesmo quando estamos distantes fisicamente e, claro, por me mandar sushi direto da Austrália enquanto eu escrevia essa tese.

Família (principalmente pai, mãe e Andressa), obrigada pela paciência que vocês têm com as minhas escolhas, por aceitarem todas as vezes que eu disse “não vai dar, vou ter que trabalhar” ou “estou indo para o outro lado do mundo” e ainda torcerem pelo meu sucesso, e por sempre me acolherem com todo amor quando eu volto.

Por último, mas de forma alguma menos importante, todo o pessoal do laboratório (LIPS e LCIN, que na verdade são uma família só). Sempre que ouço algum colega reclamar do seu respectivo laboratório ou do orientador, eu penso “queria te levar para fazer um estágio no nosso laboratório”. Obrigada Professores por desde sempre incentivarem a união entre os alunos, o trabalho em equipe e o respeito no ambiente de trabalho. E obrigada a todos os colegas e amigos que fiz

nesse grupo, por me fazerem sentir em casa no trabalho. Não vou citar nomes porquê de alguma forma todos que passaram pelo grupo me ensinaram algo importante que eu vou levar para sempre. Só quero dizer que vocês criaram um problema para a minha vida, pois será muito trabalhoso encontrar ou criar um ambiente de trabalho tão prazeroso em outro lugar do mundo.

Agradeço ainda a todas aquelas pessoas (colegas, amigos, familiares e professores) que não foram citadas, mas que de alguma forma estiveram presentes no meu dia a dia, me dando apoio, discutindo ideias, criticando construtivamente ou simplesmente me divertindo e tornando o trabalho mais leve.

RESUMO

Nanotecnologia e nanociência compõem a base da inovação biomédica. Porém, um bom nanomaterial para esse fim deve, dentre outros, ser manipulável físico-quimicamente, ser biocompatível e liberar de forma controlada princípios ativos. Nesse sentido, ouro e silício apresentam grande destaque, uma vez que cumprem tais requisitos e apresentam ainda inúmeras outras vantagens. Portanto, o presente trabalho teve como objetivo desenvolver e validar nanomateriais com potencial nanomédico. Primeiramente, buscou-se validar a utilização de nanopartículas de ouro estabilizadas pelo polissacarídeo natural goma arábica (GA-AuNPs) como ferramenta para tratamento de melanoma. Inicialmente, sua estabilidade em ambiente biológico foi determinada utilizando técnicas de espectroscopia. Resultados obtidos mostram que os perfis de absorvância de luz e espalhamento de raios-X das GA-AuNPs foram mantidos após incubação por 4 dias em condições de cultivo celular, confirmando sua estabilidade em ambiente biológico. Na sequência, ensaios *in vitro* foram utilizados para determinar a capacidade de GA-AuNPs de alterar parâmetros celulares, assim como sua internalização por células tumorais. A exposição de células tumorais e não tumorais às GA-AuNPs mostrou ampla faixa de concentrações não citotóxicas, corroborando sua biocompatibilidade. Três concentrações não citotóxicas escolhidas foram internalizadas pelas células tumorais, de forma concentração-dependente, e majoritariamente através de endocitose. Em seguida, foi verificado o efeito de concentrações não citotóxicas sobre características de malignidade de células de melanoma metastático murino. Como resultado, as GA-AuNPs internalizadas interferiram com processos celulares fundamentais para a malignidade das células de melanoma, reduzindo suas capacidades invasiva e de formação de colônias. Por fim, ensaios *in vivo* de crescimento tumoral e metástase foram realizados a fim de confirmar os efeitos antitumoral e antimetastático, respectivamente. Pôde-se constatar que parte das GA-AuNPs foi capaz de reduzir o crescimento de tumores sólidos de melanoma de forma semelhante ao quimioterápico Dacarbazina. O tratamento induziu ainda alterações estruturais no tecido tumoral relacionadas à melhora do prognóstico: redução das áreas de morte celular e vascularização. Além disso, foi observada redução do tamanho dos nódulos metastáticos formados no pulmão. Nenhuma evidência de toxicidade foi observada *in vivo* após vasta análise sistêmica. Em resumo, GA-AuNPs apresentam alta estabilidade e biocompatibilidade, e ainda possuem atividade antitumoral e antimetastática intrínseca, que ocorre de forma independente de toxicidade. Segundo, buscou-se desenvolver nanocápsulas de sílica (SiNCs) com núcleo hidrofílico que comportassem o encapsulamento de proteínas. Para tal, foi utilizado o método de miniemulsão inversa. Alterações sistemáticas nas condições de síntese (pH, tipo e proporção entre os reagentes) foram realizadas para compreender o mecanismo de síntese das nanoestruturas. Resultados de microscopia eletrônica mostraram a obtenção de SiNCs com morfologia e tamanho homogêneos quando utilizadas apenas solução tampão ou água como fase aquosa. O mecanismo de síntese ocorreu através da polimerização dos precursores por atração eletrostática na interface óleo/água. Sendo assim, foi possível produzir SiNCs com núcleo hidrofílico em condições amenas de pH e sem adição de catalizadores químicos. Dessa forma, através dos resultados obtidos foi possível confirmar o potencial de utilização GA-AuNPs como ferramenta ativa contra melanoma, assim como desenvolver SiNCs

com potencial para abrigar biomoléculas capazes de atuar no tratamento de câncer, por exemplo.

Palavras-chave: Nanopartículas. Nanocápsulas. Ouro. Sílica. Câncer.

ABSTRACT

Nanotechnology and nanoscience constitute the basis of biomedical innovation. However, a good nanomaterial for this purpose must be physico-chemically manipulable and biocompatible; show controllable release of active ingredients; among others. In this sense, gold and silicon have a great prominence, since they fulfill these requirements and have many other advantages. Therefore, this study aimed to develop and validate nanomaterials with nanomedical potential. First, we sought to validate the use of gold nanoparticles stabilized by the natural polysaccharide gum arabic (GA-AuNPs) as tools for treating melanoma. Initially, its stability in a biological environment was determined using spectroscopy techniques. Results obtained show that the light absorbance and X-ray scattering profiles of GA-AuNPs were maintained after incubation for 4 days in cell culture conditions, confirming their stability in a biological environment. Next, *in vitro* assays were used to determine the ability of GA-AuNPs to alter cellular parameters, as well as their internalization by tumor cells. The exposure of tumor and non-tumor cells to GA-AuNPs showed a wide range of non-cytotoxic concentrations, corroborating their biocompatibility. Three chosen non-cytotoxic concentrations were internalized by tumor cells in a concentration-dependent manner, mostly through endocytosis. Then, the effect of non-cytotoxic concentrations on murine metastatic melanoma cells' malignant characteristics was verified. As result, internalized GA-AuNPs interfered with cellular processes fundamental to melanoma cells malignancy, reducing their invasive and colony-forming capabilities. Finally, *in vivo* tests of tumor growth and metastasis were performed in order to confirm the antitumor and antimetastatic effects, respectively. It was found that part of the GA-AuNPs was able to reduce the growth of solid melanoma tumors in a similar way to the chemotherapy drug Dacarbazine. The treatment also induced structural changes in tumor tissue related to improved prognosis: reduction of cell death and vascularization areas. In addition, a reduction in the lung metastatic nodules size was observed. No evidence of toxicity was observed *in vivo* after extensive systemic analysis. In summary, GA-AuNPs have high stability and biocompatibility, and show intrinsic antitumor and antimetastatic activity, which occur independently of toxicity. Second, we sought to develop silica nanocapsules (SiNCs) with a hydrophilic core that could allow protein encapsulation. Therefore, the inverse miniemulsion method was used. Systematic changes in synthesis conditions (pH, reagents type and proportion) were carried out to understand the nanostructures synthesis mechanism. Electron microscopy results showed the obtaining of SiNCs with homogeneous morphology and size when using only buffer solution or water as aqueous phase. The synthesis mechanism took place through precursors polymerization by electrostatic attraction at the oil/water interface. Thus, it was possible to produce SiNCs with a hydrophilic core under mild pH conditions and without the addition of chemical catalysts. Thus, taken together, the obtained results confirmed the potential of using GA-AuNPs as an active tool against melanoma, as well as to develop SiNCs with the potential to house biomolecules capable of acting in the treatment of cancer, for example.

Keywords: Nanoparticles. Nanocapsules. Gold. Silica. Cancer.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO EFEITO EPR	14
FIGURA 2 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA PROGRESSÃO DO MELANOMA.....	18
FIGURA 3 - DESENHO EXPERIMENTAL DOS ENSAIOS <i>IN VIVO</i>	33
FIGURA 4 - CARACTERIZAÇÃO DE GA-AuNSs E GA-AuNRs	38
FIGURA 5 - CARACTERIZAÇÃO ESPACIAL DE AuNSs e AuNRs.....	40
FIGURA 6 - INTERAÇÃO ESPACIAL ENTRE GA E AuNSs OU AuNRs	42
FIGURA 7 - ESTABILIDADE DE GA-AuNSs E GA-AuNRs APÓS INCUBAÇÃO EM CONDIÇÕES DE CULTIVO CELULAR	44
FIGURA 8 - PERFIL DE CITOTOXICIDADE DE GA-AuNSs E GA-AuNRs	48
FIGURA 9 - MORFOLOGIA DE CÉLULAS DE MELANOMA APÓS EXPOSIÇÃO A CONCENTRAÇÕES NÃO CITOTÓXICAS DE GA-AuNRs.....	50
FIGURA 10 - INTERNALIZAÇÃO DE GA-AuNSs E GA-AuNRs POR CÉLULAS DE MELANOMA.....	52
FIGURA 11 - ANÁLISES CORRELATIVAS ENTRE GA-AuNSs E GA-AuNRs: INTERNALIZAÇÃO CELULAR E CITOTOXICIDADE EM CÉLULAS DE MELANOMA.....	55
FIGURA 12 - CAPACIDADE INVASIVA DE CÉLULAS DE MELANOMA APÓS EXPOSIÇÃO A CONCENTRAÇÕES NÃO CITOTÓXICAS DE GA- AuNSs OU GA-AuNRs.....	59
FIGURA 13 - CAPACIDADE DE FORMAÇÃO DE COLÔNIAS DE CÉLULAS DE MELANOMA APÓS EXPOSIÇÃO A CONCENTRAÇÕES NÃO CITOTÓXICAS DE GA-AuNSs OU GA-AuNRs	61
FIGURA 14 - CRESCIMENTO DE TUMOR PRIMÁRIO SUBCUTÂNEO DE MELANOMA EM CAMUNDONGOS TRATADOS COM GA-AuNSs OU GA-AuNRs	65
FIGURA 15 - HISTOLOGIA DE TUMOR PRIMÁRIO SUBCUTÂNEO DE MELANOMA APÓS TRATAMENTO COM GA-AuNSs OU GA-AuNRs	67
FIGURA 16 - COLONIZAÇÃO PULMONAR POR CÉLULAS DE MELANOMA EM CAMUNDONGOS APÓS TRATAMENTO COM GA-AuNSs OU GA- AuNRs.....	69

FIGURA 17 - HISTOLOGIA DE PULMÕES COLONIZADOS POR CÉLULAS DE MELANOMA APÓS TRATAMENTO COM GA-AuNSs OU GA-AuNRs	70
FIGURA 18 - BIODISTRIBUIÇÃO DE OURO EM CAMUNDONGOS PORTADORES DE MELANOMA APÓS TRATAMENTO COM GA-AuNSs OU GA-AuNRs.....	72
FIGURA 19 - MASSA CORPORAL DE CAMUNDONGOS PORTADORES DE MELANOMA ANTES E APÓS TRATAMENTO COM GA-AuNSs OU GA-AuNRs	74
FIGURA 20 – RESUMO ILUSTRADO DOS RESULTADOS OBTIDOS <i>IN VITRO</i> E <i>IN VIVO</i> COM GA-AuNSs OU GA-AuNRs EM MODELOS DE MELANOMA MURINO.	82
FIGURA 21 - ILUSTRAÇÃO ESQUEMÁTICA DO PROCESSO DE COPOLIMERIZAÇÃO INTERFACIAL EM MINIEMULSÃO INVERSA PARA A SÍNTESE DE SiNCs COM POTENCIAL PARA ABRIGAR BIOMOLÉCULAS HIDROFÍLICAS.....	96
FIGURA 22 – SiNCs SINTETIZADAS UTILIZANDO CONDIÇÕES AMENAS DE pH NA FASE AQUOSA.	98
FIGURA 23 - CORRELAÇÃO ENTRE A RAZÃO MOLAR APTES:TMOS E A MORFOLOGIA DAS SiNCs RESULTANTES EM DIFERENTES pHs.	100
FIGURA 24 – MECANISMO DE CONFINAMENTO DA POLIMERIZAÇÃO DE SÍLICA NA INTERFACE ÓLEO/ÁGUA.....	102
FIGURA 25 - CORRELAÇÃO ENTRE A PROPORÇÃO DE CTAC:TMOS E A MORFOLOGIA DAS NANOPARTÍCULAS RESULTANTES.....	103

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - QUANTIFICAÇÃO DA INTERNALIZAÇÃO DE GA-AuNSs e GA-AuNRs POR CÉLULAS DE MELANOMA.....	54
TABELA 2 - MASSA DOS ÓRGÃOS DE CAMUNDONGOS PORTADORES DE MELANOMA APÓS TRATAMENTO COM GA-AuNSs OU GA-AuNRs.	75
TABELA 3 - CONTAGEM CELULAR DO SANGUE DE CAMUNDONGOS PORTADORES DE MELANOMA APÓS TRATAMENTO COM GA- AuNSs OU GA-AuNRs.....	76
TABELA 4 - PERFIL HEMATOLÓGICO DE CAMUNDONGOS PORTADORES DE MELANOMA APÓS TRATAMENTO COM GA-AuNSs OU GA-AuNRs.	77
TABELA 5 - PERFIL BIOQUÍMICO DO SANGUE DE CAMUNDONGOS PORTADORES DE MELANOMA APÓS TRATAMENTO COM GA- AuNSs OU GA-AuNRs.....	79
TABELA 6 - RESUMO DOS RESULTADOS OBTIDOS <i>IN VITRO</i> E <i>IN VIVO</i> COM GA-AuNSs OU GA-AuNRs.....	79

LISTA DE ABREVIATURAS OU SIGLAS

3D	- Tridimensional
AgNO ₃	- Nitrato de prata
ALT	- Alanina aminotransferase
APTES	- (3-aminopropil) tretoxisilano
APTES ⁺	- (3-aminopropil) tretoxisilano carregado positivamente
AST	- Aspartato aminotransferase
Au	- Ouro
AuNRs	- Nanobastões de ouro
AuNSs	- Nanoesferas de ouro
CTAB	- Brometo de cetiltrimetilamônio
CTAC	- Cloreto de cetiltrimetilamônio
CV	- Cristal violeta
DAPI	- 4',6'-diamino-2-fenil-indol
DMEM	- <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DNA	- Ácido desoxirribonucléico
DTIC	- Dacarbazina
EDTA	- Ácido etilenodiamino tetra-acético
EPR	- Elevada permeabilidade e retenção
FDA	- <i>U.S. Food and Drug Administration</i>
GA	- Goma arábica
GA-AuNRs	- Nanobastões de ouro funcionalizados com goma arábica
GA-AuNSs	- Nanoesferas de ouro funcionalizadas com goma arábica
GA-AuNSs@RBITC	- Nanoesferas de ouro funcionalizadas com goma arábica e marcadas com isotiocianato de rodamina B
HAuCl ₄	- Ácido cloroáurico
HCl	- Ácido clorídrico
HE	- Hematoxilina-eosina
HNO ₃	- Ácido nítrico
ICP-OES indutivamente	- Espectroscopia de emissão óptica por plasma acoplado
ISO	- Organização Internacional de Normalização
LDH	- Lactato desidrogenase

MEC	- Matriz extracelular
MET	- Microscopia eletrônica de transmissão
MEV	- Microscopia eletrônica de varredura
MTT	- brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil
tetrazolium]	
NaBH ₄	- Borohidreto de sódio
NaCl	- Cloreto de sódio
PBS	- Tampão fosfato-salino
PFA	- Paraformaldeído
PGPR	- Polricinoleato de poliglicerol
pH	- Potencial hidrogeniônico
pKa	- Constante de dissociação ácida
PVDF	- Fluoreto de polivinilideno
RBITC	- Isotiocianato de rodamina B
RNA	- Ácido ribonucleico
SAXS	- Espalhamento de raios-X a baixo ângulo
SFB	- Soro fetal bovino
SiNCs	- Nanocápsulas de sílica
SPR	- Ressonância plasmônica de superfície
TMOS	- Ortossilicato de tetrametilo
UV	- Ultravioleta
VF	- Vermelho de fenol
VN	- Vermelho neutro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	1
1.1 OBJETIVO GERAL	7
CAPÍTULO 1	8
2 REVISÃO DE LITERATURA	9
2.1 NANOMEDICINA	9
2.1.1 Nanopartículas de ouro	10
2.1.2 Nanopartículas de ouro e câncer	12
2.2 MELANOMA.....	16
2.2.1 Tratamentos vigentes para melanoma	20
3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23
4 MATERIAIS E MÉTODOS	24
4.1 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DOS NANOMATERIAIS	24
4.1.1 Síntese de GA-AuNSs.....	24
4.1.2 Síntese de AuNRs e funcionalização com GA	25
4.1.3 Caracterização dos nanomateriais	25
4.1.4 Estabilidade dos nanomateriais em condições de cultivo celular	25
4.2 ENSAIOS <i>IN VITRO</i>	26
4.2.1 Cultivo celular e exposição <i>in vitro</i> aos nanomateriais	26
4.2.2 Ensaio de viabilidade e proliferação celular.....	27
4.2.3 Processamento das células para microscopia eletrônica de transmissão (MET) 27	
4.2.4 Processamento de material biológico para microscopia eletrônica de varredura (MEV) 28	
4.2.5 Quantificação de ouro internalizado pelas células tumorais.....	28
4.2.6 Marcação fluorescente da GA e determinação da sua internalização pelas células tumorais	29
4.2.7 Ensaio de invasão	29
4.2.8 Ensaio de formação de colônias	30
4.3 ENSAIOS <i>IN VIVO</i>	30
4.3.1 Indução tumoral.....	31
4.3.2 Grupos experimentais e protocolos de administração.....	32
4.3.3 Coleta das amostras biológicas.....	33

4.3.4	Quantificação da colonização pulmonar (metástase)	33
4.3.5	Processamento histológico	34
4.3.6	Quantificação de ouro nos tecidos	35
4.3.7	Análises sanguíneas	35
4.4	ANÁLISE ESTATÍSTICA	35
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
5.1	CARACTERIZAÇÃO DOS NANOMATERIAIS	37
5.1.1	Interação entre GA e nanopartículas de ouro	41
5.1.2	Estabilidade dos nanomateriais em ambiente biológico	43
5.2	CITOTOXICIDADE DOS NANOMATERIAIS	45
5.2.1	Internalização dos nanomateriais pelas células tumorais e sua relação com a citotoxicidade	50
5.3	CAPACIDADE DOS NANOMATERIAIS DE ALTERAR PARÂMETROS DE MALIGNIDADE DE CÉLULAS TUMORAIS <i>IN VITRO</i>	57
5.4	POTENCIAL ANTITUMORAL E ANTIMETASTÁTICO DOS NANOMATERIAIS <i>IN VIVO</i>	62
5.4.1	Potencial antitumoral dos nanomateriais <i>in vivo</i>	63
5.4.2	Potencial antimetastático dos nanomateriais <i>in vivo</i>	67
5.5	BIODISTRIBUIÇÃO DOS NANOMATERIAIS <i>IN VIVO</i>	71
5.6	TOXICIDADE DOS NANOMATERIAIS <i>IN VIVO</i>	73
5.7	CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS	79
6	CONCLUSÃO	85
CAPÍTULO 2		86
7	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	87
8	REVISÃO DE LITERATURA	88
8.1	ENCAPSULAMENTO DE PROTEÍNAS	88
8.2	NANOMATERIAIS DE SÍLICA	89
8.2.1	Nanomateriais de sílica para encapsulamento de proteínas	90
9	MATERIAIS E MÉTODOS	94
9.1	MATERIAIS	94
9.2	SÍNTESE DAS NANOCÁPSULAS DE SÍLICA COM NÚCLEO HIDROFÍLICO	94
9.3	CARACTERIZAÇÃO DOS NANOMATERIAIS OBTIDOS	95
10	RESULTADOS E DISCUSSÃO	96
10.1	SÍNTESE DAS NANOCÁPSULAS DE SÍLICA COM NÚCLEO HIDROFÍLICO	96

10.2 MECANISMO DE CONFINAMENTO INTERFACIAL DA POLIMERIZAÇÃO DE
SÍLICA 99

11 CONCLUSÃO 105

REFERÊNCIAS..... 106

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

A nanotecnologia e a nanociência compõem a base da inovação biomédica, que promete benefícios sem precedentes a pacientes e indústria farmacêutica. Por esse motivo os nanomateriais tornaram-se um campo promissor de pesquisa, voltado para o desenvolvimento de ferramentas para diagnóstico e terapia de inúmeras doenças. A rápida emergência desse campo se deve aos efeitos promovidos pelo tamanho em escala nanométrica e extensa área superficial, além de propriedades físico-químicas e biológicas únicas dos nanomateriais. (revisado por ABDEL-WAHHAB; MÁRQUEZ, 2015). Consequentemente, já se tem percebido uma revolução nas ciências farmacêuticas, com grande impacto da nanotecnologia na saúde humana, trazendo avanços nos sistemas de *drug delivery*, dos biomateriais, processos inteligentes, dentre muitos outros exemplos. (NEVES; REIS, 2018).

A nanociência é uma área ainda em expansão. De acordo com uma pesquisa que levou em consideração a presença do termo “nano” no nome do produto ou fabricante, 139 produtos nanotecnológicos foram aprovados pela FDA (*U.S. Food and Drug Administration*) de 1976 a 2017 para uso comercial em nanomedicina. (JONES; MI; WEBSTER, 2019). Em outra pesquisa, que fez uma busca conceitual mais específica utilizando a definição de nanomedicamentos como “agentes terapêuticos ou de imagem que compõem uma nanopartícula para controlar a biodistribuição, aumentar a eficácia ou reduzir a toxicidade de um medicamento ou agente biológico”, o número de produtos aprovados pela FDA restringiu-se a 51. (BOBO et al., 2016). Esses números parecem ser um reflexo de que as evidências de toxicidade em doses realistas ainda são limitadas, pois não há uma correlação simples entre as propriedades (como tamanho, carga superficial, etc) dos nanomateriais e seu padrão de toxicidade. (VALSAMI-JONES; LYNCH, 2015). A entrega do nanomaterial às células num contexto *in vivo* também é um grande desafio, pois ainda não existe um consenso acerca dos requisitos necessários para que esse processo ocorra de forma eficiente. (MITRAGOTRI et al., 2015). Consequentemente, várias questões ainda necessitam ser esclarecidas, principalmente no que diz respeito à toxicidade e direcionamento da entrega. Considerando os desafios, os estudos têm avançado bastante. De acordo com pesquisa feita em 23/03/2020 utilizando o software de prospecção tecnológica Cortellis (Clarivate Analytics), foram encontrados 2236 resultados referentes a

formulações nanotecnológicas em diferentes fases de testes clínicos voltados para aplicações em tumores ou câncer, sendo que 1809 encontravam-se a partir da fase 2 – onde se iniciam os testes de eficácia em indivíduos doentes. Esses dados sugerem que em um futuro próximo o número de produtos aprovados para utilização clínica em nanomedicina deve aumentar.

Com os avanços da produção em escala e aplicação direta para fins biomédicos, faz-se necessário aprofundamento também das pesquisas no sentido de melhorar esses produtos. Um bom nanomaterial para essa finalidade deve apresentar certos requisitos, como: biocompatibilidade; suas propriedades físicas, químicas e biológicas devem ser manipuláveis; nanocarreadores devem ser capazes de sustentar a liberação controlada dos princípios ativos; devem ser passíveis de interação ou penetração através de membranas biológicas; e atingir especificamente as células alvo a fim de minimizar efeitos colaterais adversos. (NEVES; REIS, 2018). A literatura científica mostra que diversos elementos químicos são capazes de cumprir os requisitos necessários para compor um bom nanomaterial para fins biomédicos. Nesse sentido, dois elementos apresentam grande destaque na quantidade e diversidade de estudos: ouro e silício (sendo esse último a matéria-prima para a produção de redes de sílica).

O ouro vem sendo usado desde a antiguidade para finalidades medicinais, mesmo muito antes do surgimento da nanotecnologia. Hoje, as nanopartículas de ouro têm recebido grande atenção devido à facilidade de síntese em solução aquosa, às diversas possibilidades de manipulação de tamanho e formato, às suas propriedades de superfície que, aliadas à biocompatibilidade, favorecem a conjugação a biomoléculas, possibilitando inúmeras aplicações. (revisado por AHMAD et al., 2013). Da mesma forma, a atenção dada aos nanomateriais à base de sílica se deve às suas vantagens físico-químicas e biológicas. As matrizes de sílica são quimicamente inertes, hidrofílicas, baratas, mecanicamente fortes, termicamente estáveis, biocompatíveis e resistentes a ataques microbianos. (revisado por BHATIA et al., 2000). Devido a essas e outras vantagens, ouro e silício foram utilizados como matérias-primas para a síntese química dos nanomateriais investigados no presente trabalho. Além dos dois elementos, o composto natural goma arábica (GA) foi combinado às nanopartículas de ouro como um agente funcionalizante. A GA é um heteropolissacarídeo complexo e ramificado que compõe o exsudato de árvores das espécies *Acacia senegal* e *Acacia seyal*. O composto apresenta imenso poder

comercial e é classicamente utilizado pela indústria alimentícia no mundo todo devido a propriedades como emulsificação, estabilização, conservação, não ser digerido pelo trato gastrointestinal (o que levou a GA a ser amplamente utilizada como fibra alimentar) e apresentar baixa viscosidade em solução. Além de um ótimo estabilizante, estudos recentes têm mostrado diversas outras propriedades da GA que podem ser interessantes terapêuticamente, como efeitos protetores sobre o coração, estômago, rins e dentes, ações antimicrobiana e anticoagulante (revisado por PATEL; GOYAL, 2015), além de efeito modulador sobre o sistema imunológico (SCHLEY; FIELD, 2002; XUAN et al., 2010). Dessa forma, nos últimos anos tem crescido muito a exploração do potencial farmacêutico da GA, o que inclui diversas aplicações nanotecnológicas. A GA foi utilizada no presente trabalho devido às propriedades descritas, que podem ser vantajosas no tratamento de doenças. Além disso, a combinação de nanopartículas de ouro com GA já havia demonstrado resultados promissores quanto à estabilidade dos nanomateriais em estudos prévios, onde foi descrita em detalhes a síntese e caracterização dos mesmos. (BARROS et al., 2016a, 2016b; SILVA et al., 2013).

A aplicação biomédica bem-sucedida dos nanomateriais depende da identificação dos problemas clínicos e do desenho racional de ideias inovadoras para sua resolução. (MITRAGOTRI et al., 2015). Nesse contexto, o presente trabalho foi dividido em dois capítulos, visando o estudo de diferentes nanomateriais voltados para aplicação biomédica, conforme esquematizado a seguir.

CAPÍTULO 1

Material: Nanopartículas de ouro funcionalizadas com goma arábica.

Aplicação: Tratamento de câncer.

Caracterização e estabilidade

Citotoxicidade e internalização celular

Potencial antitumoral *in vitro*

Potencial antitumoral *in vivo*

Potencial antimetastático *in vivo*

Toxicidade *in vivo*

CAPÍTULO 2

Material: Nanocápsulas de sílica (SiNCs) com núcleo hidrofílico.

Aplicação: Encapsulamento de biomoléculas hidrofílicas.

Síntese e caracterização

Mecanismo de síntese

No primeiro capítulo o foco foi a validação da utilização de nanopartículas de ouro estabilizadas pelo polissacarídeo goma arábica como ferramentas para tratamento de melanoma, um tipo de câncer que apresenta alta taxa de mortalidade (SCHADENDORF et al., 2015) e dificuldade de tratamento (DOMINGUES et al., 2018). Muitas estratégias de tratamento diferentes podem ser adotadas para o melanoma metastático, como quimioterapia, citocinas, moduladores do sistema imunológico e inibidores das vias de sinalização (DOMINGUES et al., 2018), dependendo do estágio da doença e da base genética do tumor. Entretanto, vale

ressaltar que os compostos quimioterápicos existentes, em geral, apresentam grande citotoxicidade e pouca efetividade quando na fase metastática. Portanto, é desejável o desenvolvimento de compostos/materiais capazes de inibir ou diminuir o poder de malignidade das células tumorais, sem apresentar toxicidade.

Na busca por novas estratégias terapêuticas, a ciência tem avançado muito no campo da produção e aplicação biomédica de nanopartículas de ouro – em especial no que diz respeito ao câncer -, envolvendo sua funcionalização com moléculas com funções de estabilização, direcionamento para alvos de interesse, produção de imagens para diagnóstico, entrega de quimioterápicos, terapia gênica, dentre outras. (CONDE; DORIA; BAPTISTA, 2012; GHOSH et al., 2008; GUPTA; GUPTA, 2005; JONG; BORM, 2008). Entretanto, os modelos terapêuticos desenvolvidos utilizam-se das propriedades nanométricas de nanopartículas de ouro como carreadores para outras moléculas e em geral são demasiadamente complexos, o que os torna inviáveis para produção em larga escala e utilização clínica. (KORSMEYER, 2016). Por outro lado, as nanopartículas de ouro podem apresentar atividade antitumoral intrínseca. Essas nanopartículas podem entrar nas células por endocitose e, uma vez no ambiente intracelular, podem gerar estresse oxidativo, danos a macromoléculas e organelas, levando conseqüentemente à morte celular. (KANG; MACKEY; EL-SAYED, 2010; LINGABATHULA; YELLU, 2016; PATIL; KIM, 2017; WANG et al., 2011; ZHANG et al., 2017, 2013). Entretanto, tal propriedade antitumoral intrínseca apresenta mecanismos ainda pouco compreendidos e intimamente dependentes da indução de citotoxicidade.

Considerando o potencial inerente das nanopartículas de ouro, buscou-se validar e compreender o efeito antitumoral de dois nanomateriais baseados em nanopartículas de ouro (esferas = AuNSs – do inglês *nanospheres* -, e bastões = AuNRs - do inglês *nanorods*) funcionalizadas com GA. Como mencionado anteriormente, ambos nanomateriais haviam sido sintetizados e caracterizados em trabalhos anteriores. (BARROS et al., 2016a, 2016b; SILVA et al., 2013). Portanto, dando continuidade àqueles estudos, a hipótese geral proposta para o presente trabalho é de que GA-AuNSs e GA-AuNRs apresentam capacidade antimelanoma intrínseca, mesmo em concentrações que não induzem morte celular.

Já no segundo capítulo o foco foi o desenvolvimento de nanocápsulas de sílica contendo interior hidrofílico, com potencial para o encapsulamento de biomacromoléculas. Novos avanços na biocatálise e nanomedicina têm mostrado

importância da imobilização e entrega controlada de biomacromoléculas, como proteínas e enzimas, DNA e RNA (ANSORGE-SCHUMACHER; THUM, 2013; LEADER; BACA; GOLAN, 2008; SOARES et al., 2011; WALSH; POWER; HEADON, 1993), as quais apresentam alta especificidade catalítica e eficácia terapêutica. Por exemplo, enzimas podem ser encapsuladas e entregues a tumores para diversas finalidades: catálise antioxidante, degradação de aminoácidos ou de outros suprimentos nutricionais – como glicose - essenciais para a sobrevivência das células tumorais, ativação de drogas quimioterápicas, etc. (revisado por MUKERABIGWI; GE; KATAOKA, 2018). No entanto, a maioria dessas biomoléculas é frágil por natureza (BLACK et al., 2014; COLLETIER et al., 2002; FUJITA et al., 2012), fazendo com que um encapsulamento eficaz seja pré-requisito para suas aplicações.

Nanocápsulas de sílica (SiNCs) têm ganhado crescente interesse pelo encapsulamento e entrega controlada de moléculas bioativas, devido à presença de uma grande cavidade interna (que serve como reservatório de carga protegido por uma parede semipermeável), sua robustez mecânica, biocompatibilidade e grande versatilidade na funcionalização da superfície. (ZHANG et al., 2015). As SiNCs são tipicamente formadas por métodos mediados por moldes (geralmente surfactantes que guiam a formação da parede) ou por métodos de extração do núcleo de nanopartículas sólidas. (AN; HYEON, 2009; KHANAL et al., 2007; TANG; LI; CHEN, 2012). O conteúdo nuclear das partículas e/ou surfactantes precisa ser removido por calcinação térmica ou extração por solventes orgânicos, que são prejudiciais para muitas biomoléculas. (CHEN; CHEN; SHI, 2014; ZHANG et al., 2015). Moléculas pequenas geralmente são pós-carregados nas SiNCs pré-formadas, o que não é possível para proteínas (BETANCOR; LUCKARIFT, 2008; ERICKSON, 2009), uma vez que a parede de sílica dificulta a difusão de grandes biomoléculas em direção à cavidade oca.

Considerando que os métodos existentes para a produção de SiNCs com núcleo hidrofílico baseiam-se em condições hostis para biomoléculas, buscou-se desenvolver um método onde biomoléculas pudessem ser incorporadas diretamente ao interior das SiNCs durante a síntese. Portanto, a hipótese proposta é de que é possível produzir SiNCs com núcleo hidrofílico sob condições amenas de pH e na ausência de surfactantes.

1.1 OBJETIVO GERAL

Validar nanopartículas de ouro de formatos diferentes (nanoesferas ou nanobastões) funcionalizadas com GA como ferramentas biomédicas para tratamento de melanoma e desenvolver um método de síntese de nanocápsulas de sílica (SiNCs) com núcleo hidrofílico sob condições amenas.

CAPÍTULO 1

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 NANOMEDICINA

De forma intuitiva, o termo nanomedicina se refere à aplicação da nanotecnologia na medicina. Numa abordagem mais ampla, engloba o processo de diagnóstico, tratamento e prevenção de doenças utilizando ferramentas moleculares, com intuito de aliviar dores, preservar e melhorar a saúde humana. Trata-se de uma ciência interdisciplinar relativamente recente que atua nas fronteiras entre áreas como biologia, medicina, engenharia, química, matemática e muitas outras. (FREITAS, 2005; NIKALJE, 2015). Essa área encontra aplicações terapêuticas nos mais diversos campos da medicina: doenças neurodegenerativas, deficiências hormonais, diabetes, infecções, problemas ortopédicos, doenças sanguíneas (PRASAD et al., 2018; SAHA, 2009), e especialmente para o câncer – onde a nanotecnologia tem sido usada como ferramenta auxiliar às limitações impostas pela terapia oncológica convencional (HARE et al., 2017; LIU et al., 2018; MISHRA et al., 2018; SHI et al., 2017; TANG et al., 2017). Além disso, pode constituir importantes ferramentas de diagnóstico e imagem, cirurgia e construção de implantes e próteses. (KUMAR TELI; MUTALIK; RAJANIKANT, 2010). Por esses motivos, a nanomedicina é um dos ramos da nanotecnologia de maior crescimento. (CARUSO; HYEON; ROTELLO, 2012).

A nanomedicina se aproveita das propriedades únicas das nanoestruturas (comumente chamadas de nanopartículas). (CHAN, 2017). Em escala nanométrica, as propriedades físicas, químicas e biológicas dos nanomateriais os diferenciam de átomos, moléculas e dos próprios materiais brutos. Tais características podem ainda ser manipuladas ao alterar seu tamanho, formato, química de superfície e muitos outros parâmetros. (CHAN, 2017; KUMAR TELI; MUTALIK; RAJANIKANT, 2010). Devido a essa flexibilidade de propriedades em escala nanométrica, é difícil limitar as fronteiras numéricas do que se considera “nano” (como, por exemplo, a clássica definição de maiores que átomos ou moléculas pequenas, mas menores que 100 nm). Mais importante do que isso é o fato de que nanomateriais podem demonstrar novas propriedades, as quais podem ser exploradas no desenho de novos efeitos terapêuticos ou diagnósticos. (PELAZ et al., 2017).

Diferentes nanopartículas vêm sendo produzidas a partir de diversos materiais e aplicadas nas mais diversas áreas, desde a eletrônica e energética, até a cosmetologia e medicina. As possibilidades de nanomateriais para uso em nanomedicina são praticamente infinitas, pois podem ser: produzidos a partir de constituintes orgânicos ou inorgânicos; formados por um único elemento químico ou uma mistura de diferentes moléculas; de diferentes tamanhos e formatos; sólidos, moles ou vesiculares. (KIM; RUTKA; CHAN, 2010). Com a intenção de redução de toxicidade, custos e danos ambientais, a nova geração de nanomateriais engloba ainda variações como o uso de biomateriais e elementos abundantes na Terra, proteínas fluorescentes, polímeros naturais, biossíntese de nanoestruturas, dentre outras. (revisado por CHEN et al., 2016).

2.1.1 Nanopartículas de ouro

Dentre as nanopartículas metálicas, as nanopartículas de ouro são provavelmente as mais notáveis. Nanopartículas de ouro isotrópicas (suas propriedades são uniformes em todas as orientações, ou seja, são esféricas ou quase esféricas) podem ser produzidas por métodos “*top-down*” (onde o ouro maciço é sistematicamente quebrado em pedaços menores até gerar partículas do tamanho desejado) ou “*bottom-up*” (onde átomos de ouro são reduzidos quimicamente e se agrupam na forma de nanopartículas). Por outro lado, geralmente nanopartículas de ouro anisotrópicas (suas propriedades variam dependendo da direção, ou seja, possuem formatos não esféricos) são produzidas através do método químico “*seed-mediated*”, onde moléculas - como surfactantes - servem como moldes que guiam o crescimento das nanopartículas de ouro a partir de pequenas nanoesferas, permitindo controle de tamanho e morfologia. (revisado por ZHAO; LI; ASTRUC, 2013). Portanto, as nanopartículas de ouro são bastantes interessantes devido à possibilidade de manipulação de tamanhos e formatos de forma independente e com grande precisão, apresentando técnicas de síntese em solução aquosa relativamente simples e bem estabelecidas. (LI; LANE, 2019).

O ouro, na sua forma a granel, é muito utilizado na fabricação de joias, moedas e componentes eletrônicos, pelo fato de não ser reativo, ou seja, dificilmente sofrer oxidação ou deterioração ao longo do tempo. Já em escala nanométrica, mostra-se altamente reativo, onde sua superfície apresenta-se capaz

de interagir com diversas classes de moléculas e com a luz de maneiras bastante específicas. (DREADEN et al., 2012). Propriedades singulares das nanopartículas de ouro as tornam especialmente interessantes no campo da nanotecnologia, principalmente na nanomedicina. (AMINABAD; FARSHBAF; AKBARZADEH, 2019; LOPES et al., 2019). Esse tipo de nanomaterial tem sido extensivamente utilizado como ferramenta auxiliar no diagnóstico e tratamento de câncer (assunto que será abordado no tópico seguinte). Devido às propriedades ópticas, nanopartículas de ouro podem ser usadas nas mais diversas modalidades de bioimagem, terapia fototérmica e radioterapia. (AMINABAD; FARSHBAF; AKBARZADEH, 2019; SHARIFI et al., 2019). Constituem a classe de nanopartículas metálicas mais biocompatível, com praticamente nenhuma toxicidade (dependendo das condições de exposição) para sistemas biológicos. (revisado por AMINABAD; FARSHBAF; AKBARZADEH, 2019). Sua superfície é facilmente funcionalizável, onde diferentes moléculas podem ser conjugadas para utilização em sistemas controlados de direcionamento e entrega de drogas para tecidos e células específicos. (AMINABAD; FARSHBAF; AKBARZADEH, 2019; JAHANGIRIAN et al., 2019; KONG et al., 2017; MASSE et al., 2019). Nanopartículas de ouro têm ainda se mostrado ótimos carreadores e adjuvantes no desenvolvimento de vacinas contra, por exemplo, câncer, HIV, encefalite e hepatite. (CARABINEIRO, 2017; DYKMAN; KHLEBTSOV, 2017; MARQUES NETO; KIPNIS; JUNQUEIRA-KIPNIS, 2017). Seu valor se estende até o combate a insetos vetores de doenças e diversos parasitas. (BENELLI, 2018).

Uma das características mais especiais das nanopartículas de ouro é a ressonância plasmônica de superfície (SPR, do inglês *surface plasmon resonance*). A incidência de luz de comprimentos de onda específicos sobre essas induz a oscilação coletiva dos elétrons livres presentes na sua superfície. A absorção máxima de luz relacionada à SPR ocorre em comprimentos de onda específicos para cada tamanho e formato de nanopartícula de ouro. Além disso, modificações químicas na sua superfície podem causar um deslocamento no comprimento de onda absorvido. (AMINABAD; FARSHBAF; AKBARZADEH, 2019). As nanopartículas de ouro isotrópicas apresentam tal oscilação em apenas um sentido, enquanto nas anisotrópicas a oscilação ocorre tanto horizontal quanto verticalmente. (KE; CHEN, 2015). Tal propriedade de SPR permite às nanopartículas de ouro absorver e transferir energia luminosa, e até convertê-la em calor, o que as confere ampla possibilidade de aplicações dentro e fora da nanomedicina.

2.1.2 Nanopartículas de ouro e câncer

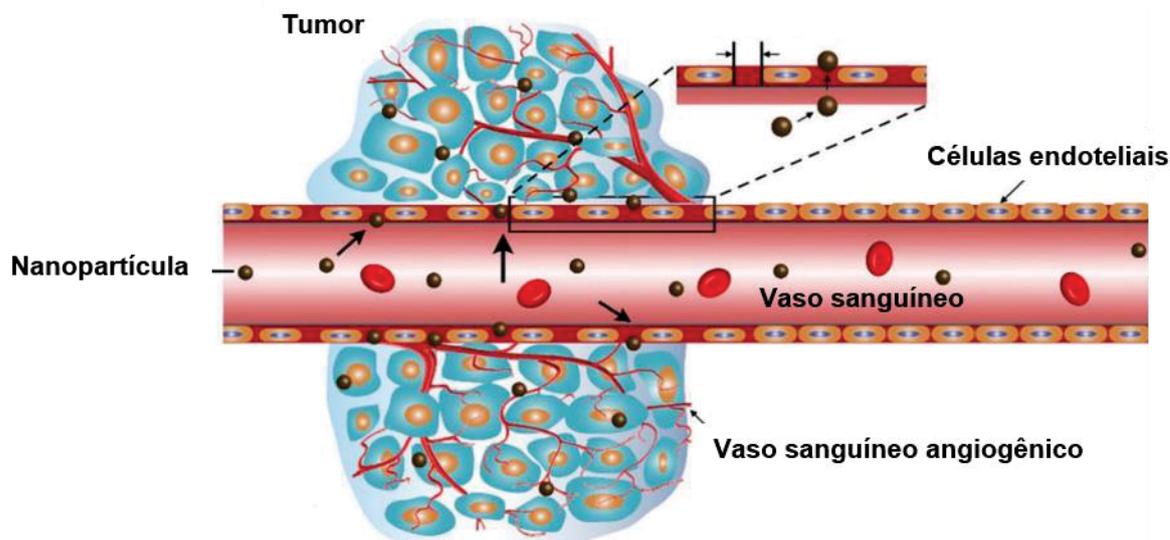
Um dos grandes desafios do tratamento de câncer sempre foi direcionar o composto especificamente para o tumor - reduzindo assim os efeitos colaterais resultantes da toxicidade do tratamento em tecidos saudáveis - bem como a resistência tumoral às drogas utilizadas e o tempo de disponibilidade das mesmas em circulação. Com isso, uma verdadeira revolução no tratamento de câncer foi iniciada após a criação do conceito de “*magic bullet*” por Paul Ehrlich, o qual idealizava drogas que fossem direcionadas especificamente para a estrutura alvo, sem causar danos ao resto do organismo. (STREBHARDT; ULLRICH, 2008). Uma ideia que antes parecia um sonho inalcançável tem se tornado realidade com o advento da nanomedicina. Os nanomateriais têm trazido esperança para cientistas, médicos e pacientes, uma vez que suas propriedades singulares podem mudar a forma de diagnosticar e tratar o câncer no futuro. (RAO et al., 2016).

A facilidade de funcionalização da superfície das nanopartículas de ouro tem sido bastante explorada no desenvolvimento de sistemas de entrega controlada de drogas para o tratamento de câncer. É possível conjugar os mais variados tipos de moléculas à sua superfície, tanto de forma covalente quanto eletrostática. (THAMBIRAJ; HEMA; RAVI SHANKARAN, 2018). A extensa área superficial permite alta capacidade de carregamento de moléculas, pelo menos 100 vezes maior que nanoestruturas vesiculares comumente usadas para carregamento de drogas. Diversos estudos têm mostrado resultados promissores a partir da conjugação de nanopartículas de ouro a dezenas de substâncias antitumorais ou ferramentas de manipulação genética (administração terapêutica e entrega de construções genéticas ao citoplasma e núcleo das células). A superfície das nanopartículas de ouro pode ainda ser simultaneamente funcionalizada com moléculas que apresentam alta afinidade pelas células tumorais (ligantes de receptores ou anticorpos), controlando e melhorando assim a entrega das drogas. (revisado por DYKMAN; KHLEBTSOV, 2019). Uma vez no tumor e dependendo da funcionalização de superfície das nanopartículas de ouro, a liberação das drogas pode ser controlada por alterações de pH (KHUTALE; CASEY, 2017), temperatura (WANG et al., 2018a) ou potencial redox (YANG et al., 2017b), por exemplo.

Além da entrega ativa de drogas utilizando moléculas direcionadoras, o uso de nanopartículas de ouro muitas vezes baseia-se em uma característica comum à

maioria dos tumores sólidos, o efeito de elevada permeabilidade e retenção (EPR, do inglês *enhanced permeability and retention effect*). (AJNAI et al., 2014). Com o crescimento dos tumores sólidos tem-se início o processo de angiogênese, visando a oxigenação e nutrição desses. Esse processo ocorre de forma anormal, gerando vasos irregulares, dilatados, com grandes espaços entre uma célula endotelial e outra (podendo chegar a 400 nm, Figura 1), muitas vezes sem membrana basal e células perivasculares associadas. Além disso, tecidos tumorais apresentam pobre drenagem linfática e retorno venoso lento. Dessa forma, macromoléculas, lipossomos e nanopartículas, conseguem ser entregues de forma passiva dentro de tecidos tumorais, onde podem ficar acumulados devido à dificuldade de “limpeza” desse conteúdo extravasado. Portanto, o efeito EPR permite que as nanopartículas atinjam altas concentrações especificamente no interior dos tumores (uma vez que são grandes para atravessar a parede dos vasos sanguíneos de tecidos normais), onde permanecem por longos períodos de tempo em comparação à sua presença na circulação ou em outros tecidos, causando geralmente mínimos efeitos colaterais. (revisado por IYER et al., 2006; GREISH, 2007). As características físico-químicas das nanopartículas de ouro – tamanho, formato, carga superficial - podem ser cuidadosamente modificadas a fim de melhorar sua entrega intratumoral através do efeito EPR. (AJNAI et al., 2014; ARNIDA et al., 2011; LIU et al., 2013b). Portanto, a utilização de nanopartículas de ouro como sistemas de entrega de drogas pode se dar tanto de forma ativa quanto passiva, ou mesmo uma combinação entre as duas modalidades.

FIGURA 1 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO EFEITO EPR



FONTE: Adaptado de (DAI et al., 2017) com permissão de Royal Society of Chemistry; permissão transmitida através de Copyright Clearance Center, Inc.

LEGENDA: Os vasos angiogênicos no local do tumor apresentam estrutura anormal com grandes fenestras vasculares.

As nanopartículas de ouro entregues ao tumor podem ainda servir como “nanoaquecedores”. Como mencionado anteriormente, a energia da luz de comprimentos de onda específicos incidida sobre nanopartículas de ouro é absorvida e induz a SPR. Ao voltarem para seu estado energético basal, as nanopartículas de ouro liberam energia na forma de calor. (AHMAD et al., 2013). Essa propriedade é particularmente interessante na terapia fototérmica, que pode ser aplicada para erradicação de células tumorais através do aquecimento local (LIU et al., 2013a), ou mesmo liberação de drogas acopladas à superfície das nanopartículas de ouro e formação de imagens da estrutura tecidual. (AHMAD et al., 2013). Tal estratégia terapêutica é capaz de confinar dosagens adequadas de calor especificamente no tumor, minimizando os efeitos da irradiação sobre os tecidos saudáveis ao redor. (MANUCHEHRABADI; ZHU, 2017). Devido às diferenças na propriedade de SPR, nanopartículas de ouro esféricas só absorvem luz de comprimentos de onda do espectro visível, podendo ser utilizadas apenas em tumores superficiais – uma vez que a penetração da luz em tecidos biológicos é diretamente proporcional ao comprimento de onda. Por outro lado, hastes/bastões absorvem luz de comprimentos de onda próximos ao infravermelho, permitindo o tratamento de tumores mais profundos. (YAO et al., 2016). Tais propriedades das

nanopartículas de ouro relacionadas à SPR - efetivamente espalhar luz, convertê-la em calor e alterar tanto campos eletromagnéticos locais próximos às suas superfícies quanto fenômenos lineares e não lineares - formam a base física para suas aplicações em teranóstica, uma tendência emergente na nanomedicina, onde um mesmo nanomaterial é capaz de executar funções diagnósticas e terapêuticas simultaneamente. (DYKMAN; KHLEBTSOV, 2016; GHARATAPE; SALEHI, 2017; GUO et al., 2017; LI; LIU; GAO, 2017; NOROUZI, 2020).

A maioria da literatura aborda nanopartículas de ouro no manejo e tratamento de câncer utilizando uma ou mais das estratégias descritas anteriormente. Entretanto, um efeito antitumoral inerente pode ser atribuído às nanopartículas de ouro. (NEL, 2006). Nanopartículas com capacidade de condução de elétrons (como as nanopartículas de ouro) têm a possibilidade de interagir com sítios ativos de doação e recepção de elétrons nas células, como os presentes nas mitocôndrias. A captura de elétrons por parte das nanopartículas pode levar à produção de grandes quantidades de espécies reativas derivadas do oxigênio, que conseqüentemente alteram o potencial de membrana mitocondrial, levando a danos estruturais na organela e morte celular programada ou mesmo necrose. (PAN et al., 2009; BALASUBRAMANI et al., 2014; ABEL et al., 2016). Em adição ao estresse oxidativo, nanopartículas de ouro podem gerar danos em macromoléculas, como proteínas, ácidos nucleicos, lipídeos de membrana, etc. (revisado por NEL et al., 2006). Portanto, tal efeito antitumoral inerente das nanopartículas de ouro está em geral fortemente associado à indução de citotoxicidade, o qual por sua vez é dependente da concentração utilizada. (JIA et al., 2017).

Muitos estudos têm sido realizados a fim de determinar a distribuição corporal e toxicidade de nanopartículas *in vivo*. Acredita-se que a toxicidade e a interação com tecidos biológicos e/ou efeito dependam do tamanho (CHEN et al., 2009; GENG et al., 2007; HUANG et al., 2012; NIIKURA et al., 2013; SONAVANE; TOMODA; MAKINO, 2008), formato (FLOREZ et al., 2012; GENG et al., 2007; KOLHAR et al., 2013; NIIKURA et al., 2013; STECKIEWICZ et al., 2019; ZHANG et al., 2008), concentração (LASAGNA-REEVES et al., 2010), agente funcionalizante (ZHANG et al., 2012), carga superficial (ALKILANY; MURPHY, 2010; GOODMAN et al., 2004) e via de administração (ZHANG et al., 2010). Entretanto, os resultados obtidos até então são controversos e não existe um consenso na literatura a respeito do assunto. (ALKILANY; MURPHY, 2010; CHEN et al., 2013, 2009; GOODMAN et al.,

2004; HUANG et al., 2012; LASAGNA-REEVES et al., 2010; SONAVANE; TOMODA; MAKINO, 2008; ZHANG et al., 2012). Mesmo estudos sistemáticos recentes ainda encontram dificuldades para compreender os principais fatores responsáveis por definir a internalização celular e toxicidade das nanopartículas de ouro. (CARNOVALE et al., 2019).

Devido às diversas vantagens e possibilidades de utilização de nanopartículas de ouro na nanomedicina, esse tipo de material tem sido investigado em alguns testes clínicos. Apesar da grande quantidade de pesquisas científicas, atualmente apenas três produtos à base de nanopartículas de ouro foram encontrados no *ClinicalTrials.gov* em fase ativa ou completa de teste clínico para utilização no tratamento de câncer: ácidos nucleicos dispostos na superfície de uma pequena nanopartícula de ouro esférica para tratamento de glioblastoma multiforme recorrente ou gliosarcoma (NCT03020017, 2017); infusão de partículas *AuroShell* para ablação térmica de neoplasias da próstata (NCT02680535, 2016); nanopartículas de ouro funcionalizadas com fator de necrose tumoral para tratamento de diversos tipos de câncer (NCT00436410, 2007). Até o momento, nenhum produto contendo nanopartículas de ouro foi aprovado para uso pelo FDA. (ANSELMO; MITRAGOTRI, 2019; BOBO et al., 2016). Esse fato provavelmente se deve aos vários desafios que impactam de forma relativamente semelhante o sucesso clínico de todos os tipos de nanomateriais. Tais desafios englobam, por exemplo, ter o controle sobre a biodistribuição após injeção intravenosa, capacidade de penetração através de barreiras biológicas, reprodutibilidade em humanos dos efeitos observados em animais, escalonamento dos processos de síntese e escolha do momento de introdução da terapia ao longo do curso de cada doença durante os testes clínicos. (ANSELMO; MITRAGOTRI, 2016).

2.2 MELANOMA

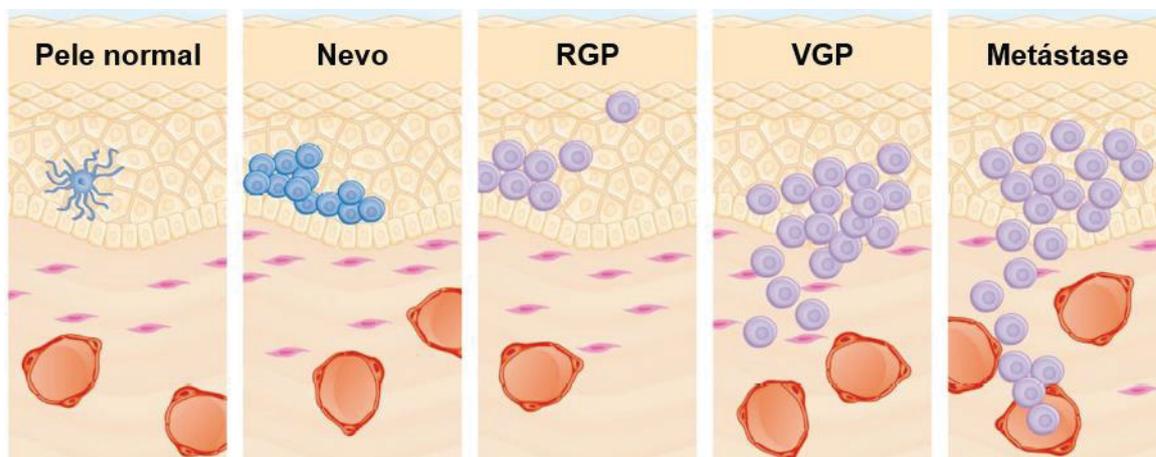
Os cânceres de pele podem ser do tipo não melanoma ou melanoma maligno (comumente chamado apenas de melanoma). Os do primeiro tipo compreendem principalmente os carcinomas de células basais e escamosas – além de outros tipos mais raros, como carcinoma de células de Merkel, linfomas cutâneos e sarcoma de Kaposi -, são mais frequentes, porém raramente letais, com possibilidade de tratamento cirúrgico, que pode ser doloroso e muitas vezes desfigurante. São

frequentes em partes do corpo comumente expostas ao sol, como orelhas, face, pescoço e antebraços. (MADAN; LEAR; SZEIMIES, 2010). O conjunto “câncer de pele” compreende incomparavelmente o tipo de câncer mais comum. (SKIN CANCER FOUNDATION, 2019). Cerca de 2 a 3 milhões de casos de câncer pele (incluindo melanoma e não melanoma) são diagnosticados mundialmente todos os anos, o que corresponde a um terço de todos os diagnósticos de câncer. (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2020a). Tal número vem aumentando ao longo dos anos, o que provavelmente se deve à melhora na detecção dos cânceres de pele, pessoas recebendo mais exposição ao sol e vivendo por mais tempo. (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2020a).

O melanoma, apesar de menos frequente, é a maior causa de morte por câncer de pele no mundo. (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2020b). O melanoma tem origem nos melanócitos, que são células encontradas predominantemente na pele e olhos, onde, dentre outras funções, produzem o pigmento responsável pela coloração, a melanina. (HOLMES, 2014). Na pele, os melanócitos residem na camada basal da epiderme e nos folículos pilosos, formando as unidades produtoras de melanina da epiderme e anexos. Esse tipo celular possui papel fundamental na proteção da pele contra os danos causados pelos raios UV e também na prevenção contra o câncer de pele. Parece contraditório que os melanócitos sejam os precursores do melanoma, porém, mutações em genes regulatórios do crescimento, produção autócrina de fatores de crescimento e a modulação de moléculas de adesão contribuem para a perturbação da sinalização intracelular. (GRAY-SCHOPFER; WELLBROCK; MARAIS, 2007; LEONARDI et al., 2018; SCHADENDORF et al., 2018). Consequentemente, os melanócitos podem passar a proliferar, formando nevos (pintas, Figura 2). A proliferação exacerbada pode ficar restrita à epiderme ou à derme, constituindo geralmente tumores benignos. Porém, podem progredir para a fase de crescimento radial (RGP, do inglês *radial growth phase*), formando uma lesão na epiderme, que pode envolver micro invasão na derme. Essas células podem passar a crescer verticalmente (VGP, do inglês *vertical growth phase*), com nódulos invadindo a derme, onde as células apresentam potencial metastático (formação de novos tumores em locais distantes), uma vez que têm acesso a vasos sanguíneos e linfáticos. (SHAIN; BASTIAN, 2016; ZAIDI; DAY; MERLINO, 2008). O diagnóstico e estadiamento (que varia de 0 a IV) do melanoma baseiam-se em 3 critérios: a profundidade da lesão primária e a

presença de ulceração (quanto mais profunda e ulcerada for a lesão, pior o prognóstico); a disseminação para os linfonodos próximos; e a disseminação (metástase) para locais distantes (principalmente pulmões, fígado, cérebro, ossos e linfonodos ou pele em outras partes do corpo). A taxa de sobrevivência após 5 anos para pacientes diagnosticados com melanoma localizado (nenhum sinal de que o câncer se espalhou para além do foco primário) é de 99%, sendo reduzida para 25% quando diagnosticado após disseminação para locais distantes. (revisado por AMERICAN CANCER SOCIETY, 2019, 2020).

FIGURA 2 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA PROGRESSÃO DO MELANOMA



FONTE: Adaptado de (ZAIDI; DAY; MERLINO, 2008), Copyright (2008), com permissão de Elsevier.

LEGENDA: A ilustração mostra a progressão do melanoma humano, que é imitado em alguns modelos de camundongo. A proliferação exacerbada de melanócitos normais, presumivelmente em resposta à radiação UV, resulta na formação de nevos benignos ou displásicos. O melanoma da fase de crescimento radial (RGP) exibe a capacidade de crescer intraepidemicamente, seguido pela invasão da derme na fase de crescimento vertical (VGP) e culminando na aquisição e capacidade metastática.

Determinar a presença de mutações relevantes terapeuticamente é um procedimento de rotina para muitos cânceres, particularmente para o melanoma. Embora algumas mutações tenham implicações terapêuticas claras, a maioria das mutações detectadas tem relevância clínica menos definida. A frequência de mutações somáticas em melanomas humanos é bastante elevada se comparada a outros tipos de câncer, variando amplamente de 0,1 a 100 mutações por megabase. (DAVIS et al., 2018). Os melanomas podem ser classificados em quatro subtipos genômicos clássicos, de acordo com a presença de mutações em genes

específicos: mutante em *BRAF* (mais frequente, representa 50% dos casos resulta na ativação da proteína), mutante em *NRAS* (25% dos casos, resulta na ativação da proteína), mutante em *NF1* (14% dos casos, resulta na perda de propriedades regulatórias da proteína, levando à ativação contínua de RAS), e tipo negativo (onde nenhuma das três mutações anteriores é encontrada). Os diferentes subtipos genômicos podem ter valor preditivo, dados os alvos terapêuticos atualmente disponíveis. (DAVIS et al., 2018; MACKIEWICZ; MACKIEWICZ, 2018; RAJKUMAR; WATSON, 2016; TCGA, 2015; THAKUR et al., 2019). Além dos fatores genéticos, vários marcadores epigenéticos também já foram descritos como contribuintes para o desenvolvimento e progressão do melanoma, como perda da hidroximetilação do DNA e altos níveis de metilação do DNA nas regiões promotoras de vários genes supressores de tumor, desregulação de micro RNAs e produção de RNAs não codificantes, modificações pós-traducionais de histonas e complexos de remodelação da cromatina. Tais biomarcadores epigenéticos também têm se mostrado úteis como ferramentas de prognóstico e predição de resultados terapêuticos. (FU et al., 2017; GREENBERG et al., 2014; KONSTANTINOV; ULFF-MØLLER; DIMITROV, 2016; MANNAVOLA et al., 2020; MICEVIC; THEODOSAKIS; BOSENBERG, 2017; XIN et al., 2016; ZHANG; ZHANG, 2016).

Os principais fatores de risco para o desenvolvimento de melanoma certamente são o comportamento de exposição a raios ultravioleta (UV) (WESTERDAHL et al., 2000; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2020b) – apesar de que o mecanismo preciso pelo qual tal exposição impulsiona a ocorrência e a progressão do melanoma ainda precisa ser elucidado (AUTIER; DORÉ, 2020) - e a presença de grande número de nevos, o que em grande parte se deve a fatores genéticos hereditários (BATAILLE, 2009; BAUER; GARBE, 2003). Porém, é provável que o melanoma seja causado por interações complexas entre fatores ambientais e genéticos. (BATAILLE, 2009). Alguns genes envolvidos na parada do ciclo celular e senescência dos melanócitos - *CDKN2A* e *CDK4* - são quase invariavelmente alvos de mutações somáticas durante a progressão do melanoma e são expressos no agrupamento familiar da doença. Entretanto, a base genética do melanoma é complexa e possui componentes herdados e adquiridos. (MEYLE; GULDBERG, 2009). Outros fatores podem ainda atuar tanto em conjunto quanto de forma independente da radiação UV no desenvolvimento da doença. Indivíduos de pele clara em geral tendem a produzir feomelanina ao invés de eumelanina. Tal fator

aumenta o risco de desenvolvimento de melanoma não só pela menor eficiência da feomelanina em bloquear os raios UV, mas também devido aos intermediários da sua via de biossíntese que geram estresse oxidativo e danos ao DNA. (revisado por ROIDER; FISHER, 2016). O sexo feminino é um fator de risco independente para o desenvolvimento de melanoma antes dos 45 anos. Entretanto, a partir dos 49 anos, mulheres apresentam melhor proteção contra a radiação UV, provavelmente devido às alterações hormonais que ocorrem nessa fase. (LIU-SMITH; ZIOGAS, 2020).

A incidência de melanoma tem aumentado constantemente ao longo dos últimos 50 anos, mas a mortalidade aumentou em uma extensão muito menor. Esse fato pode ser parcialmente resultante do "superdiagnóstico", onde lesões são diagnosticadas como cânceres, mesmo configurando quadros que não teriam causado mortalidade caso não tivessem sido removidas. (ELDER, 2018). O melanoma é mais frequente em populações de pele clara e em regiões de menor latitude (MATTHEWS et al., 2017), sendo que Austrália e países europeus apresentam as maiores taxas de mortalidade pela doença. (YANG et al., 2020). A incidência é maior entre as populações geriátricas, mas o melanoma também está entre os cânceres mais comuns encontrados nas populações de adolescentes e adultos jovens. (MATTHEWS et al., 2017). A mortalidade por melanoma é maior em homens do que mulheres em todo o mundo, sendo que tal disparidade sexual tem aumentado ao longo dos anos. (YANG et al., 2020). As estimativas mais recentes mostram que para o ano de 2018 eram esperados mundialmente aproximadamente 290 mil novos casos e 60 mil mortes por melanoma. (BRAY et al., 2018). Já no Brasil, a maior incidência tende a ser na região sul, onde mais de 70% da população é de origem caucasiana. (SANTOS; SOUZA, 2019). A estimativa de novos casos no país para 2020 é de 8.450, sendo 4.200 homens e 4.250 mulheres. (INCA, 2020).

2.2.1 Tratamentos vigentes para melanoma

O tratamento do câncer é um desafio contínuo, não apenas por causa da diversidade individual, mas também pela heterogeneidade do tumor e desenvolvimento de resistência. Levando isso em consideração, a oncologia de precisão apareceu como um conceito relativamente novo, centrado na personalização terapêutica. Com base na identificação e determinação de características relevantes que orientam o desenvolvimento e a evolução da doença,

informações prévias e análises de dados – sobre informações clínicas, de estilo de vida, genéticas e de biomarcadores adicionais, principalmente alvos moleculares frequentemente alterados nas células tumorais -, cada paciente pode receber o regime de tratamento mais apropriado. (KÖNIG et al., 2017).

Cerca de 80% dos casos de melanoma são tratados através de remoção cirúrgica quando diagnosticado precocemente. No entanto, esse procedimento pode deixar células circulantes com potencial metastático, que muitas vezes podem dar origem a novos tumores. (MAVERAKIS et al., 2015). Além disso, o melanoma geralmente apresenta alto número de metástases – de baixa acessibilidade e difícil detecção de pequenas lesões metastáticas por ferramentas de imagem comumente usadas -, o que impossibilita sua cura através de procedimentos cirúrgicos unicamente. (KOZAR et al., 2019). No caso do melanoma metastático, várias estratégias de tratamento são utilizadas, como quimioterapia, citocinas, moduladores do sistema imunológico e inibidores das vias de sinalização (DOMINGUES et al., 2018), dependendo do estágio da doença e da base genética de cada tumor. Aproximadamente metade dos pacientes com melanoma avançado apresenta mutação no gene *BRAF*. O tratamento com inibidores de *BRAF* isolados está associado à aquisição de resistência em metade dos pacientes após aproximadamente seis meses. (MACKIEWICZ; MACKIEWICZ, 2018). Já a utilização de duas combinações de inibidores aprovadas pelo FDA (vemurafenib com cobimetinib; e dabrafenib com trametinib) mostra melhora significativa nas taxas de resposta, sobrevida livre de progressão e sobrevida global, com uma sobrevida global mediana superior a 2 anos. (DAVIS et al., 2018; EROGLU; OZGUN, 2018). Historicamente, o melanoma é considerado um câncer imunorresponsivo e os pacientes com mutação em *BRAF* também respondem bem aos inibidores de pontos de checagem do sistema imunológico (anti-PD-1 ou anti-CTLA4) (DAVIS et al., 2018). Entretanto, é preciso mencionar que os pacientes tratados com bloqueadores de PD1 podem experimentar eventos adversos graves (e algumas vezes fatais) após apenas uma infusão. (SCHADENDORF; LIVINGSTONE; ZIMMER, 2019). Para os outros subtipos genéticos de melanoma (não mutados em *BRAF*), a terapia anti-PD1 com nivolumab ou pembrolizumab é o padrão de tratamento. Entretanto, ainda não confere um direcionamento eficaz. (DAVIS et al., 2018; MACKIEWICZ; MACKIEWICZ, 2018). Apesar da esperança depositada na medicina de precisão, atualmente apenas um subconjunto de pacientes com câncer se beneficia desse tipo

de abordagem terapêutica. Na melhor das hipóteses, pode-se esperar respostas de curta duração em uma pequena fração dos pacientes, com a inevitável toxicidade de terapias direcionadas e o custo elevado que essa abordagem garante. (PRASAD, 2016; WISE; SOLIT, 2019).

O tratamento para pacientes em estágios avançados da doença e que não apresentam resposta aos tratamentos modernos depende da quimioterapia clássica – temozolomida e dacarbazina (KOZAR et al., 2019) -, que geralmente é citotóxica para células com alta taxa de proliferação (ECCLES; WELCH, 2007). Porém, principalmente devido a não especificidade, esses medicamentos citotóxicos causam efeitos colaterais sistêmicos graves – principalmente náusea, cansaço, perda de cabelo, vômito, preocupação e falta de apetite, dentre muitos outros - (BROWN et al., 2001; COOPER; GEORGIU, 1992; HERLOFSON et al., 1997; JONES; OCEN, 2020; MCALLISTER et al., 2004; SCHIMMEL et al., 2004; TORINO et al., 2012), desenvolvimento de resistência a múltiplas drogas (ULLAH, 2008) e aumento significativo das chances de recorrência do tumor ou desenvolvimento de neoplasias secundárias (PENN, 1978). Apesar de as taxas de sobrevida apresentarem uma tendência de aumento (GLAZER et al., 2017), apenas um terço dos pacientes com melanoma avançado recrutados para ensaios clínicos ainda está vivo após 5 anos (SCHADENDORF; LIVINGSTONE; ZIMMER, 2019). Tanto na Austrália (país com maior prevalência mundial de melanoma) quanto no Brasil, estima-se que pacientes com melanoma metastático percam em torno de 20 anos de vida devido à doença. (THIAM et al., 2016). Além disso, particularmente pacientes com mau prognóstico – apresentando LDH alto, alta carga tumoral e/ou em múltiplos órgãos - ainda têm uma necessidade muito alta de cuidados médicos. Suas chances de obtenção de resposta clínica positiva e durável são baixas para qualquer medicamento disponível atualmente. (SCHADENDORF; LIVINGSTONE; ZIMMER, 2019). Portanto, faz-se necessário encontrar tratamentos seguros e eficazes que beneficiem esses pacientes.

3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Determinar e avaliar os parâmetros a seguir para GA-AuNSs e GA-AuNRs:

- A interação espacial entre a GA e a superfície das nanopartículas de ouro;
- A estabilidade dos nanomateriais após incubação sob condições de cultivo celular;

In vitro, a partir do tratamento de linhagens celulares:

- O potencial citotóxico de ampla faixa de concentrações;
- O padrão de internalização por células de melanoma;
- O potencial de afetar parâmetros funcionais de malignidade de células de melanoma (capacidades invasiva e de formação de colônias) sob condições não citotóxicas;

In vivo, a partir do tratamento de animais portadores de melanoma:

- O potencial de afetar o crescimento tumoral e a colonização pulmonar por células de melanoma;
- A biodistribuição das nanopartículas de ouro em animais portadores de melanoma;
- O potencial tóxico das doses utilizadas.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

A maior parte dos procedimentos experimentais do presente trabalho foi realizada nas dependências dos Laboratórios de Células Inflamatórias e Neoplásicas e de Polissacarídeos Sulfatados, localizados no Departamento de Biologia Celular da UFPR. Exceções encontram-se detalhadas na descrição da metodologia correspondente.

4.1 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DOS NANOMATERIAIS

4.1.1 Síntese de GA-AuNSs

A GA foi solubilizada em água ultrapura, dialisada por 48 horas contra água destilada através de membrana de diálise (corte de 12 a 14 kDa) e liofilizada. A síntese das GA-AuNSs foi realizada a partir da mistura de ácido cloroáurico (Sigma-Aldrich, $\text{HAuCl}_4 - 7,056 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$), em meio aquoso, na presença de GA (Sigma-Aldrich) a 0,04% (m/v), utilizando borohidreto de sódio ($\text{NaBH}_4 - 0,4 \text{ mmol L}^{-1}$) como agente redutor, seguida de agitação magnética por 30 minutos. (BARROS et al., 2016a). A dispersão obtida foi lavada uma vez com água ultrapura utilizando tubos de centrifugação Amicon-Ultra com membrana para retenção de moléculas maiores que 10 kDa e em seguida concentrada em 10 ou 60 vezes (obtenção de volume final 10 ou 60 vezes menor do que o inicial, para experimentos *in vitro* e *in vivo*, respectivamente) por centrifugação a 5000 rpm por 15 minutos a 4°C. Em média, os volumes de síntese de cada lote para os experimentos *in vitro* e *in vivo* foram de cerca de 60 e 1800 mL, resultando em 6 e 30 mL de volume final após concentração, respectivamente. Um processo típico de síntese e concentração de GA-AuNSs (cerca de 200 mL) pode ser realizado em menos de 4 horas. A esterilização da suspensão de GA-AuNSs, bem como da solução de GA utilizada com controle, foi feita por filtração através de membrana de PVDF com poros de 0,22 μm .

A concentração de ouro nas amostras foi determinada por espectroscopia de emissão óptica por plasma acoplado indutivamente (ICP-OES) no Departamento de Química da UFPR. As amostras foram diluídas na proporção de 1:10 em água ultrapura (1 mL de suspensão de nanopartículas : 9 mL de água) para a

quantificação, que foi feita a partir de comparação a uma curva analítica de ouro (0-40 mg L⁻¹).

4.1.2 Síntese de AuNRs e funcionalização com GA

A síntese foi realizada segundo o método *seed-mediated* pelo Grupo de Catálise e Reatividade Química do Instituto de Química e Biotecnologia da Universidade Federal do Alagoas (UFAL). Foi preparada solução *seed* na presença de HAuCl₄, brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) e NaBH₄ como agente redutor. A solução *growth* foi preparada na presença de CTAB, HAuCl₄ e nitrato de prata (AgNO₃) e solução *seed*. (SILVA et al., 2013). Em seguida, em condições estéreis, a suspensão de AuNRs foi centrifugada a 10000 rpm por 3 minutos e lavada 1 vez com água ultrapura (também por centrifugação) para remoção do excesso de CTAB. O *pellet* obtido foi ressuspenso em solução de GA 0,4% (previamente esterilizada por filtração através de membrana de PVDF com poros de 0,22 µm). Um processo típico de síntese e concentração de AuNRs (cerca de 200 mL), seguido de lavagem e funcionalização com GA pode ser realizado em cerca de 10 horas.

Para determinação da concentração de ouro, as amostras foram diluídas na proporção de 1:15 (1 mL de suspensão de nanopartículas : 14 mL de água) em água ultrapura e quantificadas por ICP-OES da mesma forma descrita para GA-AuNSs.

4.1.3 Caracterização dos nanomateriais

A caracterização dos nanomateriais obtidos foi feita por espectroscopia de UV-visível (no laboratório do Grupo de Pesquisa em Macromoléculas e Interfaces da UFPR) e microscopia eletrônica de transmissão (MET) (no Centro de Microscopia Eletrônica da UFPR, CME-UFPR) após contrastação negativa com acetato de uranila 2% em água – para evidenciar a GA. (GASHUA; WILLIAMS; BALDWIN, 2016). Para quantificação de tamanho, mais de 5 mil AuNSs e 400 AuNRs foram medidos a partir de dezenas de imagens de MET utilizando o programa Fiji. (SCHINDELIN et al., 2012).

4.1.4 Estabilidade dos nanomateriais em condições de cultivo celular

Suspensões de GA-AuNSs ou GA-AuNRs nas concentrações de 122 e 90 mg L⁻¹, respectivamente, foram misturadas a meio de cultura *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) sem vermelho de fenol (VF) contendo 10% de soro fetal bovino (SFB) previamente centrifugado a 2500 rpm por 10 minutos para remoção de precipitados proteicos (meio de cultura completo). As misturas foram feitas na proporção de 1 parte de suspensão de cada nanomaterial para 4 partes de meio de cultura completo. O procedimento foi feito sob condições estéreis e as misturas foram mantidas em tubos de centrifugação semiabertos em incubadora úmida a 37°C e 5% de CO₂ por 4 dias. O perfil de absorvância das amostras foi medido por espectroscopia de UV-visível usando o mesmo meio como branco. A leitura de cada amostra foi então comparada ao perfil de absorvância da mesma amostra diluída em água nas mesmas condições. Amostras preparadas da mesma maneira foram utilizadas para análise de espalhamento de raios-X a baixo ângulo (SAXS) na linha de luz D01A-SAXS1 do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS), em Campinas-SP. As medições foram realizadas à temperatura ambiente. O feixe espalhado ($\lambda = 0,1448$ nm) foi detectado a fim de cobrir um intervalo de vetores de espalhamento [$q = (4\pi / \lambda) \sin\theta$, em que 2θ é o ângulo de espalhamento] de 0,039 a 5,060 nm⁻¹. Correções de transmissão, corrente escura e célula de amostra foram realizadas. A imagem de dispersão normalizada das amostras foi então subtraída da imagem de dispersão normalizada de água pura ou meio completo e o resultado isotrópico foi radialmente medido para obter $I(q)$ vs q .

4.2 ENSAIOS IN VITRO

4.2.1 Cultivo celular e exposição *in vitro* aos nanomateriais

As células de linhagem murinas de melanoma B16-F10 (BCRJ, 0046) e de fibroblastos Balb/3T3 (clone A31, ATCC, CCL-163) foram cultivadas em meio de cultura DMEM contendo 1,5 g L⁻¹ de bicarbonato de sódio, 1 U mL⁻¹ de penicilina e 1 µg mL⁻¹ de streptomina, e 10% de SFB previamente centrifugado a 2500 rpm por 10 minutos. As células foram mantidas à 37°C em atmosfera úmida com 5% de CO₂. As células foram mantidas em cultura até a quinta passagem e subcultivadas sempre ao atingir confluência de 70-80%. As diferentes concentrações dos nanomateriais foram preparadas a partir de diluições seriadas (na proporção 1:10)

em solução de GA 0,4%. (ICCVAM, 2006). Para exposição celular *in vitro*, as suspensões dos nanomateriais foram sempre adicionadas ao meio de cultivo celular na proporção de 20% em relação ao volume final de líquido do recipiente utilizado para aquele respectivo ensaio. Solução de GA 0,4% foi utilizada como controle em todos os ensaios *in vitro* (também na proporção de 20%). Para todos os ensaios biológicos foram utilizados pelo menos 3 lotes de cada nanomaterial sintetizados independentemente.

4.2.2 Ensaio de viabilidade e proliferação celular

Células B16-F10 ou Balb/3T3 foram plaqueadas em placas de 96 poços nas densidades de $1,2 \times 10^3$ e 6×10^3 células/cm², respectivamente. Seis horas após o plaqueamento, as suspensões de GA-AuNSs (de $2,44 \text{ ng L}^{-1}$ a $24,4 \text{ mg L}^{-1}$) ou GA-AuNRs (de $1,8 \text{ ng L}^{-1}$ a 18 mg L^{-1}) foram adicionadas. As células cresceram na presença dos nanomateriais por 96 horas. A viabilidade celular foi medida através da capacidade de retenção celular do corante vermelho neutro (VN). (REPETTO; DEL PESO; ZURITA, 2008). As células foram incubadas com solução de VN $0,04 \text{ mg mL}^{-1}$ por 2 horas. O corante retido pelas células foi eluído em solução 50% etanol/1% ácido acético glacial e a absorbância lida em espectrofotômetro de microplacas em comprimento de onda de 540 nm. A determinação da quantidade de células presente em cada grupo de exposição foi feita por coloração com cristal violeta (CV). (VEGA-AVILA; PUGSLEY, 2011). As células foram coradas com solução de CV $0,25 \text{ mg mL}^{-1}$ por 20 minutos, o corante foi eluído em solução de ácido acético glacial 33% e a absorbância lida em espectrofotômetro de microplacas em comprimento de onda de 570 nm.

4.2.3 Processamento das células para microscopia eletrônica de transmissão (MET)

Células B16-F10 foram cultivadas na presença de GA-AuNSs ($24,4 \text{ mg L}^{-1}$) ou GA-AuNRs ($1,8 \text{ mg L}^{-1}$) por 96 horas em garrafas de cultivo de 25 cm^2 . As células foram então fixadas com glutaraldeído 2,5% e destacadas das garrafas utilizando *cell scraper*. Posteriormente, no Laboratório de Biologia Celular do Instituto Carlos Chagas (ICC/Fiocruz), as células foram pós-fixadas com tetróxido de ósmio 1% e desidratadas em bateria de concentrações crescentes de etanol e acetona. O

material foi incluído em resina Epon e polimerizado por 48 horas a 60°C. As amostras foram cortadas por ultramicrotomia e observadas por MET no CME-UFPR sem a utilização de agentes contrastantes.

4.2.4 Processamento de material biológico para microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Células B16-F10 foram plaqueadas sobre lamínulas circulares de vidro e cultivadas na presença de GA-AuNRs (0,018 a 1,8 mg L⁻¹) por 96 horas. As células foram então fixadas com glutaraldeído 2,5%, pós-fixadas com tetróxido de ósmio 1% e desidratadas em bateria de concentrações crescentes de etanol. As amostras foram submetidas à desidratação por ponto crítico de CO₂ e então metalizadas com ouro. As imagens foram obtidas por MEV no CME-UFPR.

4.2.5 Quantificação de ouro internalizado pelas células tumorais

A quantidade de ouro internalizada pelas células de melanoma após exposição *in vitro* aos nanomateriais foi quantificada por ICP-OES. As células B16-F10 foram cultivadas em garrafas de 175 cm² na presença de GA-AuNSs ou GA-AuNRs (1,8 µg L⁻¹ a 24,4 mg L⁻¹, variando de acordo com a abordagem experimental – especificações nas respectivas legendas dos resultados) por 6 ou 96 horas em condições de cultivo a 37°C. Adicionalmente, grupos de células foram incubadas com 18 mg L⁻¹ de GA-AuNSs ou GA-AuNRs por 6 horas sobre gelo para reduzir a fluidez de membrana e, conseqüentemente, impedir processos de endocitose. As células foram soltas usando 2 mM de EDTA em PBS por 10 minutos e então fixadas em solução contendo 50% de etanol e 1% de ácido acético glacial em água, *overnight*. As suspensões celulares foram centrifugadas e os *pellets* ressuspensos em 1 mL de água ultrapura, seguido de contagem em câmara de Neubauer. Todo o conteúdo celular de cada amostra foi misturado com 5 mL de água régia (3 HCl : 1 HNO₃) (BAIKA et al., 2016) e fervido em placa aquecedora por 15 minutos para digestão dos componentes orgânicos. O volume foi completado para 50 mL com água ultrapura. A concentração de ouro presente nas soluções foi quantificada por ICP-OES comparando a uma curva analítica de ouro. A massa de ouro obtida foi dividida pela quantidade total de células utilizada de cada respectiva amostra.

4.2.6 Marcação fluorescente da GA e determinação da sua internalização pelas células tumorais

Para estudar a captação celular, a GA foi covalentemente marcada usando isotiocianato de rodamina B (RBITC) após a síntese de GA-AuNSs. Para isso, as GA-AuNSs foram lavadas em tampão de carbonato de sódio (pH 8,5) e então foi adicionado $0,2 \text{ mg mL}^{-1}$ de RBITC (Sigma-Aldrich) e incubado *overnight*, a temperatura ambiente e protegido da luz sob agitação constante. A suspensão obtida foi lavada várias vezes com água ultrapura por centrifugação em tubos Amicon-Ultra de 10 kDa por 15 minutos a 5000 rpm e 4°C , até que todo o corante livre fosse removido. O volume final foi mantido igual ao inicial. A concentração de ouro na suspensão de GA-AuNSs@RBITC obtida foi determinada por ICP-OES, comparando a uma curva analítica de ouro.

Para acompanhar a internalização da GA, células B16-F10 cultivadas sobre lamínulas circulares de vidro (confluência de aproximadamente 80%) foram expostas a $2,44 \text{ mg L}^{-1}$ de GA-AuNSs@RBITC por 1 hora a 37°C e depois lavadas com DMEM para remover o excesso, incubadas com $3,3 \text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ de Lectina WGA 488 (Thermo Fisher Scientific, de acordo com instruções do fabricante) por 40 minutos para marcar a membrana celular, lavadas novamente com DMEM e finalmente fixadas com paraformaldeído a 2% em PBS por 20 minutos. As lâminas foram preparadas usando meio de montagem FluormountG contendo DAPI (E.M.S.). As imagens de fluorescência foram obtidas por microscopia de varredura a laser confocal.

4.2.7 Ensaio de invasão

A capacidade invasiva das células de melanoma B16-F10 foi determinada por ensaio de invasão através de barreira de Matrigel. (adaptado de JUSTUS et al., 2014). Insetos tipo *transwell* com poros de $8 \text{ }\mu\text{m}$ (Millipore) foram revestidos com $35 \text{ }\mu\text{L}$ de Matrigel (Corning) a $2,6 \text{ mg mL}^{-1}$ em DMEM. A solução foi geleificada em agitador de microplacas por 1,5 horas a 30°C . As células foram soltas utilizando solução de EDTA 2 mM em PBS e ressuspendidas em DMEM. Em seguida, 8×10^4 células foram plaqueadas no interior de cada inserto na presença de GA-AuNSs ou GA-AuNRs. DMEM contendo 10% de SFB foi adicionado aos poços (parte externa

dos insertos) como quimioatratador. As células foram incubadas por 72 horas, em seguida fixadas com paraformaldeído (PFA) 2% por 30 minutos e marcadas com ActinGreen™ 488 (Thermo Fisher Scientific – para citoesqueleto de actina, 1 gota para cada 2 mL de solução) e DAPI (para núcleo, 5 mg mL⁻¹) em PBS contendo 0,01% de saponina, por 30 minutos. As células da porção superior do inserto (que não invadiram) foram removidas mecanicamente, com o auxílio de hastes flexíveis com ponta de algodão. As lâminas montadas com Fluormount-G foram escaneadas no Centro de Tecnologias Avançadas em Fluorescência (CTAF-UFPR). A densidade de células que invadiram foi determinada a partir da quantificação dos núcleos usando programa Fiji (SCHINDELIN et al., 2012) e normalização pela área de cada inserto analisado.

4.2.8 Ensaio de formação de colônias

A capacidade das células de melanoma B16-F10 de formação de colônias de forma independente de ancoragem foi determinada utilizando *AlgiMatrix 3D Culture System* (Gibco), de acordo com instruções do fabricante. Suspensões contendo 2,5x10³ células em DMEM com 10% de SFB foram adicionadas à placa na presença de GA-AuNSs ou GA-AuNRs e 10% (v/v) de tampão firmador para o *AlgiMatrix*. As células foram incubadas por 6 dias, sendo que o meio contendo os nanomateriais foi substituído no terceiro dia. As colônias de melanoma formadas foram fixadas com paraformaldeído 1% *overnight* a 4°C e então coradas com CV 0,25 mg mL⁻¹ por 1 hora. O excesso de corante foi lavado com água destilada e os *AlgiMatrix* foram fotografados sobre placa de Petri com fundo quadriculado (usada como escala de tamanho) utilizando câmera digital. A quantidade e tamanho das colônias foram determinados usando programa Fiji. (SCHINDELIN et al., 2012).

4.3 ENSAIOS IN VIVO

Os procedimentos experimentais *in vivo* utilizados no presente trabalho foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná (CEUA/BIO – UFPR), instituída pela Resolução N° 86/11 do Conselho de Ensino Pesquisa e Extensão (CEPE), estando de acordo com a Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para

fins Científicos e Didáticos (DBCA) - estabelecida pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) - e com as normas internacionais para a experimentação animal. Número do processo: 23075.005502/2019-77 (CEUA 1258).

4.3.1 Indução tumoral

Os ensaios *in vivo* foram realizados utilizando modelo duplo de melanoma (tumor primário e colonização pulmonar simultaneamente no mesmo animal) (CAISOVA et al., 2019; KUDO-SAITO et al., 2009, 2018; KUDO-SAITO; FUWA; KAWAKAMI, 2016), com o intuito de simular a situação de um indivíduo que apresenta tanto um tumor primário quanto focos metastáticos. Camundongos isogênicos da linhagem C57BL/6 com idade de 8-10 semanas (cada experimento independente foi composto inteiramente por machos ou fêmeas) foram utilizados (4-8 animais por grupo). Os animais foram alimentados com ração e água filtrada *ad libitum* e mantidos no biotério do Setor de Ciências Biológicas da UFPR.

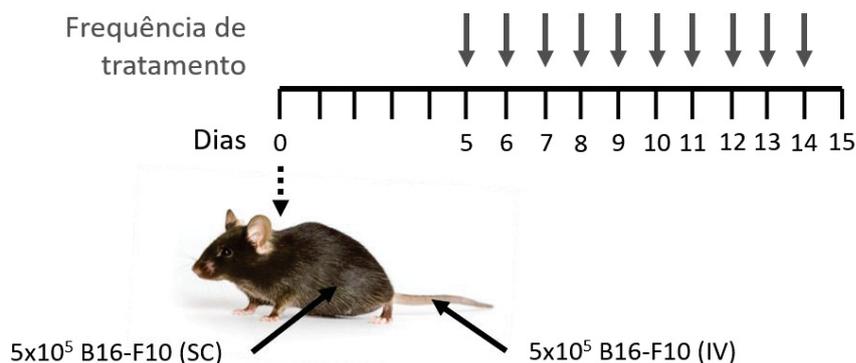
O efeito antimetastático de GA-AuNSs e GA-AuNRs foi avaliado utilizando o modelo de colonização pulmonar. Para tal, células B16-F10 foram cultivadas em garrafas de 175 cm² e, ao atingir fase exponencial de crescimento, foram soltas com tripsina, lavadas duas vezes com PBS gelado e contadas em câmara de Neubauer. Suspensões contendo 5x10⁶ células/mL em PBS foram preparadas. Após contenção dos animais em suporte próprio para camundongos, 100 µL da suspensão de células (5x10⁵) foram inoculados intravenosamente em uma das veias caudais laterais (Figura 3). Já o efeito antitumoral de GA-AuNSs e GA-AuNRs foi avaliado utilizando o modelo de tumor primário subcutâneo. Para tal, logo após a inoculação intravenosa das células, os camundongos foram retirados do suporte, contidos manualmente e então 100 µL da mesma suspensão de células (5x10⁵) foram injetados subcutaneamente na região dorsolateral de cada camundongo (Figura 3). A região da pele destinada à inoculação das células havia sido previamente depilada utilizando lâminas de barbear logo antes do início do experimento. Nenhum tipo de sedativo ou anestesia foi utilizado durante a inoculação das células de melanoma para ambos os modelos.

Após 6 dias da inoculação, os tumores subcutâneos foram medidos para o acompanhamento do crescimento tumoral. Para tal, os camundongos eram contidos

manualmente e então eram obtidas as medidas de diâmetro do tumor (maior e menor diâmetro, em sentido paralelo ao corpo do animal) utilizando paquímetro digital. As medidas eram obtidas a cada 2 dias, sempre pela mesma pessoa, até o final do experimento.

4.3.2 Grupos experimentais e protocolos de administração

Os animais foram divididos nos seguintes grupos experimentais de forma randômica (uma mesma gaiola continha animais de diferentes grupos): não tratado (PBS, controle), dacarbazina (Sigma-Aldrich, DTIC - 80 mg/kg, controle positivo), GA (veículo - 100 mg/kg, que é a mesma quantidade presente nas suspensões de nanopartículas de ouro), GA-AuNSs (0,03; 0,3 ou 3 mg de ouro/kg) e GA-AuNRs (0,2 ou 2 mg de ouro/kg). As doses escolhidas dos nanomateriais basearam-se na recomendação do *Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods* (ICCVAM) para extrapolação de concentrações de compostos utilizados *in vitro* para doses a serem utilizadas *in vivo*. (NIEHS, 2001). Segundo esse guia, cada 1 mg/L utilizado *in vitro* corresponde a aproximadamente 1 mg/kg *in vivo*. Dessa forma, a maior dose de GA-AuNSs e GA-AuNRs escolhida (3 e 2 mg/kg, respectivamente) foi baseada na maior concentração não citotóxica observada *in vitro* (2,44 e 1,8 mg/L, respectivamente, arredondadas para mais). A partir dessa maior dose, outras (10 vezes menores) foram também testadas. Todas as soluções injetadas nos animais foram misturadas com PBS estéril concentrado de forma a se tornarem isotônicas em relação aos fluidos corporais, e com pH 7-7,4. Iniciando no quinto dia após a inoculação das células, 100 µL das respectivas soluções foram administrados aos animais diariamente, uma vez por dia, até o décimo quarto dia (Figura 3). A exposição dos animais aos nanomateriais testados foi através de injeção intravenosa (IV – válido também para PBS e GA), a qual apresenta menores efeitos citotóxicos se comparado às administrações oral ou intraperitoneal. (ZHANG et al., 2010). As soluções foram preparadas um dia antes do início do período exposição, armazenadas a 4°C, e foram administradas intravenosamente em uma das veias caudais laterais após imobilização utilizando contentor próprio para camundongos. A solução de DTIC (dissolvida em PBS contendo 85,7 mM de HCl, de acordo com a recomendação do fabricante) foi sempre preparada no momento do uso e administrada via intraperitoneal.

FIGURA 3 - DESENHO EXPERIMENTAL DOS ENSAIOS *IN VIVO*

FONTE: A autora (2020).

LEGENDA: Os ensaios *in vivo* foram feitos utilizando modelo duplo de melanoma (tumor primário e colonização pulmonar simultaneamente no mesmo animal) em camundongos C57BL/6. Inicialmente (dia 0), células de melanoma murino B16-F10 foram inoculadas tanto subcutaneamente (SC) quanto intravenosamente (IV), para o desenvolvimento do tumor primário e colonização pulmonar, respectivamente. Passados 5 dias, os animais passaram a receber injeções diárias com as respectivas soluções experimentais ou controles pelos próximos 10 dias. Ao final do experimento (dia 15), amostras biológicas foram coletadas para análises.

4.3.3 Coleta das amostras biológicas

No décimo quinto dia após a inoculação das células, os animais foram pesados e então anestesiados com 100 mg/Kg de cetamina e 20 mg/kg de xilazina. A cavidade peritoneal foi aberta e o sangue coletado a partir da veia cava utilizando seringas previamente heparinizadas. O sangue foi armazenado em tubos de coleta a vácuo contendo ácido etileno-diamino-tetraacético dipotássico (EDTA K2). Os animais foram então sacrificados por perfuração do diafragma, seguido da coleta dos órgãos (baço, rins, fígado, pulmão, coração e tumor) por dissecação. Os órgãos foram pesados em balança analítica e posteriormente fixados em Fekete (58% de etanol 95%; 8% de formaldeído 37%; 4% de ácido acético glacial; 22% de água destilada), pois esse fixador clareia os tecidos, evidenciando os focos metastáticos de melanoma (que permanecem escuros devido à melanina). (OVERWIJK; RESTIFO, 2000).

4.3.4 Quantificação da colonização pulmonar (metástase)

A contagem dos nódulos pulmonares superficiais foi feita visualmente sob lupa. Para a quantificação da área superficial dos pulmões ocupada por focos

metastáticos, as vistas dorsal e ventral dos pulmões fixados foram fotografadas sobre papel milimetrado (que serviu como referência de escala para as análises de imagem). A área de metástase foi quantificada usando o *plugin* Trainable Weka Segmentation (ARGANDA-CARRERAS et al., 2017) do programa Fiji (SCHINDELIN et al., 2012). Para tal, as áreas totais do pulmão e das metástases superficiais de melanoma foram quantificadas através de classificação de cores de cada imagem. Em seguida, a porcentagem da superfície pulmonar coberta por metástase foi calculada dividindo a área de metástase pela área total do pulmão (ambas obtidas a partir do somatório da quantificação das vistas ventral e dorsal do mesmo pulmão) e multiplicando por 100.

4.3.5 Processamento histológico

Para análise histológica, tumores e pulmões foram submetidos em bateria de desidratação consistindo de incubações - na proporção de 1 parte de material para 5 partes de solução - em concentrações crescentes de etanol, depois xilol e incluídos e emblocados. Brevemente, os órgãos passaram por uma incubação de 30 minutos em etanol 70%, seguido por incubações de 90 minutos cada em etanol 80%, 90% e 95%, três incubações em etanol 100% por 1 hora, uma incubação de 1 hora em etanol e xilol na proporção 1:1, duas incubações em xilol - um de 30 minutos e o segundo de 15 minutos - para então serem incluídos em Paraplast Plus (Sigma-Aldrich) através de duas incubações de 2 horas cada. Os materiais foram então seccionados (7 μ m de espessura) por microtomia. Os cortes histológicos de tumores e pulmões foram montados em lâminas histológicas e corados com hematoxilina-eosina (HE) ou Fontana-Masson, respectivamente.

Para coloração com HE, as lâminas foram desparafinizadas com duas incubações de 5 minutos cada em xilol, seguidas por xilol e etanol 1:1, duas incubações em etanol 100% e incubações em etanol 95%, 90%, 80% e 70%. Posteriormente, as lâminas foram lavadas com água destilada e coradas com hematoxilina por 1 minuto, lavadas novamente com água destilada, coradas com eosina-floxina por 30 segundos e finalmente lavadas duas vezes com água destilada, seguido de desidratação com etanol 70%, 80% e 90% por 30 segundos, etanol 95% por 3 minutos, etanol 100% por duas vezes por 5 minutos, etanol e xilol 1:1 por 5 minutos e duas vezes em xilol por 5 minutos. Para a coloração com

Fontana-Masson, as lâminas foram desparafinizadas, lavadas com água destilada e incubadas com nitrato de prata a 5% por 1 hora a 56°C, seguido de incubação com tiosulfato de sódio a 2% por 2 minutos, enxague rápido com água destilada, e então coradas com vermelho neutro a 1% por 3 minutos e desidratadas como descrito anteriormente. As lâminas foram montadas usando meio de montagem Entellan. As imagens foram obtidas usando scanner Metafer VSlide e microscópio Zeiss Axio Imager Z2 no CTAF-UFPR.

4.3.6 Quantificação de ouro nos tecidos

A quantidade de ouro presente nos tecidos após exposição *in vivo* aos nanomateriais foi quantificada por ICP-OES. Porções dos órgãos fixados foram pesadas, maceradas utilizando pinça e tesoura e então misturadas com 5 mL de água régia (3 HCl : 1 HNO₃) (BAIKA et al., 2016) e fervidas em placa aquecedora por 25 minutos para digestão dos componentes orgânicos. O volume foi completado para 50 mL com água ultrapura. A concentração de ouro presente nas soluções foi quantificada por ICP-OES comparando a uma curva analítica de ouro. A massa de ouro obtida foi dividida pela massa utilizada de cada respectivo órgão.

4.3.7 Análises sanguíneas

O hemograma completo e o perfil bioquímico plasmático (alanina aminotransferase - ALT, aspartato aminotransferase - AST e creatinina) foram realizados no Hospital Veterinário da UFPR, sob responsabilidade da Prof^a. Dr^a. Rosangela Locatelli Dittrich e do MSc. Olair Carlos Beltrame. O perfil bioquímico foi realizado a partir do plasma sanguíneo - que foi obtido após centrifugação do sangue a 3000 g por 10 minutos -, usando um analisador químico (Mindray BS-200), de acordo com as instruções do fabricante dos kits para análise cinética de cada molécula (Bioclin). (MARTINS et al., 2015).

4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As amostras expostas aos nanomateriais em estudo foram comparadas ao respectivo controle (GA 0,4% para os ensaios *in vitro* e GA 100 mg/kg para os

ensaios *in vivo*) de cada experimento independente. Nos ensaios onde os dados experimentais foram normalizados pelo controle, teste t pareado foi utilizado para comparar os grupos estatisticamente. Para ensaios não normalizados foi utilizado o teste Mann-Whitney. As curvas de crescimento tumoral foram comparadas utilizando teste *two-way* ANOVA com pós teste Dunnett's para múltiplas comparações. Valores de p menores do que 0,05 foram considerados estatisticamente significativos.

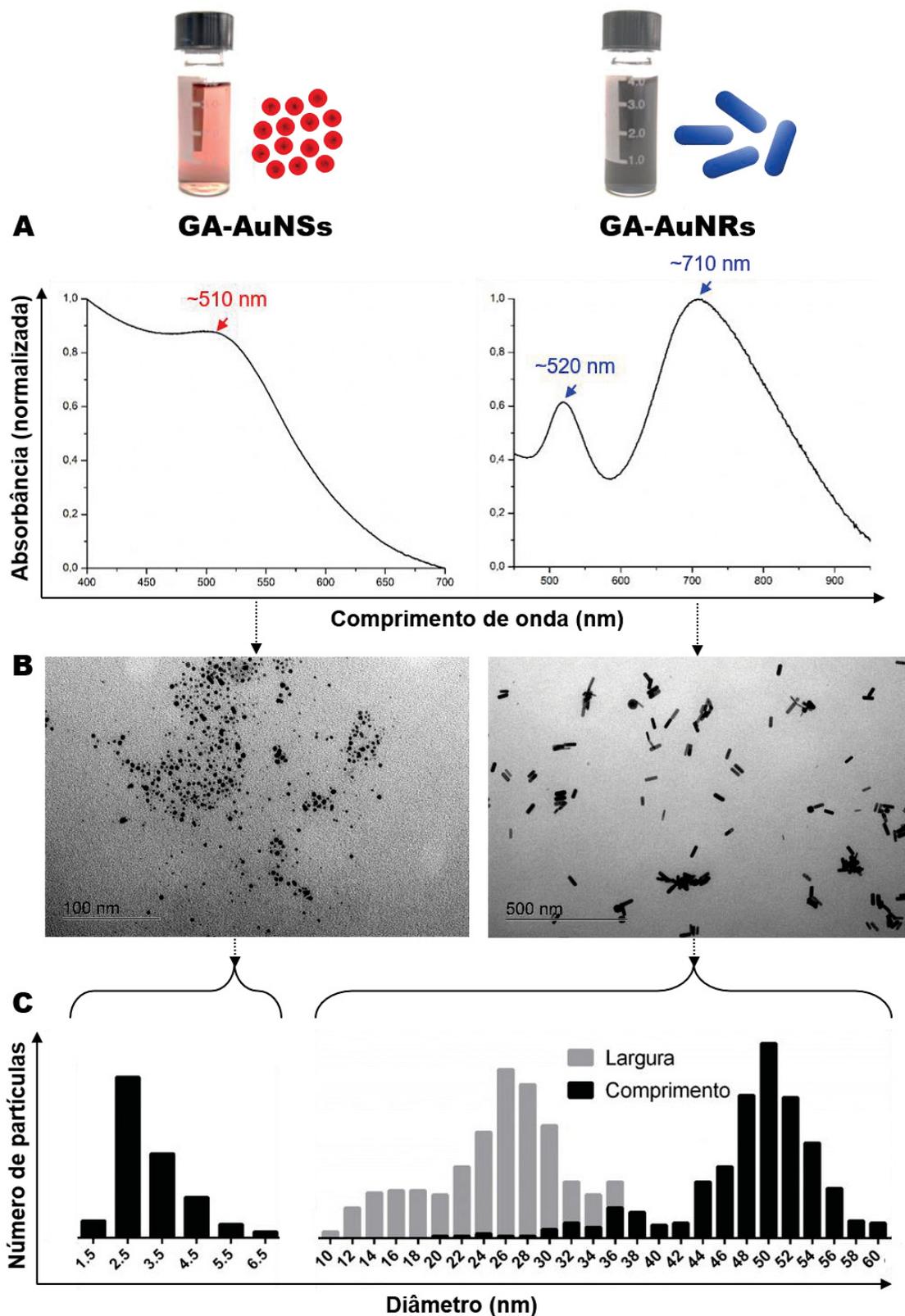
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados apresentados a seguir mostram de forma comparativa: como ocorre a interação entre as diferentes nanopartículas de ouro (AuNSs e AuNRs) com a GA; a estabilidade dos nanomateriais em ambiente biológico; sua citotoxicidade para células tumorais e não tumorais; seu padrão de internalização por células tumorais; como, em condições não citotóxicas, as nanopartículas de ouro afetam parâmetros de malignidade de células tumorais *in vitro*; seu potencial antitumoral e antimetastático *in vivo*, bem como sua toxicidade para animais portadores de tumor.

5.1 CARACTERIZAÇÃO DOS NANOMATERIAIS

A síntese e caracterização de ambos os nanomateriais objetos de estudo desse trabalho haviam sido descritas em trabalhos anteriores – GA-AuNSs por Barros et al. (2016) e GA-AuNRs por Barros et al. (2016) e Silva et al. (2013). Os resultados obtidos aqui mostram que as AuNSs apresentam absorção máxima no espectro de UV-visível em torno de 510 nm (Figura 4A), com diâmetro mediano de 2,9 nm (Figura 4 B e C) obtido através de microscopia eletrônica de transmissão. Já O espectro de absorbância em UV-visível característico de AuNRs apresenta duas bandas, uma em menor (referente à absorbância da face de menor dimensão) e outra em maior comprimento de onda (referente à absorbância da face de maior dimensão): 520 e 710 nm, respectivamente (Figura 4A). O tamanho mediano dos AuNRs é de 49,7 x 25,8 nm (Figura 4 B e C).

FIGURA 4 - CARACTERIZAÇÃO DE GA-AuNSs E GA-AuNRs



FONTE: A autora (2020).

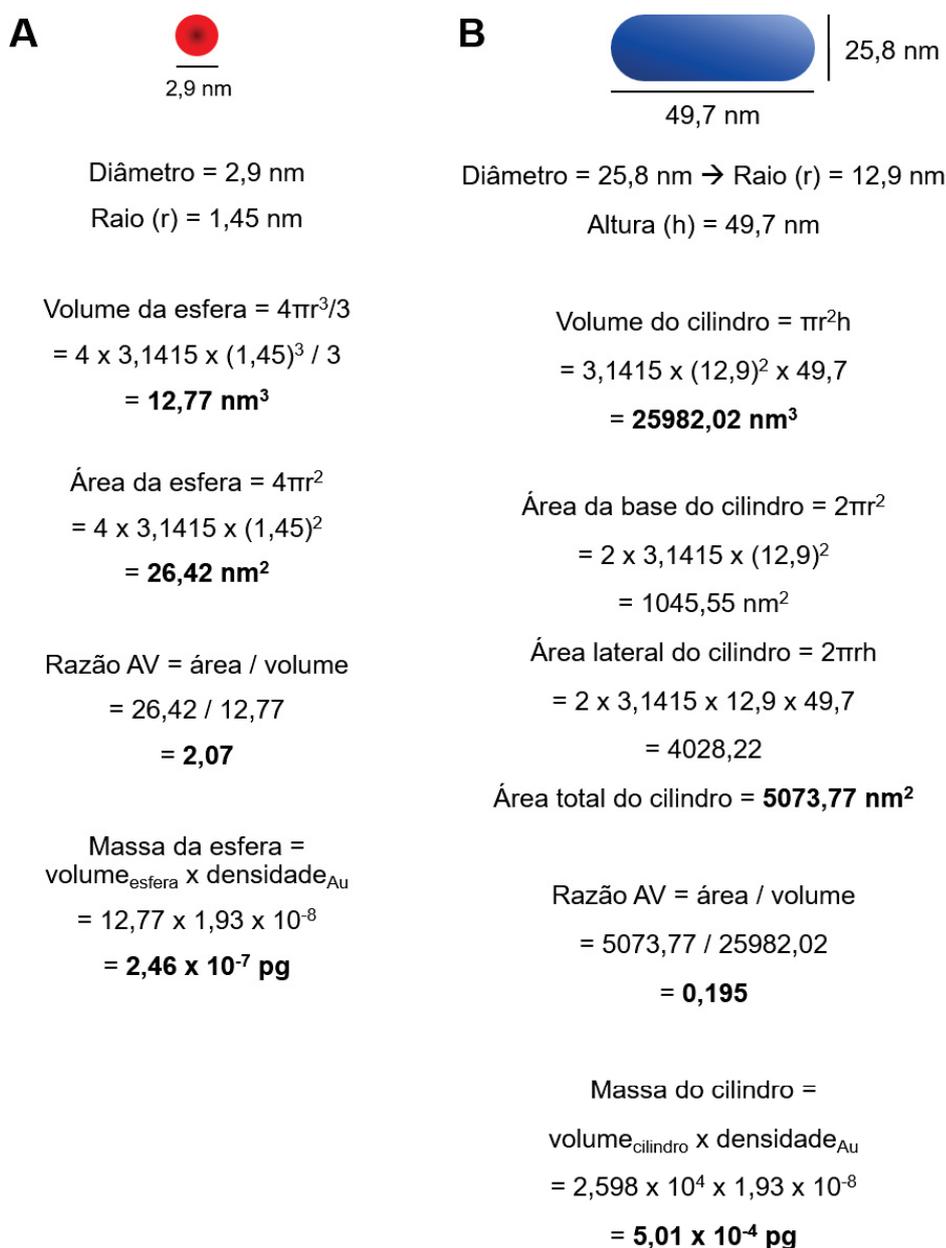
LEGENDA: GA-AuNSs e GA-AuNRs foram sintetizados quimicamente. A) Espectro de absorbância em UV-visível. B) Imagens de MET. C) Distribuição de tamanho de cada nanopartícula obtida a partir das imagens de MET. Os dados mostrados são representativos de pelo menos 10 lotes de síntese independentes de cada nanomaterial.

A fim de enriquecer a comparação entre os dois nanomateriais metálicos e enfatizar suas diferenças, foram estimados alguns parâmetros dimensionais das nanopartículas de ouro. Os valores de tamanho obtidos pelas imagens de MET foram utilizados para o cálculo de informações adicionais sobre cada nanopartícula de ouro: volume, área superficial, razão área/volume e massa de uma única nanopartícula de ouro. Uma AuNS individualmente apresenta $12,77 \text{ nm}^3$ de volume, área superficial de $26,42 \text{ nm}^2$, razão área/ volume de 2,07 e massa de $2,46 \times 10^{-7} \text{ pg}$ (Figura 5A). Já um único AuNR apresenta $2,6 \times 10^4 \text{ nm}^3$ de volume, área superficial de $5 \times 10^3 \text{ nm}^2$, razão área/ volume de 0,195 e massa de $5,01 \times 10^{-4} \text{ pg}$ (Figura 5B). Essa caracterização espacial adicional será útil para análises descritas posteriormente, onde os valores de massa e área superficial de cada nanopartícula foram usados para a compreensão da internalização celular de cada uma. Valores muito semelhantes são encontrados para lotes de ambas as nanopartículas de ouro sintetizados independentemente, reforçando a reprodutibilidade dos respectivos métodos de síntese.

A reprodutibilidade de síntese dos nanomateriais é um aspecto fundamental, com impacto direto na viabilidade do escalonamento produtivo para as respectivas aplicações. (PANARIELLO et al., 2020). Devido ao grande interesse industrial na produção de nanopartículas de ouro, diversos métodos de síntese têm sido desenvolvidos. As metodologias convencionais de síntese abrangem, por exemplo, a redução de sais de ouro por soluções de ácido cítrico, síntese mediada por polímeros, luz UV, ultrassom e ablação a laser. Além disso, estratégias não convencionais englobam desde a síntese por microrganismos ou plantas até a utilização de extratos naturais e biomoléculas como agentes redutores. A escolha do método e das condições de síntese afeta diretamente parâmetros como tamanho, formato, rendimento e reprodutibilidade. (SENGANI; GRUMEZESCU; RAJESWARI, 2017). Os resultados obtidos da caracterização dos nanomateriais mostram excelente reprodutibilidade das sínteses comparadas aos trabalhos que as descrevem, dando origem a nanopartículas de ouro com características muito semelhantes às encontradas anteriormente. (BARROS et al., 2016a, 2016b; SILVA et al., 2013). Tal reprodutibilidade foi observada repetidamente ao produzir lotes sintetizados independentemente, em sínteses que variaram de 30 mL até próximo de 1 L. Portanto, ambos nanomateriais provaram-se aptos quanto à reprodutibilidade para a aplicação proposta na nanomedicina. Além disso, os métodos de síntese

utilizados apresentam as vantagens de poderem ser realizados em poucas horas e serem flexíveis quanto ao ajuste da concentração final de ouro (ou de nanopartículas) através de diferentes métodos de centrifugação.

FIGURA 5 - CARACTERIZAÇÃO ESPACIAL DE AuNSs e AuNRs



FONTE: A autora (2020).

LEGENDA: Com base nas dimensões de tamanho obtidas por MET para AuNSs e AuNRs, foram calculados o volume, área superficial, razão área/volume e massa de uma única nanopartícula de cada formato. Densidade do ouro (Au) = $1,93 \times 10^{-8}$ pg/nm³.

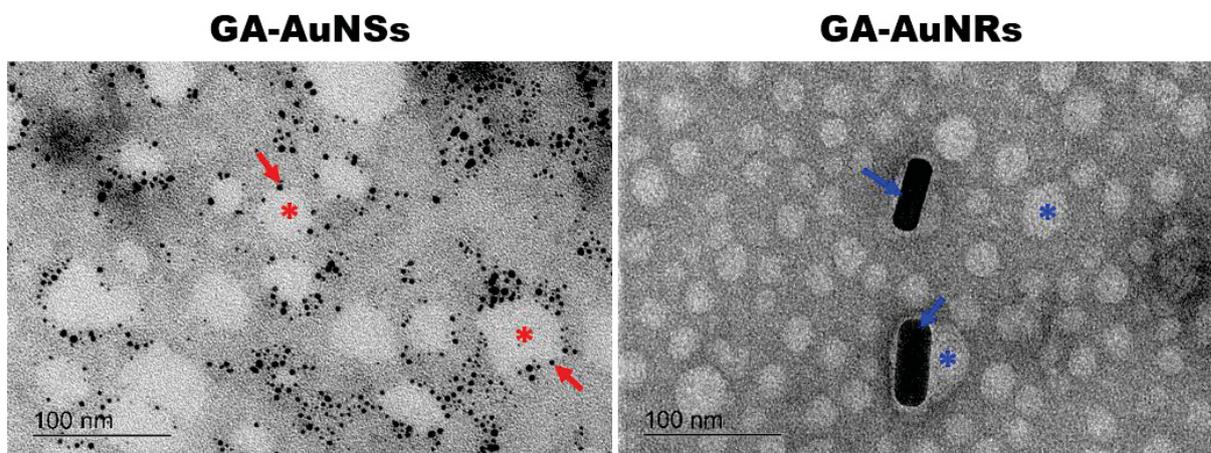
5.1.1 Interação entre GA e nanopartículas de ouro

No presente trabalho foram estudados dois nanomateriais constituídos de nanopartículas de ouro (esferas ou bastões), os quais foram estabilizados com o polímero natural GA. A GA utilizada foi a comercial, que é extraída principalmente de árvores das espécies *Acacia senegal* e *Acacia seyal* e constitui-se de uma mistura de polissacarídeos de caráter aniônico e proteínas. (OSMAN et al., 1993). A GA extraída de *Acacia Senegal*, a mais comum, apresenta duas frações principais. A fração composta por arabinogalactana constitui cerca de 90% da goma total, tem massa molar de cerca de $2,5 \times 10^5$ g/mol e apresenta morfologia elipsoide (20 x 1,5 nm). Já a porção composta por arabinogalactana-proteína constitui cerca de 10% da goma total, tem massa molar de cerca de $1-2 \times 10^6$ g/mol e apresenta formato de disco (20-80 x 3-5 nm). (revisado por GASHUA et al., 2016). Devido à estrutura macromolecular da GA, a mesma se apresenta na forma de partículas nanométricas. (GASHUA; WILLIAMS; BALDWIN, 2016; GREIN-IANKOVSKI et al., 2018).

Estudo prévio mostrou que a GA atua como estabilizante da síntese, formando centros de nucleação para o crescimento das AuNSs, sugerindo a ligação da GA à superfície das AuNSs (dado determinado por medidas de potencial zeta). (BARROS et al., 2016a). Já para os AuNRs, a GA foi utilizada como um estabilizante pós-síntese, cuja funcionalização ocorre através da interação eletrostática da GA com o surfactante CTAB presente na superfície dos AuNRs. (BARROS et al., 2016b). Entretanto, esses trabalhos anteriores não haviam mostrado como ocorre espacialmente a interação entre a GA - considerando sua estrutura macromolecular - e as nanopartículas de ouro. Dessa forma, responder a essa questão foi o primeiro objetivo do presente estudo.

Para tal, foi empregada a técnica de contrastação negativa sobre amostras de GA-AuNSs ou GA-AuNRs depositadas sobre grades de MET, permitindo a visualização da GA. As eletromicrografias mostram estruturas arredondadas individualizadas de GA, com tamanhos variados (estruturas mais claras na Figura 6), semelhante ao encontrado em outro trabalho. (GASHUA; WILLIAMS; BALDWIN, 2016). Para GA-AuNSs é possível observar que as AuNSs se dispõem de forma muito próxima ao redor das partículas de GA, enquanto para GA-AuNRs as partículas de GA é que se dispõem ao redor de cada AuNR (Figura 6).

FIGURA 6 - INTERAÇÃO ESPACIAL ENTRE GA E AuNSs OU AuNRs



FONTE: A autora (2020).

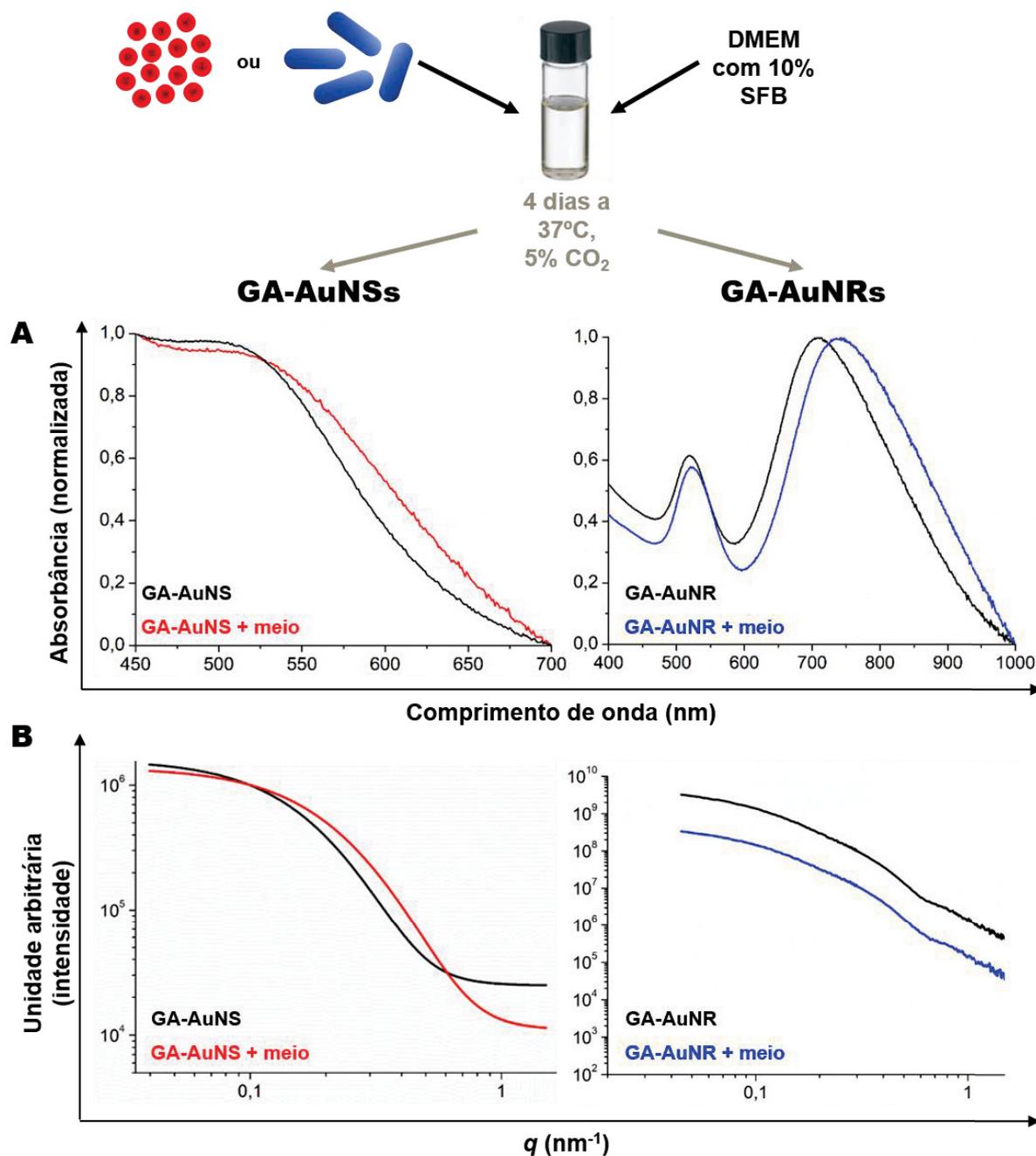
LEGENDA: Imagens de MET com contrastação negativa usando acetato de uranila. Flechas = nanopartículas de ouro, asterisco (*) = goma arábica. Imagens representativas de pelo menos 3 lotes de síntese independentes de cada nanomaterial.

Os diferentes padrões observados se devem às diferentes formas de interação entre os átomos de ouro e a GA nas duas amostras. Para GA-AuNSs a interação entre os dois componentes ocorre antes da síntese das AuNSs. Os grupamentos funcionais da GA (carboxilas e aminas) servem de ligação para os átomos de ouro e conseqüentemente como centros de nucleação para o crescimento das AuNSs. (BARROS et al., 2016a). Por esse motivo, elas se organizam ao redor de cada partícula de GA. Por outro lado, os AuNRs são sintetizados quimicamente, seguido da remoção do excesso de surfactante (CTAB) usado como molde para o crescimento dos mesmos e então funcionalizados com a GA. Nesse processo, o CTAB forma uma bicamada na superfície de cada AuNR, uma vez que a molécula apresenta características anfifílicas. Uma face da bicamada permanece interagindo com o ouro do AuNR, enquanto a outra interage com os grupamentos carboxílicos da GA, sendo ambas interações eletrostáticas. (BARROS et al., 2016b). Dessa forma, um mesmo AuNR é capaz de interagir com mais de uma partícula de GA.

5.1.2 Estabilidade dos nanomateriais em ambiente biológico

Nos trabalhos utilizados como base para esse estudo, a GA mostrou-se capaz de manter a estabilidade – manutenção da morfologia e perfil de absorção de luz, livres de agregação - das nanopartículas de ouro em solução aquosa. Tal estabilidade foi confirmada no presente trabalho, uma vez que as nanopartículas de ouro continuam estáveis por vários meses quando armazenadas em geladeira (dados não mostrados). As GA-AuNSs permanecem livres de sedimentação (quando as partículas sofrem ação da gravidade e se acumulam no fundo do recipiente) ou precipitação (formação de agregados sólidos insolúveis, podendo haver sedimentação ou não) por tempo indefinido. Uma pequena parte dos GA-AuNRs sedimenta no fundo do recipiente de armazenamento após alguns dias, mas é facilmente redispersa a partir de agitação manual ou vortex. No entanto, as condições de um ambiente biológico (temperatura, pH, concentração de sal, etc.) podem influenciar tal estabilidade, afetando as ligações de hidrogênio ou interações hidrofóbicas e eletrostáticas de macromoléculas como a GA. (VON HIPPEL; SCHLEICH, 1969). Para simular tal ambiente, os nanomateriais foram misturados a meio de cultura completo e incubados por 4 dias em condições de cultivo celular *in vitro*. Primeiramente, foi verificado o perfil de absorção das misturas no UV-visível, uma vez que esse é um método simples e eficiente de caracterização de nanopartículas de ouro em solução aquosa. A banda de absorbância das AuNSs permanece na mesma posição, apresentando um discreto alargamento, enquanto a segunda banda de absorção dos AuNRs se desloca de 710 para 740 nm (Figura 7A). Além disso, medidas de SAXS foram empregadas para correlacionar as propriedades morfológicas das nanopartículas de ouro e o efeito de sua interação com o meio de cultura. Em sistemas similares, observou-se que alterações no perfil de espalhamento com baixos valores de q são geralmente atribuídas à agregação de nanopartículas. (DE OLIVEIRA; CARDOSO, 2014). A Figura 7B mostra que os perfis de SAXS de ambos nanomateriais em água e em meio de cultura se sobrepõem consideravelmente (o perfil de espalhamento de GA-AuNRs em água - linha preta - foi deslocado para permitir a visualização das duas curvas, que originalmente são sobrepostas), mostrando que não ocorre agregação das nanopartículas de ouro.

FIGURA 7 - ESTABILIDADE DE GA-AuNSs E GA-AuNRs APÓS INCUBAÇÃO EM CONDIÇÕES DE CULTIVO CELULAR



FONTE: A autora (2020).

LEGENDA: GA-AuNSs ou GA-AuNRs foram misturadas com meio de cultura completo, incubadas a 37°C e 5% de CO₂ por 4 dias e então caracterizadas por espectroscopia de UV-visível (A) e espalhamento de raios-X a baixo ângulo (B). Em B, o perfil de espalhamento de GA-AuNRs em água (linha preta) foi deslocado para permitir a visualização das duas curvas. Em todos os casos o perfil das amostras misturadas ao meio de cultura (linhas vermelhas ou azuis) foi comparado ao perfil das amostras suspensas em água (linhas pretas). Os dados mostrados são representativos de 3 experimentos independentes para cada nanomaterial.

Proteínas presentes nos fluidos biológicos (como meio de cultura contendo SFB, plasma sanguíneo, dentre outros) podem ser rapidamente adsorvidas à superfície das nanopartículas. (CHEN et al., 2017; LYNCH; DAWSON, 2008; MONOPOLI et al., 2012). A agregação causada nesse processo pode afetar diretamente a interação dos nanomateriais com as células e, conseqüentemente, sua atividade biológica. (ALBANESE; CHAN, 2011; CAI; CHEN, 2019; TENZER et al., 2013). O resultado obtido está de acordo com o encontrado na literatura, onde foi observado que nanopartículas de ouro estabilizadas com GA permaneceram estáveis após 7 dias na presença de componentes de fluidos biológicos, como histidina, cisteína, albumina e cloreto de sódio (que também estão presentes no meio de cultura completo). O pequeno deslocamento na curva de absorção plasmônica indica a manutenção da integridade das nanopartículas de ouro (KATTUMURI et al., 2007), como observado no presente trabalho. Naquele mesmo trabalho, a baixa afinidade por proteínas plasmáticas e conseqüente estabilidade – inclusive *in vivo* - das nanopartículas de ouro foi atribuída à estrutura ramificada de polissacarídeos e proteínas da GA, que diminui sua reatividade, permitindo que a GA seja um veículo estável para o transporte das nanopartículas de ouro. (KATTUMURI et al., 2007). Dessa forma, pode-se concluir que ambos nanomateriais mantêm sua morfologia e permanecem livres de agregação após incubação em ambiente biológico. Esse fenômeno provavelmente se deve à estrutura molecular da GA e sua eficiência na interação e estabilização das nanopartículas de ouro.

5.2 CITOTOXICIDADE DOS NANOMATERIAIS

O presente projeto foi baseado em estudo prévio que mostrou efeito de GA-AuNSs sobre processos de proliferação e viabilidade celular *in vitro*. O trabalho mostrou redução da proliferação e viabilidade (a partir de ensaios de MTT e vermelho neutro) de células de melanoma B16-F10 de forma concentração-dependente após 48 horas de tratamento, sem alterar significativamente os mesmos parâmetros em células não tumorais (fibroblastos e macrófagos murinos das linhagens Balb/3T3 e RAW 264.7, respectivamente). O mesmo trabalho também mostrou alteração no perfil de espraiamento das células melanoma expostas às GA-AuNSs. (BARROS et al., 2016a). Dessa forma, surgiu a hipótese de que as GA-

AuNSs poderiam alterar também outros parâmetros de malignidade das células tumorais.

O modelo celular de melanoma selecionado para o estudo dos efeitos antitumorais dos nanomateriais foi a linhagem murina B16-F10. A linhagem B16-F10 é um dos modelos celulares de melanoma murino mais utilizados na literatura, o qual foi desenvolvido a partir da seleção sucessiva de clones celulares com afinidade de adesão e proliferação no tecido pulmonar de camundongos C57BL/6 após inoculação sistêmica. (FIDLER; NICOLSON, 1976). Molecularmente, essa linhagem é tripla negativa para as mutações classificatórias do melanoma (CASTLE et al., 2012) – para o qual não existem tratamentos com eficácia comprovada. Além da linhagem de melanoma, foi também utilizada no presente trabalho a linhagem de fibroblastos Balb/3T3, a qual foi estabelecida a partir de embriões de camundongos Balb/c. (AARONSON; TODARO, 1968). Tal linhagem foi utilizada nesse trabalho como um modelo de células não tumorais, uma vez que sua utilização é recomendada para testes de citotoxicidade de dispositivos médicos *in vitro* (INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION, 2009), o que inclui nanopartículas (MARMORATO et al., 2011; PONTI et al., 2009; UBOLDI et al., 2012, 2016).

Os ensaios propostos para verificar os parâmetros de malignidade - como capacidade invasiva e de formação de colônias - são ensaios mais longos, necessitando, portanto, de maiores tempos de exposição celular às nanopartículas de ouro. Dessa forma, foi necessário repetir os ensaios de viabilidade expondo as células às nanopartículas de ouro por até 96 horas, que é o tempo máximo ideal de permanência das células utilizadas (B16-F10 e Balb/3T3) em cultura de monocamada, com o intuito de escolher concentrações que não se mostrassem citotóxicas – especialmente para células não tumorais - para o endpoint e condições testadas. O desenho experimental foi baseado nas indicações do *Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods* (ICCVAM), que recomenda o ensaio de internalização do corante vermelho neutro (VN) como padrão de citotoxicidade. Recomenda-se fazer uma curva de concentração da substância testada através de diluições seriadas na proporção de 1:10, iniciando com uma alta concentração. (ICCVAM, 2006). Após a coloração com VN, foi feita ainda coloração com cristal violeta nas mesmas amostras a fim de correlacionar a quantidade de VN retida com a quantidade de células.

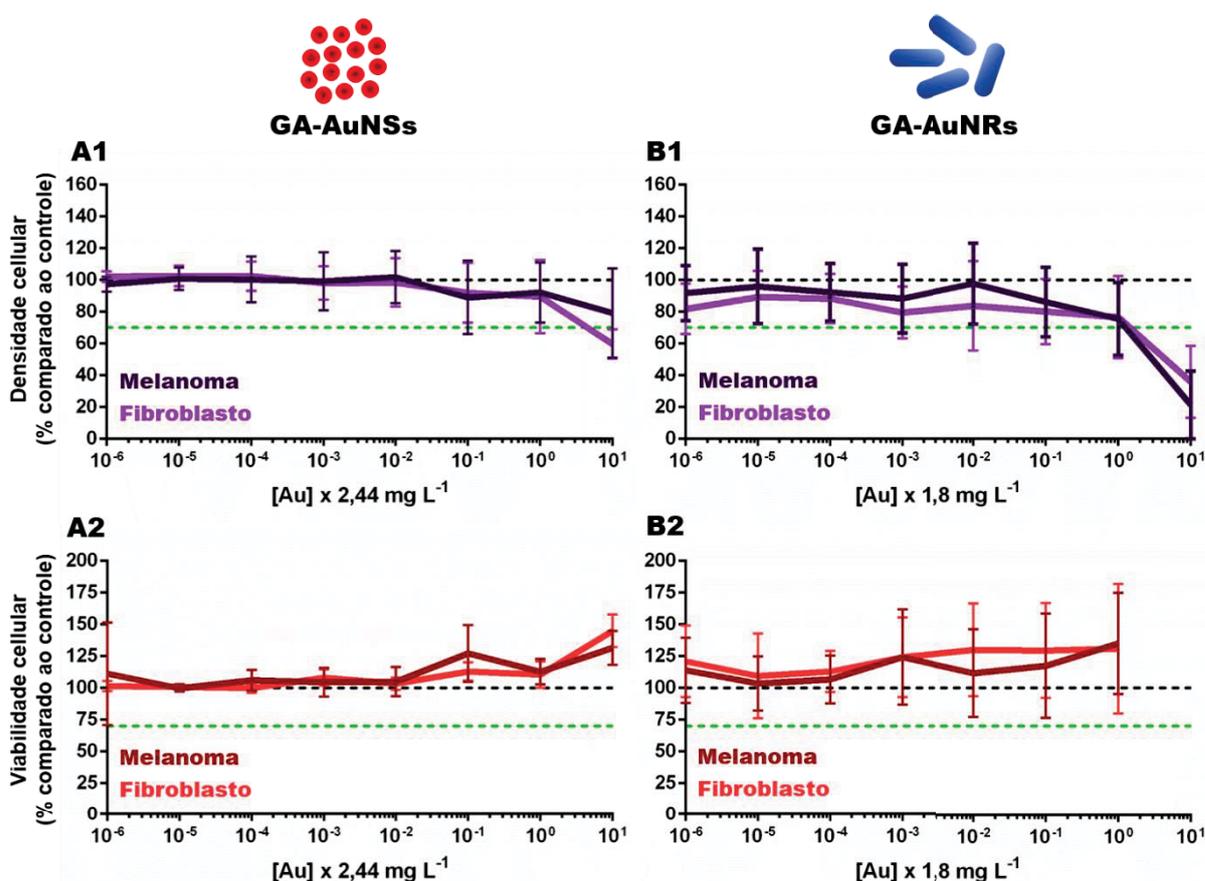
A dispersão de GA-AuNSs foi concentrada em 10 vezes em relação à concentração obtida após a síntese, o que foi feito utilizando filtros Amicon Ultra. Nesse processo, tanto AuNSs quanto GA são concentradas. Portanto, utilizamos solução de GA 0,4% (10 vezes concentrada em relação à concentração após a síntese de GA-AuNSs) como controle dos experimentos, com objetivo de determinar os efeitos decorrentes da concentração de AuNSs. Não há dados prévios de citotoxicidade de GA-AuNRs. Portanto, os ensaios foram conduzidos em paralelo, da mesma forma que para GA-AuNSs, a fim de comparação dos resultados. Os AuNRs lavados após a síntese foram também funcionalizados com 0,4% de GA, a qual foi da mesma forma usada como controle.

Células de melanoma B16-F10 e fibroblastos Balb/3T3 foram expostos às 8 concentrações de cada nanomaterial por 96 horas. A concentração máxima testada para cada nanomaterial resulta da mistura direta das suspensões – após síntese e concentração - com o meio de cultura, por isso a pequena diferença entre os valores de concentração testados para GA-AuNSs e GA-AuNRs. O ensaio de coloração com CV foi utilizado para determinar a quantidade de células obtidas após à exposição às nanopartículas de ouro comparando cada condição ao controle de cada experimento. Para as células expostas às GA-AuNSs pode-se observar redução de 7,86 e 20,77% na quantidade de células de melanoma expostas às concentrações de 2,44 e 24,4 mg L⁻¹, respectivamente. Essa maior concentração reduz ainda em 40,28% a quantidade de fibroblastos (Figura 8 A1). Já para as células expostas aos GA-AuNRs encontram-se reduções de 24,5 e 78,66% na quantidade de células de melanoma para as concentrações de 1,8 e 18 mg L⁻¹, respectivamente. Enquanto que para os fibroblastos ocorre redução de 18,15; 20,43 e 64,11% após exposição às concentrações de 1,8 ng L⁻¹, 1,8 µg L⁻¹ e 18 mg L⁻¹, respectivamente (Figura 8 B1).

Curiosamente, o ensaio de VN, após normalização pela quantidade de células, mostrou que o aumento da concentração das nanopartículas de ouro não induz perda de viabilidade celular (para ambas as linhagens), mas sim aumento da captação do corante (Figura 8 A2 e B2, respectivamente). Esses resultados sugerem que o aumento da concentração de nanopartículas de ouro provavelmente é acompanhado do aumento de processos endocíticos para sua captação - o que será discutido posteriormente. Conseqüentemente, é produzida maior quantidade de vesículas ácidas no interior das células, retendo maior quantidade de VN, uma vez

que esse corante quando protonado torna-se incapaz de atravessar as membranas celulares. (REPETTO; DEL PESO; ZURITA, 2008). Quando em alta concentração, essa captação de nanopartículas de ouro possivelmente interfere com a capacidade de proliferação celular, fazendo com que se tenha menor número de células ao final de 96 horas de exposição.

FIGURA 8 - PERFIL DE CITOTOXICIDADE DE GA-AuNSs E GA-AuNRs



FONTE: A autora (2020).

LEGENDA: Células B16-F10 (melanoma murino) ou Balb/3T3 (fibroblastos murinos) foram cultivadas na presença de diferentes concentrações de GA-AuNSs (2,44 ng L⁻¹ a 24,4 mg L⁻¹) ou GA-AuNRs (1,8 ng L⁻¹ a 18 mg L⁻¹) por 96 horas. As células foram coradas com cristal violeta (CV) para determinação da densidade celular (A1 e B1). A viabilidade celular foi quantificada pelo ensaio de internalização do corante vermelho neutro (VN). A2 e B2). As absorbâncias obtidas no ensaio de VN foram normalizadas pela quantidade de células de cada amostra (absorbância do CV). As células expostas às nanopartículas foram comparadas ao respectivo controle de cada experimento (GA 0,4%) (linhas pretas tracejadas). Os gráficos mostram as médias (\pm desvio padrão) de pelo menos 5 experimentos independentes realizados em quadruplicata técnica. As linhas verdes tracejadas representam 30% de redução em cada parâmetro analisado, a partir da qual o efeito foi considerado citotóxico.

Os ensaios realizados aqui não resultaram no mesmo efeito mostrado anteriormente por Barros e colaboradores (2016), ou seja, não houve especificidade

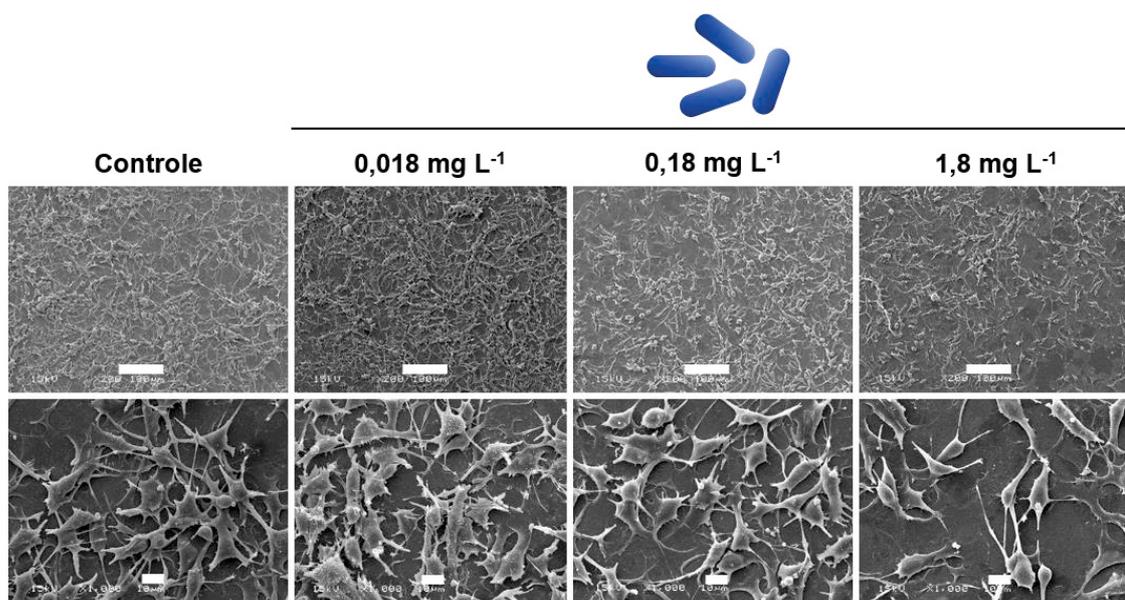
das GA-AuNSs por interferir com processos celulares das células tumorais. Naquele estudo, a maior concentração de GA-AuNSs testada corresponde aproximadamente a $0,63 \text{ mg L}^{-1}$ de ouro. Entretanto, vale ressaltar que as condições experimentais utilizadas foram diferentes, considerando desde as concentrações de GA-AuNSs testadas, até a concentração da GA utilizada como controle, os tempos de exposição e volume aplicado aos poços.

Em resumo, ao comparar GA-AuNSs com GA-AuNRs, especialmente na maior concentração de cada um, onde se encontra maior citotoxicidade, é possível observar nitidamente que os GA-AuNRs foram mais citotóxicos. Enquanto $24,4 \text{ mg L}^{-1}$ de GA-AuNSs reduzem a quantidade de células tumorais e não tumorais em 20,77 e 40,28%, respectivamente, 18 mg L^{-1} (26% menos ouro) de GA-AuNRs as reduzem em 78,66 e 64,11%. De acordo com a ISO 10993-5:2009(E), que padroniza testes *in vitro* para citotoxicidade, a inibição do crescimento celular em mais de 30% (linhas verdes nos gráficos da Figura 8) deve ser considerada um efeito citotóxico. (INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION, 2009). Nosso grupo de pesquisa tem buscado tratamentos antitumorais alternativos que não sejam citotóxicos, ao contrário da maioria dos quimioterápicos convencionais. A quimioterapia clássica tem como objetivo eliminar as células tumorais através de drogas citotóxicas, o que acaba sendo muitas vezes até mais tóxico para os tecidos saudáveis do que para os tumores. Além disso, seus efeitos estão frequentemente associados ao desenvolvimento de resistência de células tumorais e até a formação de neoplasias secundárias. (BOKEMEYER et al., 1996; FLOYD et al., 2005; RIES; KLASTERSKY, 1986). Portanto, buscaram-se estratégias terapêuticas que sejam capazes de reduzir o potencial de malignidade das células tumorais sem indícios de toxicidade. (BELLAN et al., 2020; BISCAIA et al., 2017; GONÇALVES et al., 2019). Dessa forma, a maior concentração testada para cada material foi excluída das análises posteriores. As concentrações de 0,024; 0,244 e $2,44 \text{ mg L}^{-1}$ para GA-AuNSs e de 0,018; 0,18 e $1,8 \text{ mg L}^{-1}$ para GA-AuNRs podem ser consideradas não citotóxicas e foram escolhidas para dar continuidade ao trabalho.

No trabalho de Barros e colaboradores (2016) havia ainda sido mostrada alteração morfológica nas células de melanoma após exposição às GA-AuNSs. Portanto, a fim de verificar se o mesmo ocorreria na presença de GA-AuNRs, as células foram expostas por 96 horas às 3 concentrações não citotóxicas escolhidas desse nanomaterial e depois observadas por MEV. Na Figura 9 é possível observar

que nenhuma das concentrações de GA-AuNRs provoca alterações morfológicas significativas nas células de melanoma quando comparadas ao controle. A única diferença detectada entre os grupos é a redução da quantidade de células de forma concentração-dependente em regiões de alta confluência. Esse último dado está de acordo com o resultado encontrado no ensaio de proliferação celular (Figura 8 B1) e corrobora a não citotoxicidade das concentrações escolhidas.

FIGURA 9 - MORFOLOGIA DE CÉLULAS DE MELANOMA APÓS EXPOSIÇÃO A CONCENTRAÇÕES NÃO CITOTÓXICAS DE GA-AuNRs



FONTE: A autora (2020).

LEGENDA: Células B16-F10 (melanoma murino) foram cultivadas na presença de diferentes concentrações de GA-AuNRs (0,018 a 1,8 mg L⁻¹) ou GA 0,4% (controle) por 96 horas. As células foram então fixadas e processadas para MEV. As imagens apresentadas são representativas 2 experimentos independentes realizados em duplicata técnica. Barras de escala: imagens superiores = 100 µm, imagens inferiores = 10 µm.

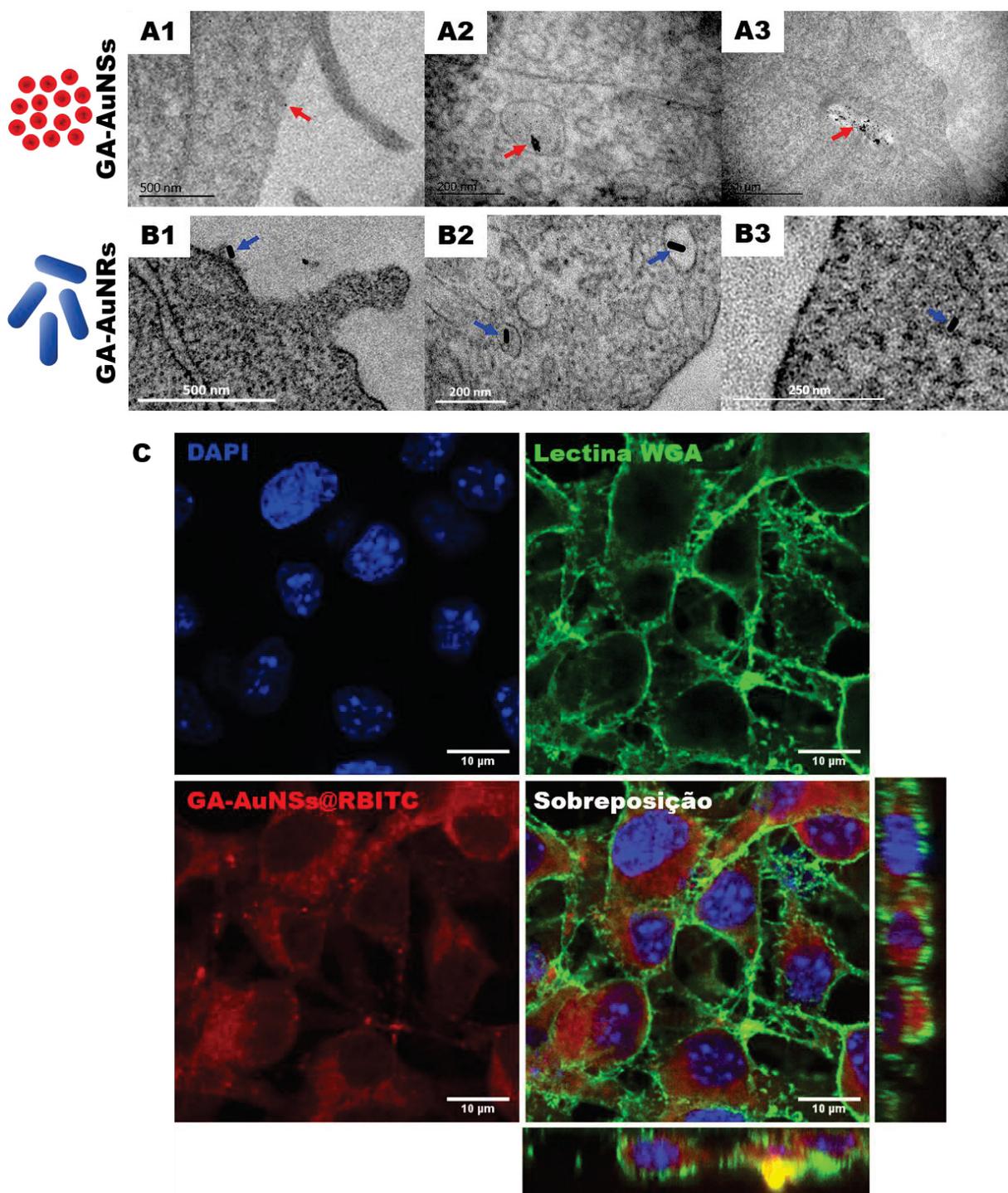
5.2.1 Internalização dos nanomateriais pelas células tumorais e sua relação com a citotoxicidade

Acredita-se que a toxicidade e a interação com tecidos biológicos e/ou efeito de nanopartículas de ouro dependam, dentre outros fatores, de características como tamanho (CHEN et al., 2009; GENG et al., 2007; HUANG et al., 2012; SONAVANE; TOMODA; MAKINO, 2008) e formato (FLOREZ et al., 2012; GENG et al., 2007; KOLHAR et al., 2013; XIE et al., 2017; ZHANG et al., 2008) das mesmas. (DING et al., 2018). Dessa forma, parte da hipótese proposta inicialmente para esse estudo sugere que os efeitos biológicos de ambos os nanomateriais com composição

semelhante (nanopartículas de ouro estabilizadas com GA), porém com tamanhos e formatos diferentes (GA-AuNSs e GA-AuNRs), devem ser diferentes quando comparados em condições semelhantes de exposição. Não existe grande consenso na literatura a respeito da influência direta do tamanho e formato de nanopartículas de ouro na sua toxicidade. Como havia sido sugerido anteriormente que o aumento da concentração de nanopartículas de ouro provavelmente era acompanhado do aumento de processos endocíticos para sua captação, buscou-se compreender o resultado encontrado através do estudo da internalização dos dois diferentes nanomateriais pelas células tumorais.

Primeiramente, as imagens de MET obtidas permitem visualizar o destino das nanopartículas de ouro após internalização pelas células de melanoma. Tanto AuNSs quanto AuNRs são encontrados em contato com a superfície das células (Figura 10 A1 e B1), dentro de compartimentos vesiculares intracelulares (Figura 10 A2, 3 e B2) e livres no citosol (Figura 10 B3 para AuNRs; dados não mostrados para AuNSs por serem de difícil observação devido ao tamanho). As imagens de MET confirmam que as nanopartículas de ouro são de fato internalizadas pelas células de melanoma. Além disso, quando analisadas em menor aumento, não foram encontradas nas amostras células com características de processos de morte celular após exposição a concentrações não-citotóxicas de ambos nanomateriais (dados não mostrados), confirmando sua biocompatibilidade. Entretanto, é interessante observar que soluções de GA na mesma concentração encontrada nas amostras de ambos os materiais foram usadas como controle dos experimentos e ainda assim os resultados de internalização observados foram diferentes para GA-AuNSs e GA-AuNRs. Esse fato sugere que além de estabilizante, a GA nesse caso atue como carreadora para a entrega das nanopartículas de ouro às células. Portanto, com o objetivo de confirmar a internalização celular da GA, foi adotada a estratégia de conjugar sua cadeia ao fluoróforo RBITC (após a síntese das AuNSs na presença de GA), o qual pode em seguida ser detectado através de microscopia de fluorescência. O resultado mostra que é possível detectar a GA aderida à superfície das células (marcação em amarelo no quadro de sobreposição da Figura 10C) e distribuída pelo citosol. O seu padrão “granular” de distribuição intracelular é compatível com processos endocíticos.

FIGURA 10 - INTERNALIZAÇÃO DE GA-AuNSs E GA-AuNRs POR CÉLULAS DE MELANOMA



FONTE: A autora (2020).

LEGENDA: Células B16-F10 (melanoma murino) foram cultivadas na presença de $24,4 \text{ mg L}^{-1}$ de GA-AuNSs (A 1-3) ou $1,8 \text{ mg L}^{-1}$ de GA-AuNRs (B 1-3) por 96 horas. As células foram então fixadas e processadas para MET. As flechas apontam para nanopartículas aderidas à superfície das células (A1 e B1), presentes dentro de compartimentos vesiculares citoplasmáticos (A2, A3 e B2) ou livres no citosol (B3). As imagens são representativas de 1 experimento independente. C) Células B16-F10 foram expostas por 1 hora a GA-AuNSs previamente marcadas com o fluoróforo RBITC (GA-AuNSs@RBITC). Após fixadas, as células tiveram núcleos (DAPI) e porção glicídica da membrana (Lectina WGA) marcados e foram então observadas por microscopia de varredura a laser confocal.

Resultados de quantificação de ouro por ICP-OES mostram ainda que a internalização das nanopartículas de ouro pelas células de melanoma é concentração-dependente. Para ambos os nanomateriais, o aumento de 10 vezes na concentração de ouro a qual as células são expostas por 96 horas resulta no aumento de em média 6,7-6,8 vezes na quantidade de ouro internalizada pelas mesmas (e conseqüentemente na quantidade de nanopartículas de ouro internalizadas) (Tabela 1). Interessantemente, ao comparar faixas de concentração semelhantes ($2,44 \text{ mg L}^{-1}$ de GA-AuNSs e $1,8 \text{ mg L}^{-1}$ de GA-AuNRs), é possível observar que para cada 1 mg L^{-1} de ouro, as células de melanoma internalizam 16 vezes mais ouro quando expostas a GA-AuNRs do que quando expostas a GA-AuNSs (calculado a partir dos dados da Tabela 1). Por outro lado, para resultar na mesma massa de ouro é preciso que cada célula internalize 2 mil vezes mais AuNSs do que AuNRs (calculado a partir dos dados da Tabela 1). Esse fato pode ser resultante das diferenças de tamanho entre as duas nanopartículas de ouro, uma vez que nanopartículas de ouro ultrapequenas (2-6 nm) são internalizadas em maiores quantidades por células tumorais do que as maiores. (HUANG et al., 2012). Por outro lado, nanopartículas de ouro maiores carregam uma massa muito maior, o que resulta em maior massa de ouro internalizada.

Como os resultados descritos acima foram obtidos a partir da exposição celular a concentrações relativamente diferentes de cada nanomaterial, outra abordagem foi utilizada para confirmar as tendências. As células de melanoma expostas às mesmas concentrações de GA-AuNSs ou GA-AuNRs ($0,018$; $0,18$ ou $1,8 \text{ mg L}^{-1}$) por 6 horas mostram um perfil de internalização muito semelhante ao descrito anteriormente. Para a mesma condição experimental, as células internalizam maior massa de ouro após exposição aos GA-AuNRs. Essa maior massa, por sua vez, é resultante de menor quantidade de nanopartículas de ouro (Figura 11A), confirmando a tendência observada anteriormente. Além da massa de ouro e da quantidade de nanopartículas de ouro internalizada, investigou-se se a superfície de contato entre ouro e componentes celulares resultante da presença das nanopartículas de ouro dentro das células poderia ser um fator importante na sua citotoxicidade. Entretanto, como se pode observar na Figura 11A, a superfície de contato disponível no interior de cada célula após exposição às diferentes nanopartículas de ouro é muito semelhante. Portanto, esse não deve ser um fator determinante para as diferenças de toxicidade encontradas.

TABELA 1 - QUANTIFICAÇÃO DA INTERNALIZAÇÃO DE GA-AuNSs e GA-AuNRs POR CÉLULAS DE MELANOMA.

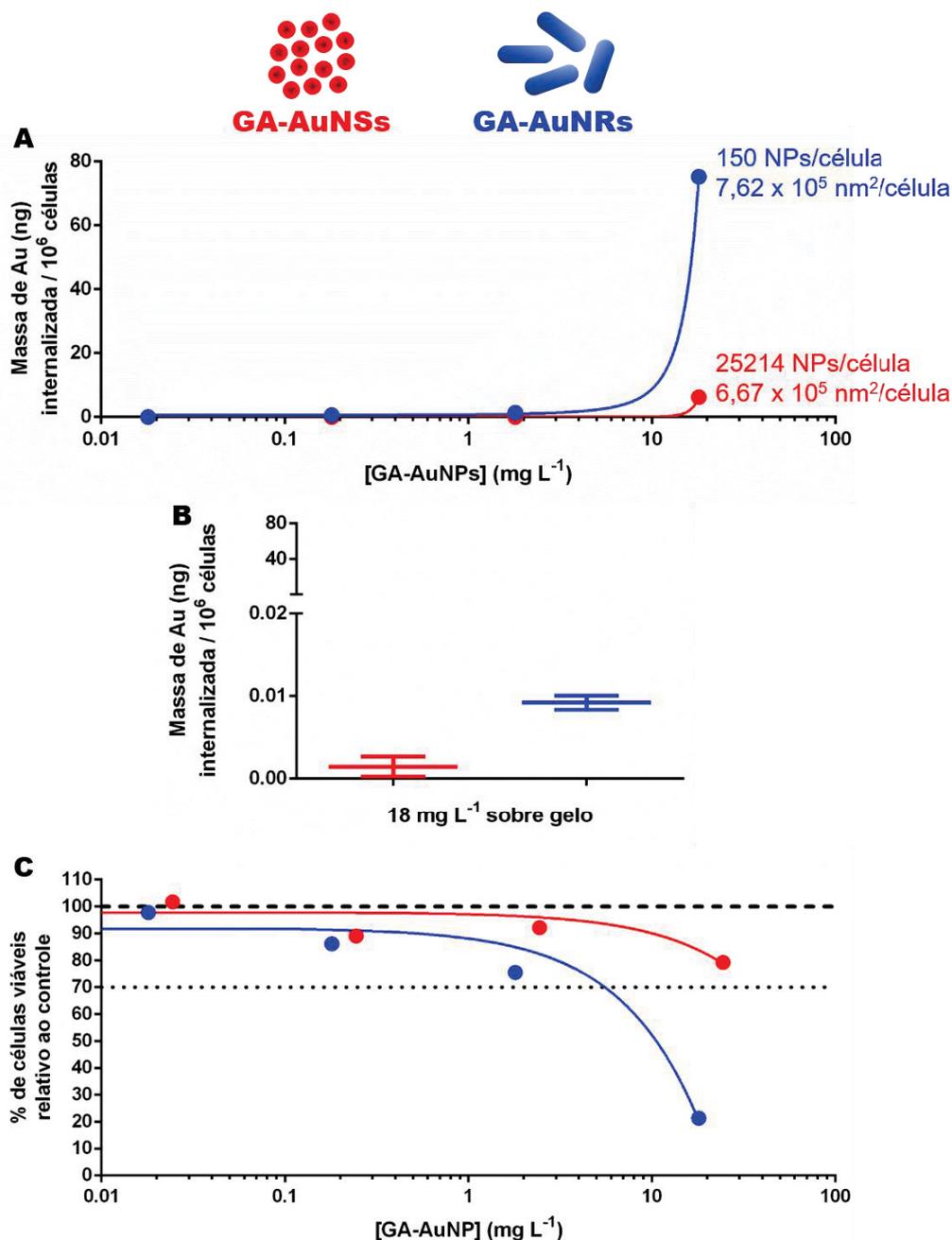
Grupo experimental	[Au] à qual as células foram expostas (mg L ⁻¹)	Massa de Au (ng) internalizada por 10 ⁶ células	Número de nanopartículas internalizado por cada célula
GA-AuNSs	2,44	3,99 ± 0,82	16257,75 ± 3334,79
	24,4	27,09 ± 6,03	110136,05 ± 24516,24
GA-AuNRs	0,018	1,05 ± 0,42	2,11 ± 0,83
	0,18	8,06 ± 0,47	16,15 ± 0,95
	1,8	47,0 ± 15,46	94,19 ± 30,99

FONTE: A autora (2020).

LEGENDA: Os dados mostrados representam média ± desvio padrão. O número de nanopartículas internalizado por cada célula foi calculado com base nos valores de massa de cada uma das nanopartículas de ouro, os quais foram calculados como descrito na Figura 5. Resultado de 3 experimentos independentes.

Em resumo, os resultados obtidos mostram claramente que as células de melanoma internalizam as GA-AuNSs em maior quantidade. Do ponto de vista da morfologia das nanopartículas de ouro, esse dado está de acordo com a literatura, que mostra que nanopartículas de ouro isotrópicas são internalizadas pelas células em maior quantidade do que as anisotrópicas. (CHITHRANI; GHAZANI; CHAN, 2006). Entretanto, a massa de ouro resultante da internalização de GA-AuNRs é maior. Como já havia sido observado anteriormente, a GA interage de forma espacialmente diferente com AuNSs e AuNRs e atua como um carreador para as nanopartículas de ouro até o interior das células. Essa ideia corrobora a entrega mais eficiente de AuNSs, uma vez que uma única partícula de GA é capaz de carregar várias AuNSs enquanto várias partículas de GA são ocupadas no carregamento de um único AuNR. Essas informações, em combinação com o padrão de redução na densidade celular causada por cada uma das nanopartículas de ouro (Figura 11C), sugere que a massa de ouro internalizada pelas células é o fator mais importante nesse contexto. Quanto maior a massa de ouro internalizada pelas células, maior será sua toxicidade, independentemente da quantidade de nanopartículas de ouro ou de sua área superficial disponível. Além disso, a GA atuando como um agente carreador pode ter um efeito decisivo no padrão de internalização das nanopartículas de ouro.

FIGURA 11 - ANÁLISES CORRELATIVAS ENTRE GA-AuNSs E GA-AuNRs: INTERNALIZAÇÃO CELULAR E CITOTOXICIDADE EM CÉLULAS DE MELANOMA



FONTE: A autora (2020).

LEGENDA: A-B) Células de melanoma murino B16-F10 foram expostas a faixa de concentrações semelhantes de GA-AuNSs ou GA-AuNRs por 6 horas a 37°C (A) ou sobre gelo (B, após exposição a 18 mg L^{-1}). A massa de ouro (Au) contida nas células após exposição a cada concentração foi quantificada por ICP-OES e normalizada pela quantidade de células contida em cada amostra (pontos no gráfico representam a média de 3 experimentos independentes). Em A, o gráfico mostra a regressão não linear (crescimento exponencial) gerada a partir dos valores obtidos experimentalmente. A massa de Au internalizada pelas células de melanoma foi transformada em número de nanopartículas e área superficial disponível a partir dos valores calculados anteriormente na Figura 5. Em B, o gráfico mostra a média (com mínimo e máximo) de 2 experimentos independentes. C) A quantidade de células aderidas ao final de 96 horas de exposição às nanopartículas foi determinada por coloração com cristal violeta e comparada ao controle de cada experimento (GA 0,4%, linha tracejada). A linha pontilhada representa 30% de perda de viabilidade celular, a partir da qual se considera efeito citotóxico.

A maior parte das nanopartículas é geralmente internalizada pelas células pelos processos de endocitose mediados por clatrina ou caveolina – que são processos ativos dependentes de receptores –, uma vez que as nanopartículas são recobertas por proteínas em soluções fisiológicas. (PARK; OH, 2014). Portanto, a fim de investigar a forma de internalização das nanopartículas de ouro, as células foram expostas por 6 horas a 18 mg L^{-1} sobre gelo, o que reduz a fluidez de membrana e impede a ocorrência dos eventos endocíticos ativos. Os resultados obtidos mostram que, em média, cada 1×10^6 células tumorais internaliza 1,45 e 9,2 ng de ouro após exposição a GA-AuNSs e GA-AuNRs, respectivamente (Figura 11B). Esses valores correspondem a 23 e 12%, respectivamente, da quantidade de ouro internalizada pelas células após exposição às mesmas concentrações de GA-AuNSs e GA-AuNRs a $37 \text{ }^\circ\text{C}$. Além dos processos endocíticos ativos, é possível também que ocorra difusão de nanopartículas através da membrana plasmática. (LIN et al., 2010; SHANG; NIENHAUS; NIENHAUS, 2014). Dessa forma, parte do ouro quantificado após exposição sobre gelo pode ser resultante de nanopartículas de ouro aderidas à superfície das células - não necessariamente internalizadas -, mas parte pode ser resultante da difusão das nanopartículas de ouro através da membrana plasmática. Tal processo explicaria, inclusive, a presença de nanopartículas de ouro livres no citosol (Figura 10 B3), ou seja, fora de compartimentos vesiculares do sistema endocítico.

Curiosamente, células expostas às nanopartículas de ouro por 6 horas contém maior quantidade de nanopartículas de ouro em seu interior (Figura 11A, 25.214 AuNSs e 150 AuNRs por célula) do que as que haviam sido expostas por 96 horas (Tabela 1, 16.257 AuNSs e 94 AuNRs por célula) em condições relativamente semelhantes. Esse dado sugere que ao longo do tempo as células devem provavelmente iniciar processos de exocitose para a eliminação das nanopartículas de ouro presentes no seu interior. (PARK; OH, 2014). Em conjunto, os resultados obtidos mostram que ambos nanomateriais são majoritariamente internalizados pelas células tumorais por processos endocíticos. Entretanto, processos de difusão e também de exocitose parecem estar envolvidos na quantidade final de nanopartículas de ouro presente nas células. Estudos mais detalhados seriam necessários para determinar com precisão quais as vias de endocitose que estão envolvidas nesse processo, usando inibidores específicos para cada uma. Além disso, trabalho recente mostrou que a retenção intracelular de nanopartículas de

ouro é maior em células tumorais do que em fibroblastos. Dessa forma, seria também interessante investigar a internalização celular por parte dos fibroblastos, uma vez que foi mostrado que tal processo é fortemente dependente da linhagem celular e suas respectivas dinâmicas de endo e exocitose. (IVOŠEV et al., 2020).

Os resultados obtidos sugerem que o fator determinante para a citotoxicidade das nanopartículas de ouro é a massa de ouro internalizada pelas células. Estudos utilizando íons metálicos mostram que a citotoxicidade do ouro na sua forma iônica se dá de forma concentração-dependente (ISSA et al., 2008) e está relacionada ao desequilíbrio de outros íons fundamentais para o funcionamento celular, como sódio, cloro, potássio, enxofre, fósforo e cálcio (ZIEROLD, 2000). Entretanto, o ouro que constitui as nanopartículas de ouro encontra-se na sua forma reduzida (não iônica). Dessa forma, estudos mais aprofundados seriam necessários para desvendar as razões pelas quais a presença de átomos de ouro reduzido dentro das células é um fator causador de toxicidade.

No presente trabalho as nanopartículas de ouro estudadas variaram simultaneamente em tamanho e formato, impossibilitando a investigação de qual das variáveis seria responsável pelos efeitos biológicos observados *in vitro*. Dessa forma, futuros estudos sistemáticos feitos a partir da alteração de uma única variável de cada vez – por exemplo, investigando em paralelo diferentes tamanhos de esferas e de bastões, que sejam semelhantes em pelo menos em uma das dimensões ou em massa total de ouro – poderão desvendar qual desses fatores físicos das nanopartículas é o mais determinante para seus efeitos biológicos. Além disso, seria ideal utilizar modelos de nanopartículas produzidos e funcionalizados por métodos semelhantes a fim de minimizar as diferenças na química de superfície dos materiais.

5.3 CAPACIDADE DOS NANOMATERIAIS DE ALTERAR PARÂMETROS DE MALIGNIDADE DE CÉLULAS TUMORAIS *IN VITRO*

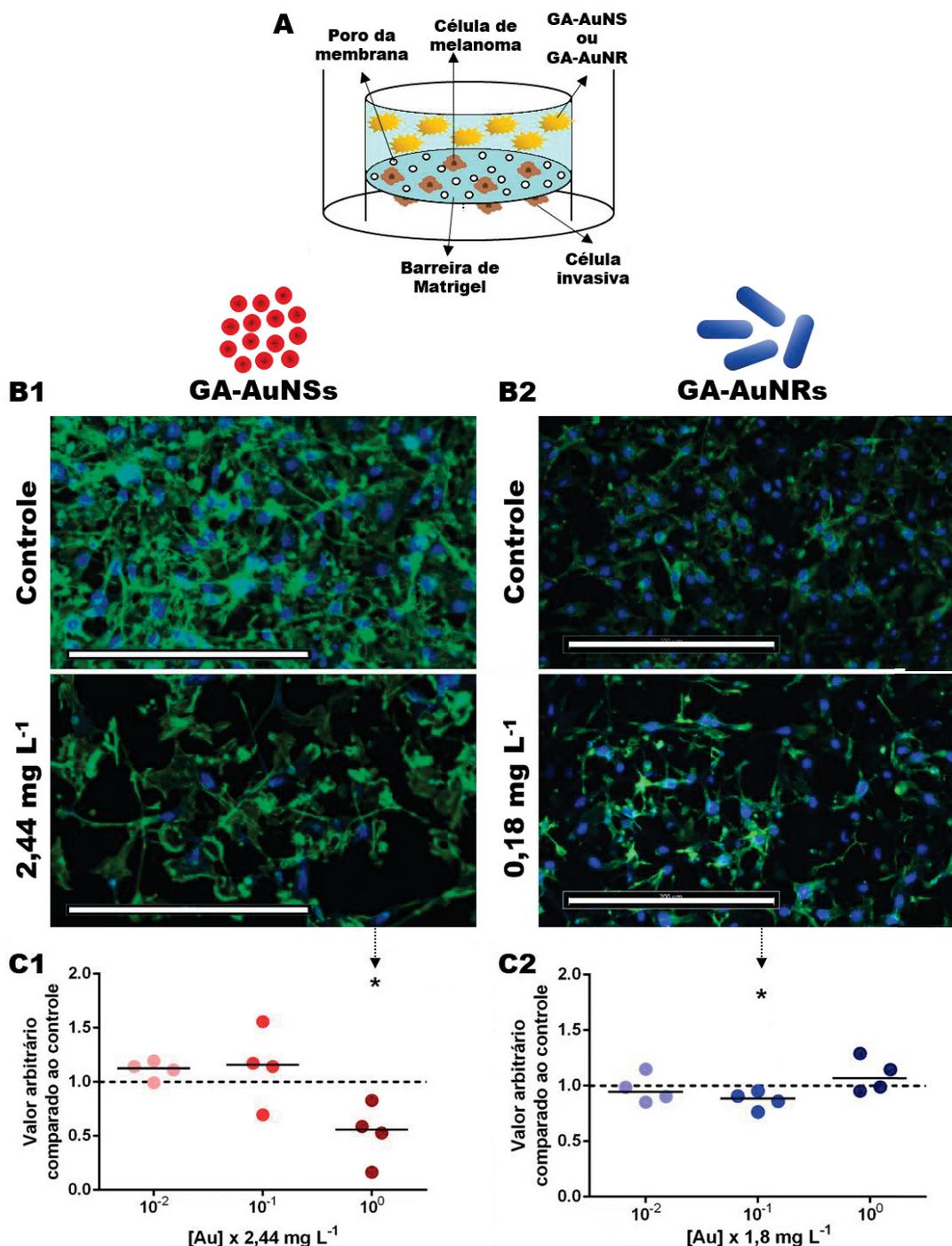
Enquanto muitos trabalhos têm tido como foco a determinação de concentrações citotóxicas e dosagens letais de nanomateriais, pouca atenção tem sido dedicada ao estudo de dosagens terapêuticas dos mesmos. (ALKILANY; MURPHY, 2010). Esse é justamente o foco principal do presente estudo, verificar - em condições onde esses materiais não apresentam toxicidade - se são capazes de

apresentar efeito terapêutico intrínseco sobre parâmetros de malignidade das células tumorais, ou seja, sem a necessidade de conjugação a moléculas citotóxicas, como quimioterápicos.

O processo de metástase envolve uma série de eventos, desde o desprendimento das células cancerosas do tumor primário, sua penetração em vasos sanguíneos ou linfáticos até a invasão de outros locais do corpo, onde podem então formar tumores secundários. (BLAGOSKLONNY, 2003; LAMBERT; PATTABIRAMAN; WEINBERG, 2017; MASSAGUÉ; BATLLE; GOMIS, 2017). Considerando que a capacidade invasiva das células tumorais seja o primeiro passo rumo à metástase, investigou-se se a exposição das células de melanoma a GA-AuNSs e GA-AuNRs seria capaz de interferir nesse processo. Para tal, as células foram submetidas ao ensaio de invasão em transwell através de barreira de Matrigel na presença das 3 concentrações escolhidas de GA-AuNSs (0,024; 0,244 e 2,44 mg L⁻¹) e GA-AuNRs (0,018; 0,18 e 1,8 mg L⁻¹) (Figura 12A). Após 72 horas na presença de 2,44 mg L⁻¹ de GA-AuNSs as células tumorais apresentam redução de 48% na capacidade invasiva (Figura 12 B1 e C1). Para GA-AuNRs, a concentração de 0,18 mg L⁻¹ reduz a capacidade invasiva em 12,9% (Figura 12 B2 e C2). As demais concentrações testadas de cada nanomaterial não afetam significativamente a quantidade de células invasivas (Figura 12 B e C).

A aquisição da capacidade invasiva pelas células tumorais configura o primeiro passo rumo à metástase, processo que é intimamente dependente da migração celular. Ou seja, a capacidade adquirida pelas células de sair do seu local original, se deslocar até outra região e de degradar a matriz extracelular (MEC), permitindo que penetrem a barreira conferida normalmente pela MEC. (GKRETSI; STYLIANOPOULOS, 2018; JU; STEHBENS; HAASS, 2018; KAM; REIJNIAK; ANDERSON, 2012). As imagens obtidas mostram nítida alteração no padrão de distribuição de filamentos de actina das células de melanoma que apresentam redução da capacidade invasiva após exposição a 2,44 mg L⁻¹ de GA-AuNSs ou 0,18 mg L⁻¹ de GA-AuNRs. O perfil de acúmulo de actina nas bordas das células expostas a GA-AuNSs (Figura 12 B1, imagem inferior) sugere um aumento do seu perfil adesivo.

FIGURA 12 - CAPACIDADE INVASIVA DE CÉLULAS DE MELANOMA APÓS EXPOSIÇÃO A CONCENTRAÇÕES NÃO CITOTÓXICAS DE GA-AuNSs OU GA-AuNRs



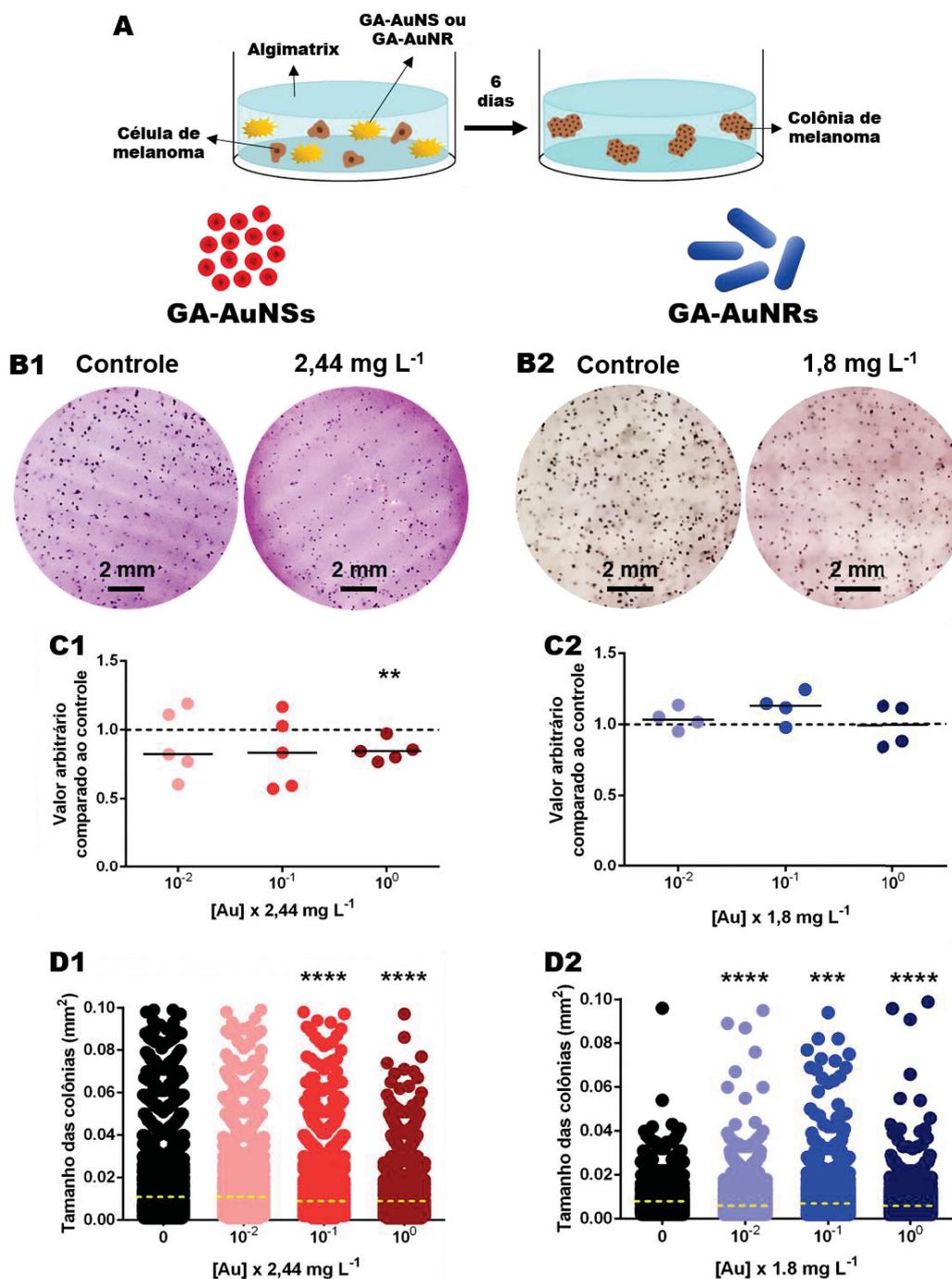
FONTE: A autora (2020).

LEGENDA: A) Células de melanoma B16-F10 foram plaqueadas na presença de GA-AuNSs ou GA-AuNRs sobre insertos cobertos com Matrigel e incubadas por 72 horas. As células que não invadiram (porção superior do inserto) foram removidas e as que invadiram foram fixadas, marcadas com ActinGreen (citoesqueleto em verde) e DAPI (núcleos em azul). B1 e B2) As imagens mostram campos representativos de cada grupo. Barras de escala = 200 μm. C1 e C2) Os núcleos das células que invadiram foram quantificados usando programa Fiji e normalizados pela área analisada de cada inserto. Os valores de cada amostra experimental foram comparados aos valores do respectivo controle (GA 0,4%) de cada experimento, representado pelas linhas tracejadas nos gráficos. Foram realizados 4 experimentos independentes em duplicata técnica. Teste t pareado. *p<0,05.

O processo de invasão é essencial para o início da metástase, e ao final do processo uma característica importante para células cancerosas é a capacidade de se agregar homotipicamente através das glicoproteínas e crescer em colônias de forma independente de ancoragem. Essa habilidade reflete sua capacidade de proliferar e finalmente formar novos tumores em locais distantes da sua origem. (LOTAN; RAZ, 1983). Com intuito de determinar se as concentrações não citotóxicas de GA-AuNSs e GA-AuNRs seriam também capazes de interferir com o processo de formação de colônias de melanoma, foi utilizado o ensaio de formação de colônias em matriz tridimensional de alginato (Figura 13A). Células tumorais individualizadas proliferaram na presença das 3 concentrações dos nanomateriais até a formação de colônias após 6 dias. A quantificação das colônias geradas mostra que 2,44 mg L⁻¹ de GA-AuNSs reduz em 15% a quantidade de colônias formadas (Figura 13 B1 e C1), enquanto 0,244 e 2,44 mg L⁻¹ reduzem o tamanho das colônias em 22 e 25%, respectivamente (Figura 13 B1 e D1). Já a exposição aos GA-AuNRs não afeta significativamente a quantidade de colônias formadas. Entretanto, 0,018; 0,18 e 1,8 mg L⁻¹ de GA-AuNRs levam à redução do tamanho das colônias em 25, 12,5 e 25%, respectivamente (Figura 13 B2 e D2).

Segundo a literatura, existe boa correlação entre ensaios de formação de colônias por células tumorais tratadas com agentes antitumorais e os resultados observados *in vivo* usando os mesmos agentes. (FIEBIG; MAIER; BURGER, 2004; MEYSKENS; SALMON, 1979). Portanto, os resultados obtidos sugerem forte potencial antitumoral para ambos nanomateriais estudados.

FIGURA 13 - CAPACIDADE DE FORMAÇÃO DE COLÔNIAS DE CÉLULAS DE MELANOMA APÓS EXPOSIÇÃO A CONCENTRAÇÕES NÃO CITOTÓXICAS DE GA-AuNSs OU GA-AuNRs



FONTE: A autora (2020).

LEGENDA: A) Células de melanoma B16-F10 foram plaqueadas na presença de GA-AuNSs ou GA-AuNRs em placas *Algimatrix™ 3D Culture System* e incubadas por 6 dias. As colônias formadas foram fixadas e coradas com cristal violeta. Os hidrogéis de alginato foram fotografados sobre placas de Petri com fundo quadriculado (grades de 2mm, B1 e B2) e as colônias contadas (normalizando pela área analisada de cada hidrogel, C1 e C2) e medidas (D1 e D2) usando o programa Fiji. Os valores de cada amostra foram comparados aos valores do respectivo controle (GA 0,4%, representado pela linha tracejada nos gráficos C1 e C2). As linhas tracejadas em D1 e D2 representam a mediana de tamanho das colônias de cada grupo. Foram realizados pelo menos 4 experimentos independentes em duplicata técnica. Teste t pareado (C1 e C2) ou Mann-Whitney (D1 e D2). ***p<0,001; ****p<0,0001.

O mecanismo da atividade antitumoral de nanopartículas de ouro não é muito bem compreendido. Acredita-se que suas propriedades de superfície sejam o fator mais importante para sua interação com as células. Geralmente as nanopartículas de ouro acabam confinadas dentro de endossomos e de alguma forma podem acabar interagindo de forma prejudicial com componentes importantes, como membranas, mitocôndrias e núcleo. O resultado pode incluir danos ao DNA, estresse oxidativo e morte celular. (ALKILANY; MURPHY, 2010; CHO et al., 2009; NATIVO; PRIOR; BRUST, 2008; PATIL; KIM, 2017). A maioria dos trabalhos tem como foco a ação citotóxica desses materiais. Entretanto, é preciso lembrar que citotoxicidade inespecífica - para as células tumorais, nesse caso - pode ser uma característica perigosa, uma vez que é a responsável pelos severos efeitos colaterais causados pelos quimioterápicos convencionais utilizados na clínica oncológica. (FLOREA; BÜSSELBERG, 2011; HANNUN, 1997; WATANABE et al., 1995). Interessantemente, no presente trabalho pôde-se constatar que em condições onde não há indícios de toxicidade celular, é possível observar redução importante em características funcionais necessárias para o fenótipo metastático das células tumorais de melanoma. Esse fato reforça que ainda há muito que compreender a respeito dos mecanismos de ação de nanopartículas de ouro em células tumorais. Entretanto, esse tipo de nanomaterial oferece a possibilidade de uma terapia com menos – ou até nenhum – efeito colateral, aproveitando-se do seu poder antitumoral inerente. Além disso, estudos anteriores usando nanopartículas de ouro funcionalizadas com GA indicam que a distribuição corporal desse tipo de material possa ser de grande valia para estudo em modelos de melanoma. (FENT et al., 2009; KATTUMURI et al., 2007).

5.4 POTENCIAL ANTITUMORAL E ANTIMETASTÁTICO DOS NANOMATERIAIS *IN VIVO*

Baseado nos resultados promissores obtidos *in vitro*, nesse tópico será abordada a hipótese de que GA-AuNSs e GA-AuNRs em condições não tóxicas *in vivo* podem levar à redução do crescimento tumoral e da capacidade metastática das células de melanoma. Tal estudo foi realizado utilizando um modelo duplo de melanoma (tumor primário e colonização pulmonar simultaneamente no mesmo animal). Na literatura, essa estratégia experimental é utilizada para diferentes

finalidades, como estudar o real efeito de quimioterápicos em um organismo que apresenta tanto tumor primário quanto focos metastáticos (CAISOVA et al., 2019; KUDO-SAITO et al., 2009, 2018; KUDO-SAITO; FUWA; KAWAKAMI, 2016), bem como compreender os efeitos de um modelo sobre o outro (KUBO et al., 2017). A escolha desse modelo vem ao encontro da motivação do nosso grupo de pesquisa. Busca-se por potenciais tratamentos não citotóxicos para o melanoma metastático, mais especificamente aqueles apresentando genética desfavorável (ou seja, que não apresentam mutação em *BRAF*) frente aos tratamentos disponíveis clinicamente e diagnosticados já em estágio metastático, para os quais ainda não existe tratamento efetivo. (DAVIS et al., 2018). O modelo duplo de melanoma, portanto, representa melhor a situação clínica alvo – se comparado à utilização de cada modelo em separado –, onde o indivíduo apresenta tanto tumor primário quanto focos metastáticos.

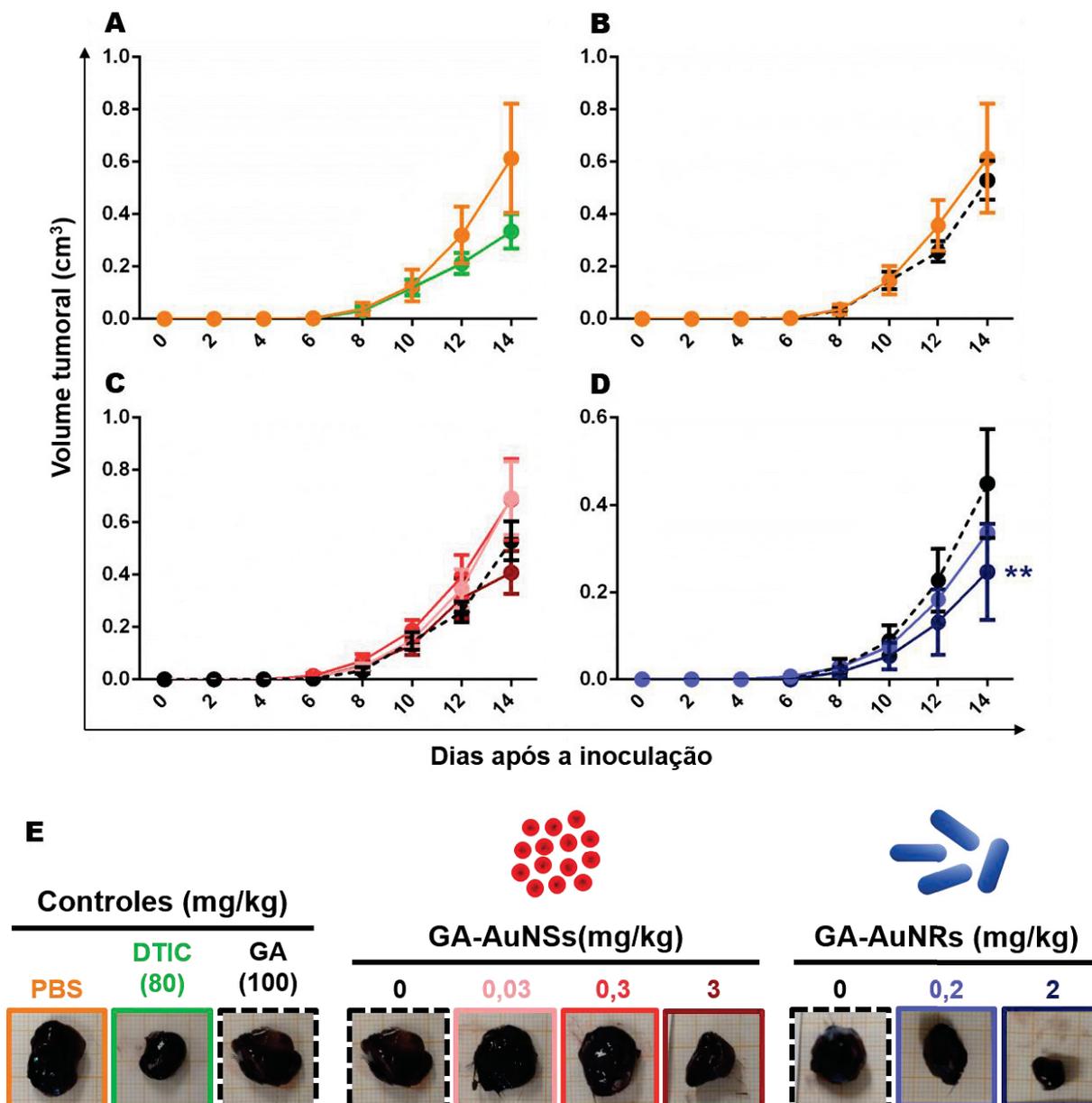
5.4.1 Potencial antitumoral dos nanomateriais *in vivo*

O potencial antitumoral dos nanomateriais foi investigado através do acompanhamento do crescimento dos tumores sólidos desenvolvidos a partir da inoculação subcutânea das células de melanoma. Não foram encontrados na literatura relatos acerca da eficácia de tratamentos antitumorais/antimetastáticos em modelo duplo de melanoma, em comparação a cada um dos modelos desenvolvidos separadamente. Portanto, com o objetivo de validar o funcionamento do modelo, foi utilizado como controle positivo o quimioterápico dacarbazina (DTIC). Dentre outras atividades, o principal mecanismo de ação da DTIC é a alquilação de ácidos nucleicos (POURAHMAD et al., 2009), que tem como consequências mutagênese e citotoxicidade (KONDO et al., 2010). Por esse motivo, a DTIC foi usada por décadas como tratamento padrão para melanoma (DAVEY; WESTHUIZEN; BOWDEN, 2016; EGGERMONT; KIRKWOOD, 2004), e ainda é em muitos casos. No Brasil, por exemplo, a DTIC ainda é o tratamento recomendado pelo Sistema único de Saúde para pacientes portadores de melanoma metastático que apresentem condições clínicas de tolerar a quimioterapia como primeira linha de tratamento, mesmo sem o aumento comprovado das taxas de sobrevida. (MINISTÉRIO DA SAÚDE (BRASIL). SECRETARIA DE ATENÇÃO À SAÚDE, 2014). Tal permanência da DTIC como primeira linha de tratamento no Brasil está fortemente relacionada ao impacto

financeiro que seria acarretado aos cofres públicos na ocasião da implementação de terapias mais modernas. (CORRÊA et al., 2019). Portanto, com início 5 dias após a inoculação das células tumorais – suficiente para o estabelecimento dos modelos tumorais, simulando um paciente diagnosticado com melanoma em estágio metastático -, os animais foram tratados por 10 dias consecutivos com DTIC, GA (veículo) ou diferentes doses de GA-AuNSs ou GA-AuNRs. A Figura 14 mostra os resultados obtidos a partir do acompanhamento do crescimento tumoral ao longo do tempo. O tratamento com DTIC reduz o volume do tumor primário subcutâneo em 46% após 10 dias de tratamento (resultado não significativo estatisticamente, Figura 14 A e E). Esse resultado está de acordo com o encontrado na literatura para exposições a doses semelhantes, por período semelhante, em modelo de crescimento de tumor primário de melanoma isoladamente. (JIN et al., 2011). Portanto o modelo provou-se válido para a investigação do efeito antitumoral intrínseco dos nanomateriais.

É possível observar ainda que o tratamento com o veículo não altera o crescimento tumoral (Figura 14 B e E), e sendo assim, os resultados obtidos com o tratamento com as nanopartículas de ouro foram comparados aos do veículo. Nenhuma das doses de GA-AuNSs testada altera o crescimento tumoral (Figura 14 C e E). O mesmo vale para 0,2 mg/kg de GA-AuNRs. Já 2 mg/kg de GA-AuNRs reduz o volume tumoral em 45% ao fim de 10 dias de tratamento (Figura 14 D e E).

FIGURA 14 - CRESCIMENTO DE TUMOR PRIMÁRIO SUBCUTÂNEO DE MELANOMA EM CAMUNDONGOS TRATADOS COM GA-AuNSs OU GA-AuNRs



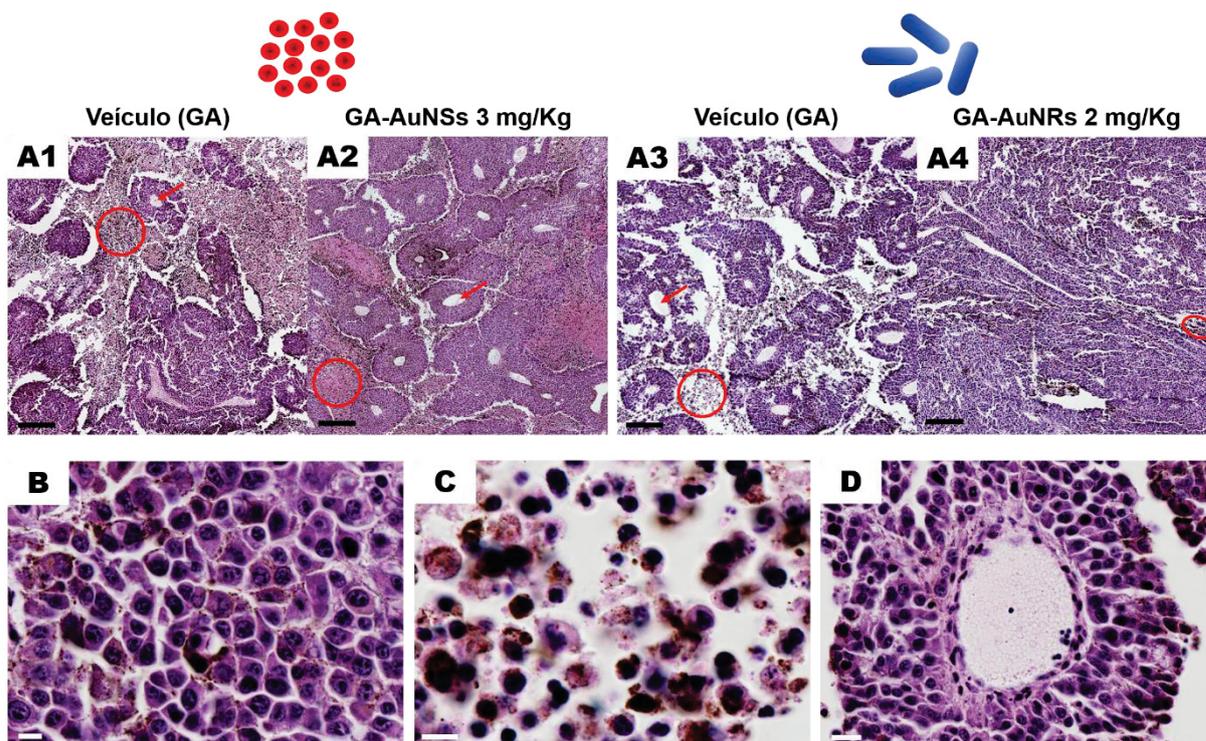
FONTE: A autora (2020).

LEGENDA: Células de melanoma B16-F10 foram inoculadas (via subcutânea e intravenosa, simultaneamente) em camundongos C57BL/6 (n = 4-8). Após 5 dias, os animais passaram a receber diariamente, uma vez por dia, injeções de PBS (controle), goma arábica (GA, veículo), dacarbazina (DTIC, 80 mg/kg), GA-AuNSs (0,03; 0,3 ou 3 mg/kg) ou GA-AuNRs (0,2 ou 2 mg/kg) até o 14º dia. A figura mostra os resultados de crescimento dos tumores primários gerados a partir da inoculação celular subcutânea). A-D) Curvas de crescimento tumoral obtidas a partir de medições com paquímetro digital. As linhas representativas de cada grupo estão representadas pelas mesmas cores em que em E. E) Fotografias representativas dos tumores extraídos de cada grupo experimental no 15º dia após a inoculação. Teste *two-way* ANOVA com pós teste Dunnett's para múltiplas comparações. ** $p < 0,01$ (veículo vs. GA-AuNRs 2 mg/kg).

Para investigar se algum fator estrutural tecidual poderia estar envolvido na redução do crescimento do tumor primário foi feita uma análise histológica dos

tumores após o tratamento. As Figuras 15 B, C e D mostram regiões de células tumorais vivas, de morte celular e um vaso sanguíneo, respectivamente, tipicamente encontradas nos cortes histológicos dos tumores. Nas regiões de células vivas e mortas é possível observar que são constituídas basicamente de células tumorais, uma vez que apresentam coloração marrom/avermelhada (Figura 15 B e C), resultante da presença da melanina produzida pelas células de melanoma. As regiões de morte celular distribuídas por todo o tecido contêm células em diversos estágios de morte celular, as quais apresentam material genético nuclear bastante compactado, fragmentos também compactados ou mesmo ausente (Figura 15 C). Os vasos sanguíneos encontrados, em geral, são de grande calibre (Figura 15 D). As imagens panorâmicas do centro do tumor mostram que não ocorrem alterações teciduais evidentes após tratamento com GA-AuNSs (Figura 15 A1 e A2). Entretanto, o tratamento com GA-AuNRs promove intensa redução na extensão das áreas de morte celular e na vascularização intratumoral comparado ao controle (Figura 15 A3 e A4). Ambos os fatores – redução da vascularização (PANG; POON, 2006; RIBATTI; ANNESE; LONGO, 2010; SOLESVIK; ROFSTAD; BRUSTAD, 1982) e da morte celular (por necrose e/ou apoptose) (BACHMANN et al., 2008; LADSTEIN et al., 2012) – são fortes indicadores de bom prognóstico. Portanto, os GA-AuNRs são capazes de não apenas retardar o crescimento tumoral, como também promover alterações estruturais no tecido tumoral, diretamente relacionadas à melhora do prognóstico da doença.

FIGURA 15 - HISTOLOGIA DE TUMOR PRIMÁRIO SUBCUTÂNEO DE MELANOMA APÓS TRATAMENTO COM GA-AuNSs OU GA-AuNRs



FONTE: A autora (2020).

LEGENDA: Os tumores sólidos subcutâneos dos camundongos previamente tratados com GA-AuNSs (3 mg/kg) ou GA-AuNRs (2 mg/kg) foram fixados e processados para histologia. Os cortes histológicos foram corados com hematoxilina e eosina e então escaneados. A) Vista panorâmica do interior (região central) dos tumores. Regiões circulares ou oval = regiões de morte celular, flechas = vasos sanguíneos, barras de escala = 200 μ m. Em maior aumento, regiões típicas de células vivas (B), morte celular (C) e vaso sanguíneo (D) de uma amostra controle. Pontos de coloração marrom = melanina, barras de escala = 10 μ m (B e C) e 20 μ m (D). As imagens mostradas são representativas de 5 animais de cada grupo.

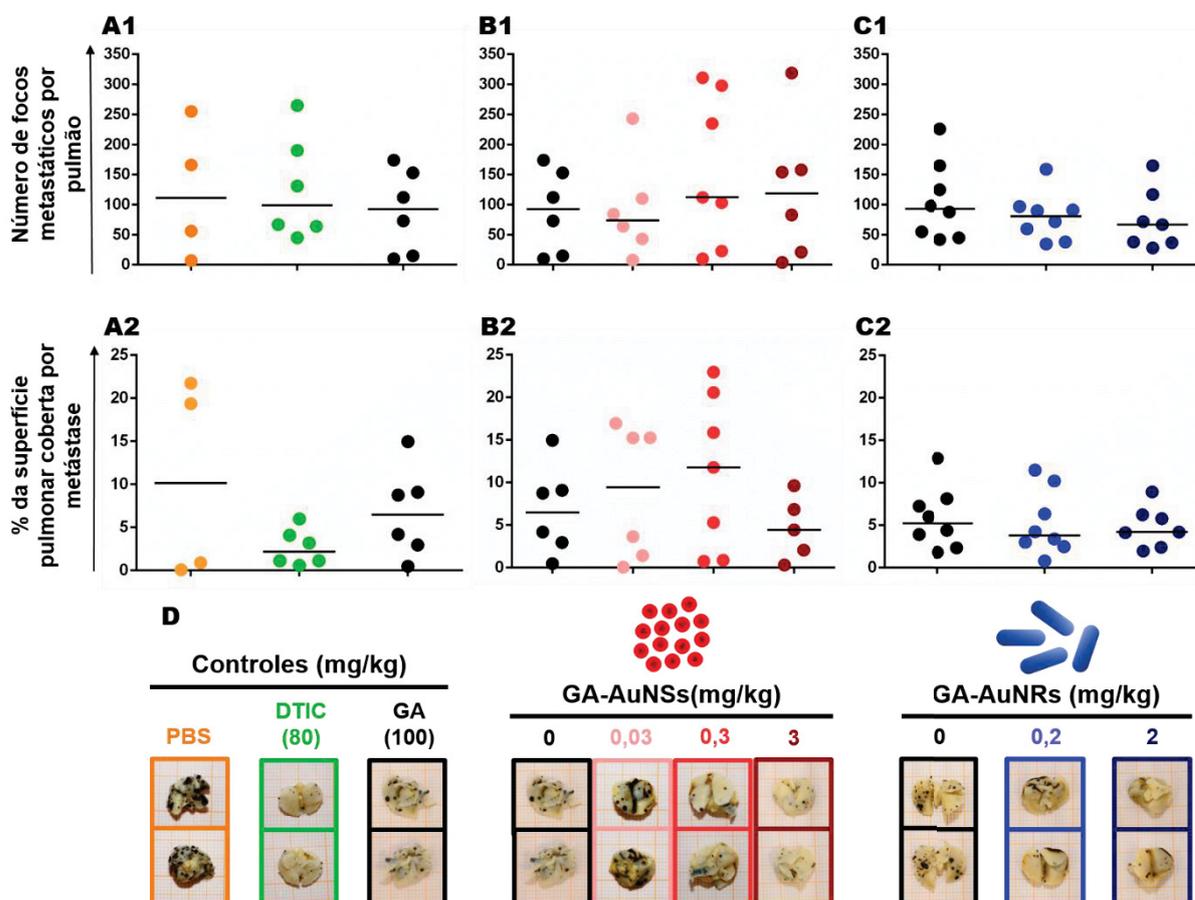
5.4.2 Potencial antimetastático dos nanomateriais *in vivo*

O potencial antimetastático dos nanomateriais foi investigado utilizando a mesma abordagem experimental descrita no tópico anterior. Entretanto, aqui foi estudada a colonização dos pulmões por células de melanoma. Os resultados mostram que a DTIC mantém sua eficiência na redução da colonização pulmonar quando em modelo duplo de melanoma, onde é possível observar menor porcentagem da área superficial do pulmão coberta por metástases (Figura 16 A2 e D). Tal efeito da DTIC também corrobora o esperado de acordo com a literatura. (LE NOCI et al., 2015; SZENDE et al., 2003; WANG et al., 2012). No modelo de colonização pulmonar a GA também não apresenta efeito comparada ao controle (Figura 16 A1, A2 e D). Os tratamentos com GA-AuNSs (Figura 16 B1, B2 e D) e

GA-AuNRs (Figura 16 C1, C2 e D) não alteraram estatisticamente a colonização superficial dos pulmões após 10 dias de tratamento. Foi observada uma discrepância no perfil de colonização pulmonar dentro de alguns grupos, onde apesar de não haver diferença no número de focos metastáticos, é possível observar uma tendência da redução na porcentagem da superfície pulmonar colonizada, como em DTIC (Figura 16 A1 e A2, respectivamente), por exemplo. Ou ainda, uma discordância entre o número de focos metastáticos e a imagem panorâmica do pulmão a olho nu. Isso provavelmente se deve ao fato de que a contagem dos focos metastáticos foi feita sob lupa, onde é possível detectar mesmo os focos bem pequenos. Ainda no exemplo da DTIC, essa mesma quantidade de nódulos comparada ao controle acaba resultando em menor porcentagem da superfície pulmonar colonizada pelo fato de tais nódulos individualmente serem bastante reduzidos em tamanho.

Além da colonização superficial dos pulmões, foi também investigada a colonização intrapulmonar através de histologia. Foi utilizada a coloração com Fontana-Masson, que evidencia a presença de melanina (BARBOSA et al., 1984) nos focos metastáticos, facilitando sua visualização. As imagens obtidas mostram que GA-AuNSs não alteram a espessura/profundidade dos nódulos metastáticos da superfície do pulmão (Figura 17 B1 e B2) e nem a quantidade (Figura 17 A1 e A2) e tamanho (Figura 17 C1 e C2) dos nódulos intrapulmonares, comparado ao controle. Por outro lado, o tratamento com GA-AuNRs nitidamente reduz a espessura/profundidade dos nódulos metastáticos da superfície do pulmão (Figura 17 B3 e B4), a quantidade (Figura 17 A3 e A4) e tamanho (Figura 17 C2 e C4) dos nódulos intrapulmonares.

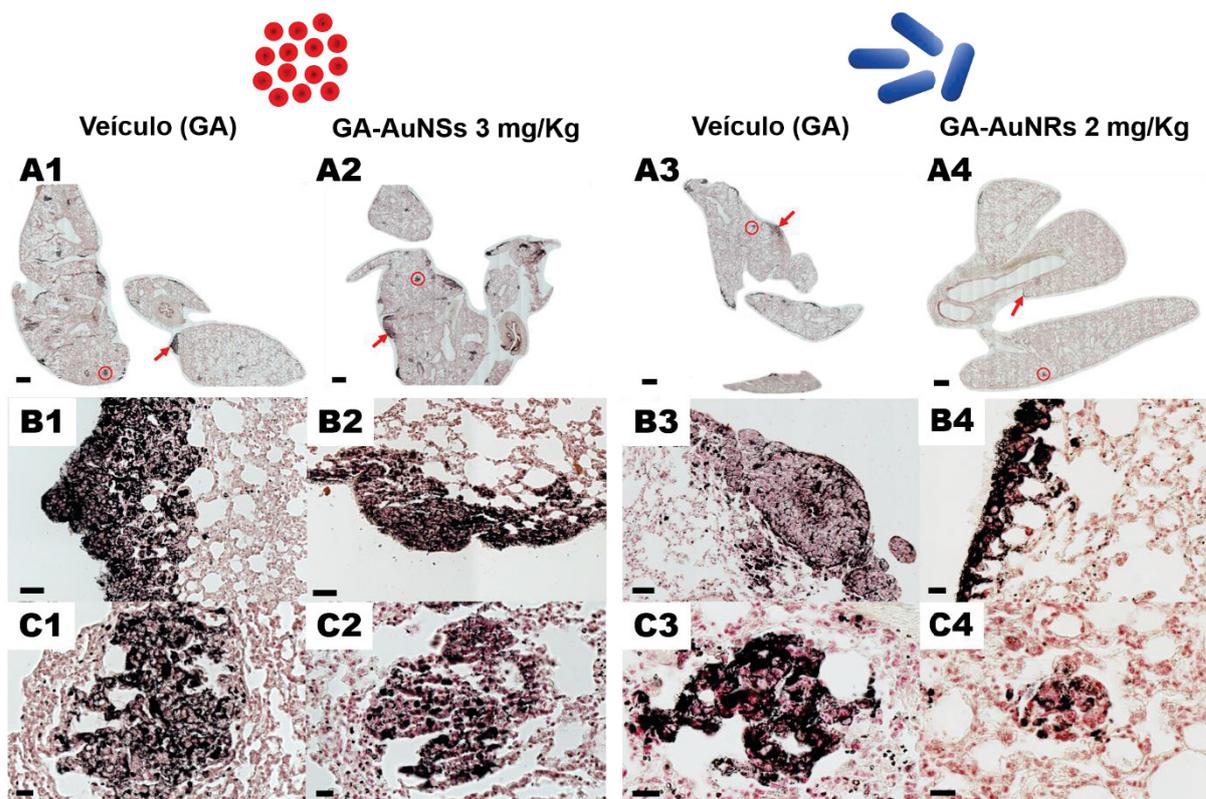
FIGURA 16 - COLONIZAÇÃO PULMONAR POR CÉLULAS DE MELANOMA EM CAMUNDONGOS APÓS TRATAMENTO COM GA-AuNSs OU GA-AuNRs



FONTE: A autora (2020).

LEGENDA: Células de melanoma B16-F10 foram inoculadas (via subcutânea e intravenosa, simultaneamente) em camundongos C57BL/6 (n = 4-8). Após 5 dias, os animais passaram a receber diariamente, uma vez por dia, injeções de PBS (controle), goma arábica (GA, veículo), dacarbazina (DTIC, 80 mg/kg), GA-AuNSs (0,03; 0,3 ou 3 mg/kg) ou GA-AuNRs (0,2 ou 2 mg/kg) até o 14º dia. A figura mostra os resultados de colonização pulmonar. A1-C1) Contagem de focos metastáticos presentes na superfície de cada pulmão, realizada manualmente sob lupa. A2-C2) Quantificação da área da superfície pulmonar coberta por focos metastáticos. Os pontos representativos de cada grupo estão representados pelas mesmas cores da borda das imagens dos pulmões. Teste t. $\alpha = 0,05$. D) Fotografias representativas dos pulmões (vistas dorsal e ventral do mesmo pulmão) extraídos de cada grupo experimental no 15º dia após a inoculação (pontos escuros = nódulos metastáticos).

FIGURA 17 - HISTOLOGIA DE PULMÕES COLONIZADOS POR CÉLULAS DE MELANOMA APÓS TRATAMENTO COM GA-AuNSs OU GA-AuNRs



FONTE: A autora (2020).

LEGENDA: Os pulmões dos camundongos portadores de melanoma previamente tratados com GA-AuNSs (3 mg/kg) ou GA-AuNRs (2 mg/kg) foram fixados e processados para histologia. Os cortes histológicos foram corados com Fontana-Masson e então escaneados. A) Vista panorâmica do interior dos pulmões. Flechas = nódulos metastáticos superficiais, círculos = nódulos metastáticos intrapulmonares, barras de escala = 500 μ m. B e C) Nódulos superficiais e intrapulmonares representativos, respectivamente. Barras de escala = 50 μ m (B) e 20 μ m (C). As imagens mostradas são representativas de 5 animais de cada grupo.

Vários parâmetros fenotípicos celulares são necessários durante o processo de metástase. Como mencionado anteriormente, para que uma célula tumoral seja capaz de metastisar, ela precisa ser capaz de completar várias etapas desde seu desprendimento do tumor primário até a bem-sucedida formação de tumores secundários em outro órgão. A aquisição de capacidade invasiva permite que as células realizem várias daquelas etapas, como mover-se pelo tecido ao redor do tumor primário, romper barreiras de matriz extracelular, entrar em vasos sanguíneos ou linfáticos, sair da circulação e, por fim, entrar em um novo tecido. (revisado por WELCH; HURST, 2019). O modelo de metástase utilizado no presente trabalho simula apenas o final de todo o processo invasivo, pois as células são inoculadas diretamente na circulação. Dados da literatura mostram que a maioria (82%) das

células de melanoma injetadas na circulação sanguínea de camundongos já foram capazes de extravasar para o tecido de destino após 3 dias. (LUZZI et al., 1998). No presente trabalho, o tratamento *in vivo* teve início somente 5 dias após a inoculação das células de melanoma, período mais que suficiente para que as células invadam o tecido, se estabeleçam e comecem a desenvolver colônias. (CAMERON et al., 2000). Portanto, é pouco provável que a redução da quantidade de nódulos intrapulmonares resulte da ação dos GA-AuNRs sobre a capacidade invasiva das células tumorais observada anteriormente *in vitro*.

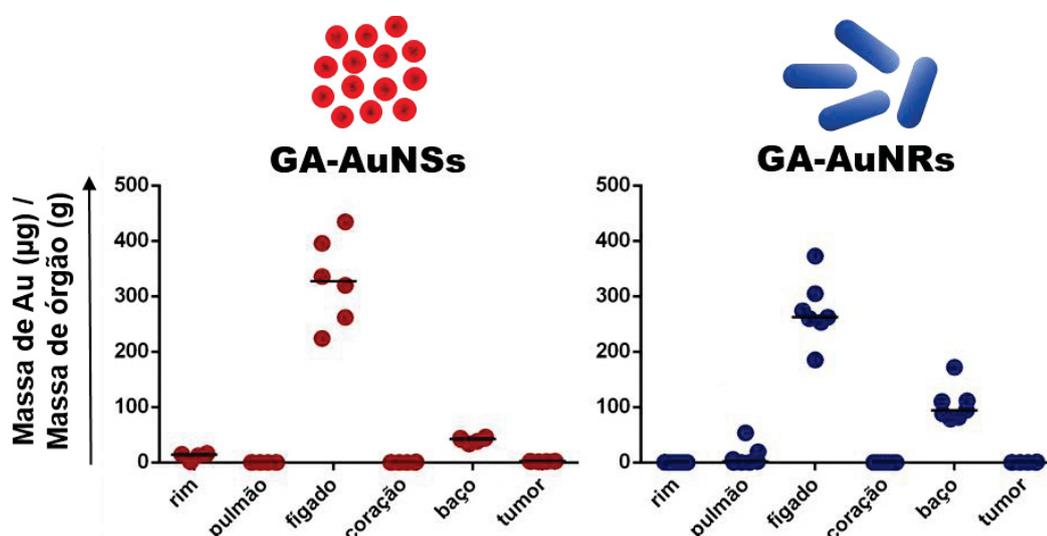
Em estágio mais avançado do processo de metástase, as células que sobreviveram ao processo de disseminação precisam colonizar eficientemente o novo órgão, processo que pode durar meses ou até anos, uma vez que as células cancerosas podem permanecer em estado de dormência. (WELCH; HURST, 2019). Nesse sentido, a capacidade de uma célula tumoral de se dividir e gerar uma colônia a partir de si é considerada fundamental, uma vez que está diretamente relacionada à agressividade do seu potencial metastático. (MORI et al., 2009). De acordo com a literatura, células de melanoma metastático com reduzida capacidade de formação de colônias *in vitro* - devido à redução na expressão de glicoproteínas de superfície que permitem a adesão entre as células tumorais – apresentam menor capacidade de crescer de forma independente de ancoragem e formar nódulos metastáticos *in vivo*. (LOTAN; RAZ, 1983). Dessa forma, o retardamento da formação de colônias observado após tratamento *in vitro* pode ter participação na tendência de redução da quantidade e tamanho dos nódulos metastáticos *in vivo*, ou seja, na presença dos GA-AuNRs as células de melanoma presentes no pulmão são menos capazes de se dividir e gerar colônias a partir de si.

5.5 BIODISTRIBUIÇÃO DOS NANOMATERIAIS *IN VIVO*

O efeito EPR supõe que nanopartículas injetadas na circulação sanguínea devem se acumular passivamente em tecidos tumorais devido à elevada permeabilidade vascular e à reduzida depuração linfática encontrada nesses tecidos. (MAEDA, 2010). Considerando os efeitos observados nos tumores e pulmões dos animais tratados com GA-AuNRs e a teoria do efeito EPR, foi investigada a biodistribuição dos nanomateriais nos diferentes órgãos. Para isso, foi feita a quantificação de ouro por ICP-OES nos diferentes órgãos após tratamento *in vivo*

por 10 dias. A Figura 18 mostra que ambos GA-AuNSs e GA-AuNRs se acumulam principalmente no fígado, seguido do baço. Uma pequena quantidade de GA-AuNSs fica acumulada nos rins, enquanto uma pequena quantidade de GA-AuNRs pode ser encontrada nos pulmões de alguns animais. Esse último fator pode estar relacionado à redução do tamanho dos nódulos pulmonares nos animais tratados com GA-AuNRs. Não foi detectado ouro nos pulmões dos animais tratados com GA-AuNSs, nos rins dos animais tratados com GA-AuNRs, assim como no coração e tumor após tratamento com ambos nanomateriais.

FIGURA 18 - BIODISTRIBUIÇÃO DE OURO EM CAMUNDONGOS PORTADORES DE MELANOMA APÓS TRATAMENTO COM GA-AuNSs OU GA-AuNRs



FONTE: A autora (2020).

LEGENDA: Os órgãos dos camundongos portadores de melanoma previamente tratados com GA-AuNSs (3 mg/kg) ou GA-AuNRs (2 mg/kg) foram fixados. Uma porção de cada órgão foi pesada e processada para o ICP-OES para quantificar a massa de ouro acumulada, que foi então dividida pela massa de órgão utilizada. Cada ponto no gráfico representa um animal. As barras representam a mediana.

Na corrente sanguínea, é comum que nanopartículas sejam opsonizadas, o que permite que sejam reconhecidas e fagocitadas por macrófagos e, conseqüentemente, acumuladas em órgãos do sistema fagocítico mononuclear, como fígado e baço. (PARK; OH, 2014). No caso de GA-AuNRs, Akiyama e colaboradores mostraram que a proporção de AuNRs para o agente funcionalizante de superfície afeta diretamente sua biodistribuição. Além disso, foi mostrado que uma dose de injeção superior a 39 µg (o máximo usado no presente trabalho foi de

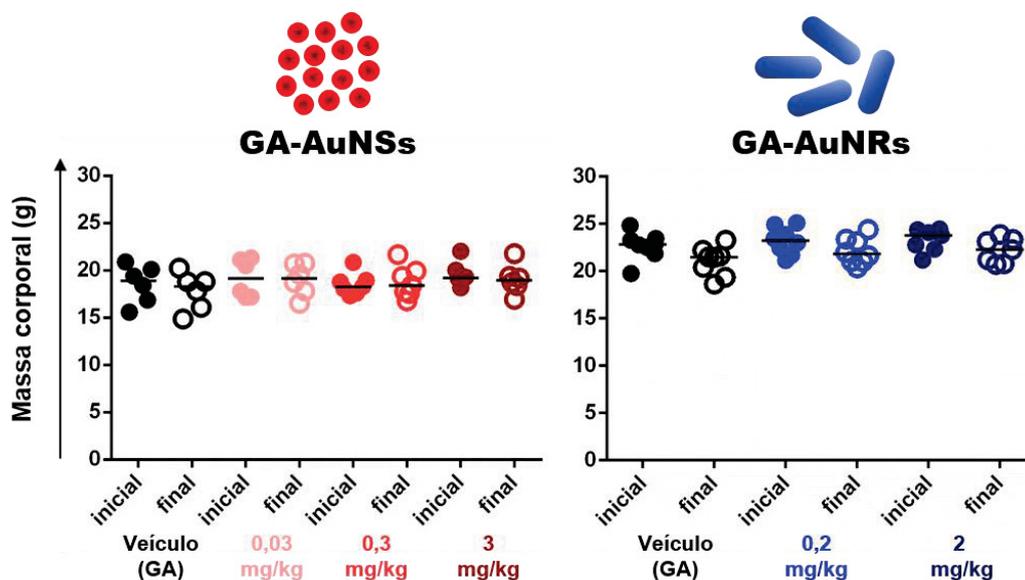
46 µg/injeção) satura a captação hepática e, conseqüentemente, o “excesso de ouro” se distribui por outros órgãos. (AKIYAMA et al., 2009). Ainda, é possível que a GA, que é uma molécula de alta massa molecular, tenha aumentado o tamanho final das nanopartículas de ouro a ponto de não serem entregues de forma tão facilitada ao tecido tumoral. Ou ainda, os GA-AuNRs talvez sejam entregues ao tumor, porém não ficam retidos no tecido tumoral devido ao reconhecimento e fagocitose pelo sistema fagocítico mononuclear. Curiosamente - e diferente dos AuNRs direcionados à terapia fototérmica que dependem diretamente da condução ativa para o acúmulo intratumoral (GREEN et al., 2011) -, os GA-AuNRs não dependem da retenção no tumor para retardar seu crescimento. Esse fator é muito interessante, pois o efeito EPR tem se mostrado funcional em modelos de roedores, mas não em humanos. (DANHIER, 2016). Por fim, uma adequação das condições de tratamento (dose, frequência ou proporção de GA em relação aos AuNRs, por exemplo) poderia melhorar a eficácia antitumoral de GA-AuNRs e até mesmo revelar um efeito antimetastático significativo através da modificação da sua biodistribuição.

5.6 TOXICIDADE DOS NANOMATERIAIS *IN VIVO*

Além dos efeitos antitumorais e antimetastáticos dos nanomateriais, nesse trabalho investigou-se se tais efeitos seriam acompanhados de baixa ou nenhuma toxicidade. Portanto, foram verificados após o tratamento por 10 dias com as nanopartículas de ouro vários parâmetros fisiológicos dos animais que pudessem trazer indícios de toxicidade e/ou efeitos adversos decorrentes dos tratamentos.

A perda de massa muscular esquelética generalizada (sarcopenia) está intimamente relacionada à toxicidade de drogas utilizadas no tratamento de câncer e mau prognóstico. (ANTOUN; BORGET; LANOY, 2013). De maneira geral, no experimento realizado utilizando GA-AuNSs não se observa perda evidente de massa ao longo do desenvolvimento tumoral. Já no experimento utilizando GA-AuNRs todos os animais perderam em média cerca de 6% da massa corporal ao longo dos 15 dias de experimentação, independentemente do grupo experimental. Ou seja, o tratamento com GA-AuNRs não altera a perda de massa comumente associada ao desenvolvimento de câncer (Figura 19).

FIGURA 19 - MASSA CORPORAL DE CAMUNDONGOS PORTADORES DE MELANOMA ANTES E APÓS TRATAMENTO COM GA-AuNSs OU GA-AuNRs



FONTE: A autora (2020).

LEGENDA: Os camundongos foram pesados antes da inoculação das células de melanoma e após o término do experimento (15 dias depois). A massa do tumor primário subcutâneo foi subtraída da massa corporal final. Cada ponto no gráfico representa um animal. As barras representam a mediana. Teste t pareado entre a massa inicial e a final. Alpha = 0,05.

Ao final do experimento, os órgãos dos animais foram coletados e pesados. A Tabela 2 mostra que nenhuma das doses de nenhum dos tratamentos altera a massa dos diferentes órgãos (rins, pulmão, fígado, coração e baço). Portanto, os tratamentos não prejudicam o funcionamento dos órgãos a ponto de gerar hiperplasia.

Com o objetivo de investigar se a administração diária das nanopartículas de ouro intravenosamente poderia ter afetado de alguma forma as células sanguíneas dos animais, foi feito hemograma completo dos mesmos ao final do período de tratamento. As Tabelas 3 e 4 mostram que GA-AuNSs e GA-AuNRs não causam alterações estatisticamente significativas na contagem das células sanguíneas e nem nos seus parâmetros morfométricos, respectivamente. Apesar disso, é importante observar a forte tendência de diminuição da taxa sanguínea de leucócitos (leucopenia) nos animais tratados com DTIC (Tabela 3). Leucopenia, muitas vezes severa, é um efeito adverso clássico resultante do tratamento de pacientes portadores de melanoma metastático com DTIC. (EGGERMONT; KIRKWOOD, 2004). Dessa forma, o tratamento com GA-AuNRs (2 mg/kg) apresenta efeito antitumoral semelhante ao da DTIC, porém desacompanhado de tal efeito adverso.

Em conjunto, esses resultados mostram que ambos nanomateriais são biocompatíveis às células sanguíneas e, conseqüentemente, com a administração sistêmica diária.

TABELA 2 - MASSA DOS ÓRGÃOS DE CAMUNDONGOS PORTADORES DE MELANOMA APÓS TRATAMENTO COM GA-AuNSs OU GA-AuNRs.

Grupo experimental	Rins		Pulmão		Fígado		Coração		Baço		
	Massa (g)	%	Massa (g)	%	Massa (g)	%	Massa (g)	%	Massa (g)	%	
Controle (PBS)	0,27 ± 0,02	1,36 ± 0,10	0,15 ± 0,01	0,77 ± 0,00	1,19 ± 0,20	5,94 ± 0,75	0,12 ± 0,02	0,60 ± 0,11	0,08 ± 0,00	0,40 ± 0,02	
DTIC80 mg/kg	0,26 ± 0,04	1,37 ± 0,06	0,14 ± 0,02	0,78 ± 0,12	1,06 ± 0,08	5,88 ± 0,56	0,11 ± 0,03	0,60 ± 0,21	0,06 ± 0,02	0,34 ± 0,09	
GA-AuNSs	Veículo (GA)	0,25 ± 0,03	1,40 ± 0,11	0,14 ± 0,01	0,80 ± 0,07	0,98 ± 0,11	5,52 ± 0,24	0,09 ± 0,01	0,53 ± 0,02	0,08 ± 0,01	0,44 ± 0,06
	0,03 mg/kg	0,26 ± 0,03	1,35 ± 0,09	0,17 ± 0,02	0,90 ± 0,15	1,05 ± 0,14	5,50 ± 0,35	0,10 ± 0,01	0,53 ± 0,05	0,08 ± 0,00	0,44 ± 0,04
	0,3 mg/kg	0,25 ± 0,02	1,36 ± 0,09	0,16 ± 0,02	0,84 ± 0,14	1,21 ± 0,32	5,86 ± 0,71	0,10 ± 0,01	0,53 ± 0,03	0,09 ± 0,01	0,51 ± 0,11
	3 mg/kg	0,25 ± 0,02	1,47 ± 0,26	0,15 ± 0,02	0,81 ± 0,14	1,10 ± 0,20	5,77 ± 0,78	0,10 ± 0,01	0,53 ± 0,05	0,09 ± 0,01	0,46 ± 0,04
GA-AuNRs	Veículo (GA)	0,29 ± 0,03	1,38 ± 0,07	0,15 ± 0,01	0,72 ± 0,06	0,97 ± 0,02	4,76 ± 0,33	0,11 ± 0,01	0,52 ± 0,04	0,07 ± 0,01	0,35 ± 0,05
	0,2 mg/kg	0,29 ± 0,04	1,35 ± 0,13	0,15 ± 0,03	0,70 ± 0,12	1,04 ± 0,08	4,78 ± 0,21	0,11 ± 0,01	0,51 ± 0,03	0,07 ± 0,01	0,33 ± 0,04
	2 mg/kg	0,29 ± 0,03	1,33 ± 0,08	0,16 ± 0,02	0,72 ± 0,05	1,04 ± 0,08	4,72 ± 0,22	0,11 ± 0,01	0,50 ± 0,05	0,08 ± 0,01	0,35 ± 0,07

FONTE: A autora (2020).

LEGENDA: Os dados são apresentados como média ± desvio padrão. Teste Kruskal-Wallis seguido do teste Dunn's para múltiplas comparações. Alpha = 0,05. % = massa do órgão relativa à massa corporal total.

TABELA 3 - CONTAGEM CELULAR DO SANGUE DE CAMUNDONGOS PORTADORES DE MELANOMA APÓS TRATAMENTO COM GA-AuNSs OU GA-AuNRs.

Grupo experimental	contagem x 10 ³ / μ l				%			RBC (x 10 ⁶ / μ l)	PLT (x 10 ³ / μ L)	
	WBC	Lin	Mon	Gran	Lin	Mon	Gran			
Controle (PBS)	2,45 ± 0,79	1,75 ± 0,48	0,03 ± 0,05	0,68 ± 0,29	71,55 ± 5,66	2,60 ± 0,24	25,85 ± 5,44	8,19 ± 0,30	341 ± 86,96	
DTIC 80 mg/kg	0,80 ± 0,44	0,48 ± 0,40	0,02 ± 0,04	0,20 ± 0,23	45,08 ± 37,31	1,67 ± 1,62	20,07 ± 19,64	7,05 ± 0,73	358,20 ± 48,59	
GA-AuNSs	Veículo (GA)	2,88 ± 0,44	2,40 ± 0,93	0,12 ± 0,10	0,95 ± 0,57	70 ± 8,28	2,98 ± 0,91	27,02 ± 7,73	8,01 ± 0,90	350,70 ± 45,89
	0,03 mg/kg	2,77 ± 0,91	1,95 ± 0,65	0,07 ± 0,05	0,62 ± 0,08	69,42 ± 6,45	2,80 ± 0,14	27,93 ± 6,09	8,45 ± 0,53	361 ± 31,14
	0,3 mg/kg	2,43 ± 0,57	1,54 ± 0,54	0,07 ± 0,08	0,81 ± 0,24	65,93 ± 5,12	3,15 ± 0,36	30,92 ± 4,77	6,92 ± 1,83	302,10 ± 33,56
	3 mg/kg	3,42 ± 1,07	2,46 ± 0,82	0,08 ± 0,04	0,88 ± 0,33	72,58 ± 6,61	2,46 ± 0,38	24,96 ± 6,33	8,61 ± 0,17	384,80 ± 57,09
GA-AuNRs	Veículo (GA)	2,39 ± 0,47	1,81 ± 0,32	0,04 ± 0,05	0,44 ± 0,10	76,16 ± 7,59	2,61 ± 0,45	21,23 ± 7,31	9,41 ± 0,56	359,30 ± 51,05
	0,2 mg/kg	2,09 ± 0,76	1,54 ± 0,56	0,04 ± 0,05	0,50 ± 0,21	73,41 ± 4,51	2,54 ± 0,39	24,04 ± 4,21	8,78 ± 1,39	348,40 ± 27,45
	2 mg/kg	2,84 ± 1,11	2,16 ± 0,76	0,07 ± 0,05	0,48 ± 0,12	76,79 ± 4,81	2,27 ± 0,29	20,74 ± 4,45	9,63 ± 0,55	350,30 ± 10,75

FONTE: A autora (2020).

LEGENDA: Os dados são apresentados como média ± desvio padrão. Teste Kruskal-Wallis seguido do teste Dunn's para múltiplas comparações. Alpha = 0,05. WBC = leucócitos, Lin = linfócitos, Mon = monócitos, Gran = granulócitos, RBC = eritrócitos, PTL = plaquetas, DTIC = dacarbazina.

TABELA 4 - PERFIL HEMATOLÓGICO DE CAMUNDONGOS PORTADORES DE MELANOMA APÓS TRATAMENTO COM GA-AuNSs OU GA-AuNRs.

Grupo experimental	HGB (g/dL)	HCT (%)	MCV (fL)	MCH (pg)	MCHC (g/dL)	RDW (%)	MPV (fL)	PDW (%)	PCT (%)	
Controle (PBS)	8,95 ± 3,21	34,93 ± 1,79	42,43 ± 0,79	12,93 ± 0,32	30,58 5 ± 1,01	15,40 ± 0,93	5,68 ± 0,15	14,70 ± 0,08	0,19 ± 0,06	
DTIC 80 mg/kg	9,25 ± 0,90	30,48 ± 3,09	43,32 ± 0,52	13,08 ± 0,16	30,32 5 ± 0,25	16,35 ± 0,44	5,93 ± 0,52	14,78 ± 0,25	0,21 ± 0,03	
GA-AuNSs	Veículo (GA)	10,32 ± 1,14	33,87 ± 3,65	42,38 ± 0,84	12,85 ± 0,12	30,10 5 ± 0,24	15,33 ± 0,66	5,70 ± 0,07	14,72 ± 0,04	0,19 ± 0,02
	0,03 mg/kg	10,88 ± 0,69	35,72 ± 1,86	42,33 ± 0,52	12,83 ± 0,18	30,40 5 ± 0,50	15,82 ± 0,54	5,72 ± 0,08	14,62 ± 0,08	0,21 ± 0,02
	0,3 mg/kg	8,91 ± 2,34	29,40 ± 7,94	42,49 ± 1,04	12,86 ± 0,26	30,37 5 ± 0,63	15,43 ± 0,63	5,96 ± 0,26	14,77 ± 0,17	0,18 ± 0,01
	3 mg/kg	11,13 ± 0,28	36,80 ± 1,30	42,84 ± 0,76	12,82 ± 0,16	30,08 5 ± 0,44	15,60 ± 0,43	5,82 ± 0,26	14,72 ± 0,16	0,22 ± 0,04
GA-AuNRs	Veículo (GA)	11,83 ± 0,75	39,09 ± 2,62	41,61 ± 0,69	12,53 ± 0,12	30,21 ± 0,35	15,83 ± 0,44	5,61 ± 0,12	14,65 ± 0,12	0,20 ± 0,03
	0,2 mg/kg	10,97 ± 1,79	36,24 ± 5,74	41,36 ± 0,80	12,46 ± 0,15	30,21 ± 0,46	15,83 ± 0,40	5,69 ± 0,16	14,70 ± 0,22	0,20 ± 0,02
	2 mg/kg	12,07 ± 0,72	39,63 ± 2,37	41,30 ± 0,42	12,54 ± 0,13	30,47 ± 0,35	16,01 ± 0,45	5,60 ± 0,10	14,59 ± 0,11	0,20 ± 0,01

FONTE: A autora (2020).

LEGENDA: Os dados são apresentados como média ± desvio padrão. Teste Kruskal-Wallis seguido do teste Dunn's para múltiplas comparações. Alpha = 0,05. HGB = hemoglobina, HCT = hematócrito, MCV = volume corpuscular médio, MCH = hemoglobina corpuscular média, MCHC = concentração de hemoglobina corpuscular média, RDW = amplitude de distribuição dos eritrócitos, MPV = volume plaquetário médio, PDW = amplitude de distribuição de plaquetas, PCT = plaquetócrito, DTIC = dacarbazina.

Considerando a acumulação preferencial das nanopartículas de ouro no fígado e também a leve perda de massa corporal dos animais no experimento com GA-AuNRs, foi também feito um perfil bioquímico do sangue a fim de investigar moléculas que pudessem dar um indício de danos no fígado e perda patológica de massa muscular. A Tabela 5 mostra que nenhum dos nanomateriais induz alterações estatisticamente significativas nas concentrações sanguíneas de ALT, AST ou creatinina quando comparados ao veículo. A presença de ALT e AST no soro sanguíneo é um parâmetro laboratorial muito usado para detectar indícios de

danos no fígado. (WILLIAMS; HOOFNAGLE, 1988). É interessante notar que todos os tratamentos, inclusive com o veículo (GA), apresentam concentrações plasmáticas de ALT menores do que as dos animais controle (PBS). O tratamento com GA-AuNRs, especialmente, reduz a concentração de ALT para níveis de normalidade – dados da literatura mostram que a concentração plasmática basal de ALT em camundongos C57 saudáveis é de 25-50 U/L (FENG et al., 2004), o que foi confirmado pelo nosso grupo em outros trabalhos (nível basal = 29,65 U/L em média, dados não publicados). Já os níveis de creatinina no soro podem indicar perda de massa muscular em indivíduos doentes, uma vez que é produzida e liberada pelos músculos de forma proporcional à massa corporal. (THONGPRAYOON; CHEUNGPASITPORN; KASHANI, 2016). Portanto, esses dados permitem concluir que apesar do acúmulo de nanopartículas de ouro no fígado esse não induziu danos nesse órgão. Pelo contrário, parecem recuperar a homeostase hepática perdida durante o desenvolvimento tumoral. Além disso, a perda de massa corporal (não relacionada ao tratamento com GA-AuNRs) não altera a quantidade de creatinina produzida pelos músculos, mostrando que a massa magra é mantida.

Em conjunto, os resultados obtidos a partir de uma vasta busca por indícios de toxicidade mostram que o tratamento intravenoso diário com GA-AuNSs ou GA-AuNRs não induz toxicidade ou qualquer tipo de efeitos adversos nos camundongos portadores de melanoma. Futuramente, ensaios de sobrevivência podem revelar se o efeito antitumoral/antimetastático de GA-AuNRs aliado à melhora no estado geral de saúde dos animais se reflete em aumento de sobrevivência.

TABELA 5 - PERFIL BIOQUÍMICO DO SANGUE DE CAMUNDONGOS PORTADORES DE MELANOMA APÓS TRATAMENTO COM GA-AuNSs OU GA-AuNRs.

Grupo experimental		ALT/TGP (U/L)	AST/TGO (U/L)	creatinina (mg/dL)
Controle (PBS)		103,90 ± 61,76	188,40 ± 96,03	0,48 ± 0,05
DTIC 80 mg/kg		45,63 ± 20,91	272,90 ± 98,55	0,50 ± 0
GA-AuNSs	Veículo (GA)	58,40 ± 11,86	336,60 ± 61,02	0,52 ± 0,04
	0,03 mg/kg	74,82 ± 28,09	470,20 ± 290,60	0,47 ± 0,05
	0,3 mg/kg	64,78 ± 24,66	270 ± 246,50	0,47 ± 0,08
	3 mg/kg	67,40 ± 19,61	124,90 ± 119,40	0,52 ± 0,11
GA-AuNRs	Veículo (GA)	30,53 ± 13,85	175,60 ± 129,90	0,33 ± 0,05
	0,2 mg/kg	25,37 ± 12,41	200,10 ± 167,30	0,31 ± 0,04
	2 mg/kg	25,86 ± 6,75	210,70 ± 173,50	0,32 ± 0,04

FONTE: A autora (2020).

LEGENDA: Os dados são apresentados como média ± desvio padrão. Teste Kruskal-Wallis seguido do teste Dunn's para múltiplas comparações. Alpha = 0,05. ALT/TGP = alanina aminotransferase, AST/TGO = aspartato aminotransferase, DTIC = dacarbazina.

5.7 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

A Tabela 6 e a Figura 20 mostram em resumo os resultados - e consequentes conclusões - obtidos no presente trabalho.

TABELA 6 - RESUMO DOS RESULTADOS OBTIDOS *IN VITRO* E *IN VIVO* COM GA-AuNSs OU GA-AuNRs.

Parâmetro analisado		GA-AuNSs	GA-AuNRs
Caracterização dos nanomateriais	Interação entre GA e nanopartículas	AuNSs dispõem-se ao redor das partículas de GA	Partículas de GA dispõem-se ao redor dos AuNRs
	Estabilidade do material em condições de cultivo celular	Estável	Estável
	CONCLUSÃO	<i>Ambos nanomateriais permanecem estáveis após incubação em ambiente biológico.</i>	

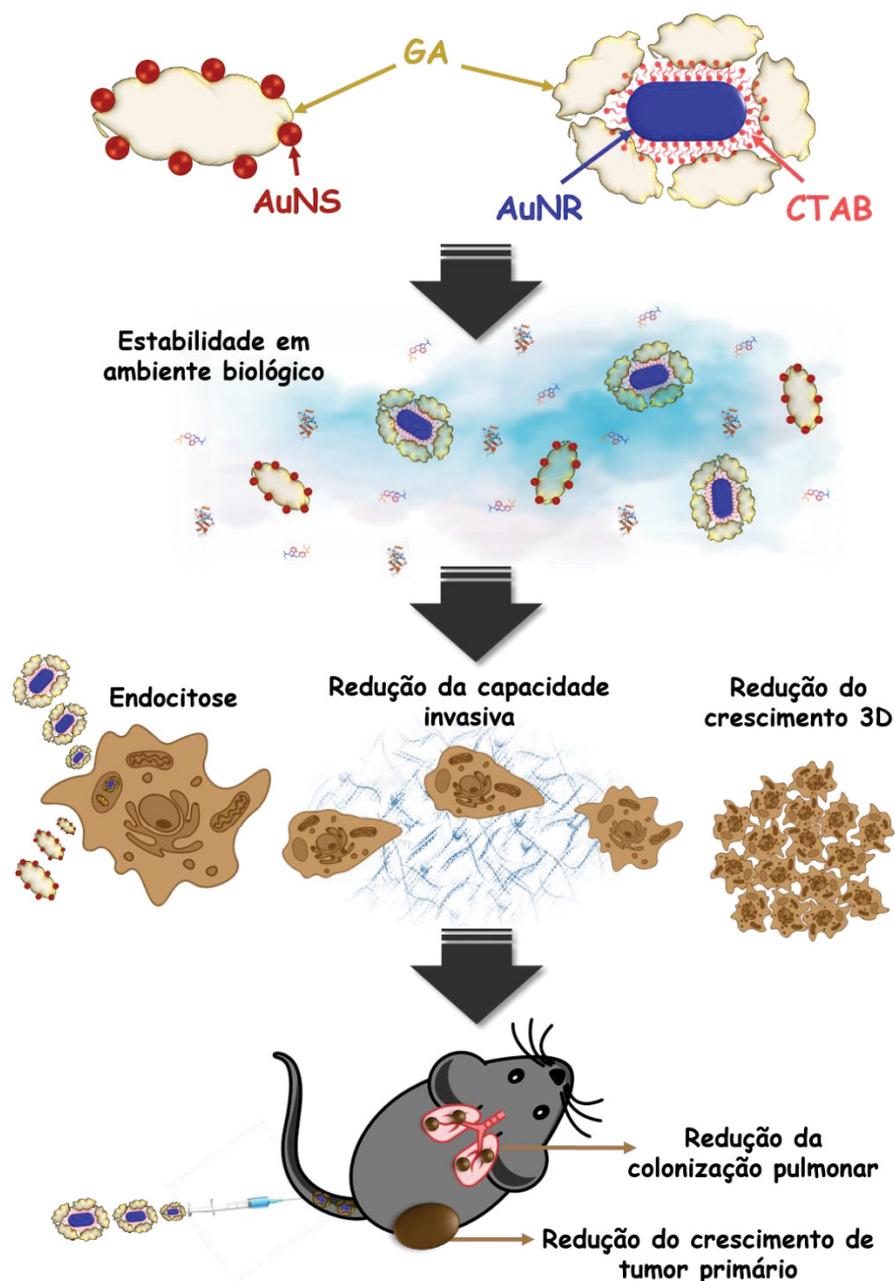
	Concentrações não citotóxicas selecionadas	0,024; 0,244 e 2,44 mg L ⁻¹	0,018; 0,18 e 1,8 mg L ⁻¹
Ensaio <i>in vitro</i>	Internalização das nanopartículas por células tumorais	AuNSs são internalizadas de forma concentração-dependente, sendo encontradas na superfície das células, dentro de compartimentos vesiculares e livres no citosol	AuNRs são internalizados de forma concentração-dependente, sendo encontrados na superfície das células, dentro de compartimentos vesiculares e livres no citosol
	Morfologia de células tumorais	Maior espriamento observado por (BARROS et al., 2016a)	NA, porém afeta o padrão de distribuição de filamentos de actina das células com capacidade invasiva
	Capacidade invasiva de células tumorais	2,44 mg L ⁻¹ reduziu 47,3%	0,18 mg L ⁻¹ reduziu 12,9%
	Capacidade de formação de colônias de células tumorais	Quantidade de colônias: 2,44 mg L ⁻¹ reduziu 15,1% Tamanho das colônias: 0,244 mg L ⁻¹ reduziu 23% e 2,44 mg L ⁻¹ reduziu 25,4%	Quantidade de colônias: NA Tamanho das colônias: 0,018 mg L ⁻¹ reduziu 25% 0,18 mg L ⁻¹ reduziu 12,5% 1,8 mg L ⁻¹ reduziu 25%
	CONCLUSÃO	<i>Sob condições não citotóxicas, ambos nanomateriais são capazes de alterar parâmetros de malignidade de células de melanoma in vitro.</i>	
Ensaio <i>in vivo</i>	Crescimento de tumor primário subcutâneo	NA	2 mg/kg reduziu 45%
	Histopatologia do tumor primário subcutâneo	NA	2 mg/kg reduziu a densidade de vasos sanguíneos e áreas de morte celular
	CONCLUSÃO	<i>Nas condições testadas, as GA-AuNSs não apresentam efeito antitumoral in vivo.</i>	<i>Os GA-AuNRs apresentam efeito antitumoral intrínseco in vivo.</i>
	Colonização da superfície pulmonar	NA	NA
	Histopatologia do pulmão contendo metástase	NA	2 mg/kg reduziu a espessura dos nódulos metastáticos superficiais e intrapulmonares

<i>CONCLUSÃO</i>	<i>Nas condições testadas, GA-AuNSs não apresentam efeito antimetastático in vivo.</i>	<i>Os GA-AuNRs apresentam potencial efeito antimetastático in vivo.</i>
Biodistribuição de Au	Fígado > baço > rim	Fígado > baço > pulmão
Hemograma	NA	NA
Perfil bioquímico do sangue	NA	NA
<i>CONCLUSÃO</i>	<i>Ambos os nanomateriais não apresentam toxicidade após administração intravenosa diária in vivo.</i>	

FONTE: A autora (2020).

LEGENDA: NA = parâmetro não alterado.

FIGURA 20 – RESUMO ILUSTRADO DOS RESULTADOS OBTIDOS *IN VITRO* E *IN VIVO* COM GA-AuNSs OU GA-AuNRs EM MODELOS DE MELANOMA MURINO.



FONTE: A autora (2020).

LEGENDA: Ilustrações sem compromisso com escalas de tamanho. GA = goma arábica; AuNS = nanopartícula de ouro; AuNR = nanobastão de ouro; CTAB = brometo de cetiltrimetilamônio.

No presente trabalho, foram observados dois resultados principais: 1) as nanopartículas de ouro apresentam efeito antitumoral/antimetastático intrínseco e 2) esse efeito não vem acompanhado de toxicidade. Quanto ao efeito terapêutico, as GA-AuNSs mostraram-se promissoras *in vitro*. Porém, tal potencial não foi

confirmado experimentalmente *in vivo*, nas doses testadas. Já o potencial antitumoral/antimetastático dos GA-AuNRs foi corroborado em ambas as abordagens. Os resultados obtidos quanto aos fatores responsáveis pela citotoxicidade das nanopartículas de ouro funcionalizadas com GA são preliminares, uma vez que as diferenças estruturais (tamanho, formato, massa e superfície) entre os dois nanomateriais configuram uma limitação para a obtenção de tal resposta. Dessa forma, estudos posteriores utilizando abordagens sistemáticas e aprofundadas quanto aos fatores estruturais (incluindo ainda outros formatos de nanopartículas de ouro) poderiam desvendar quais os fatores determinantes para a indução de citotoxicidade, os limites de tal efeito e também seus mecanismos de ação.

Parâmetros celulares e sistêmicos podem estar envolvidos no mecanismo de ação antitumoral de GA-AuNRs. Publicações recentes mostraram que a combinação de AuNRs e luz infravermelha próxima pode perturbar o citoesqueleto de actina, proteínas de adesão celular e suas vias de sinalização intracelular, o que prejudica a capacidade migratória celular. (ALI et al., 2017; WU et al., 2018). Esse mecanismo também inibe a proliferação, uma vez que as células perdem a capacidade de completar a última fase da divisão celular. (SONG et al., 2018). Não observamos alterações evidentes na morfologia das células (por MEV) após a exposição aos GA-AuNRs, porém parece ocorrer uma reorganização no citoesqueleto de actina nas células desafiadas a invadir na presença de GA-AuNRs. Em conjunto, esses dados sugerem que a interferência no citoesqueleto de actina pode não ser o principal mecanismo de ação de GA-AuNRs, mas pode estar envolvida no processo. Alternativamente, as nanopartículas de ouro são facilmente reconhecidas pelo sistema imunológico como “estranhas”, induzindo um estado pró-inflamatório que pode melhorar as respostas corporais antitumorais. (LIU et al., 2017). Efeito pró-inflamatório semelhante é alcançado quando antígenos de células tumorais mortas por terapia fototérmica são reconhecidos por células do sistema imunológico. (WANG et al., 2018b; ZHOU; NORDQUIST; CHEN, 2016). Ou ainda, o carregamento dos GA-AuNRs até o baço pelo sistema fagocítico mononuclear pode ter permitido a modulação da resposta imunológica por parte da GA – que pode atuar diretamente na ativação de células do sistema imunológico quanto na produção de fatores solúveis envolvidos no processo (XUAN et al., 2010) - nesse

importante órgão linfoide. Dessa forma, uma resposta imunológica sistêmica também pode estar envolvida no efeito antitumoral dos GA-AuNRs, o que poderá ser confirmado em estudos posteriores.

O efeito antitumoral intrínseco dos GA-AuNRs mostrado aqui amplia e fortalece sua aplicação clínica. A vasta literatura sobre AuNRs os aborda basicamente como agentes responsivos à luz infravermelha próxima, no contexto da terapia fototérmica (XU et al., 2020) ou sistemas de entrega de drogas (SHAH et al., 2020). Diferentemente, os resultados obtidos aqui mostram que os GA-AuNRs podem atuar de forma independente, apresentando ação antitumoral intrínseca. Tal descoberta significa que os GA-AuNRs apresentam potencial para utilização em terapias multimodais, como em combinação com a fotodinâmica, quimioterapias e/ou terapia genética (RILEY; DAY, 2017), como ferramentas ativas no combate ao câncer e não apenas acessórios. Portanto, estudos mais detalhados são necessários para a investigação do mecanismo intrínseco da ação antitumoral de GA-AuNRs. Ainda será também interessante investigar se a conjugação dos GA-AuNRs a moléculas direcionadoras (como anticorpos ou ligantes para receptores de células tumorais) poderia alterar sua biodistribuição e consequentemente potencializar seu efeito antitumoral.

Em resumo, o presente trabalho mostra uma nova propriedade das nanopartículas de ouro, revelando seu potencial antitumoral intrínseco independente de citotoxicidade através de resultados muito promissores obtidos *in vitro* e *in vivo* com modelo de melanoma murino. Estudos posteriores utilizando outros modelos tumorais (como outras linhagens de células animais ou humanas e modelos 3D *in vitro*, bem como outros modelos *in vivo*) se fazem necessários para que, no futuro, as descobertas aqui descritas possam ser traduzidas em aplicações clínicas das nanopartículas de ouro para o tratamento de câncer.

6 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos nesse trabalho permitem concluir que:

- ✓ As AuNSs apresentam distribuição periférica ao redor das moléculas de GA. Já os AuNRs apresentam várias partículas de GA aderidas à sua superfície;
- ✓ GA-AuNSs e GA-AuNRs permanecem estáveis após incubação em condições de cultivo celular;
- ✓ GA-AuNSs e GA-AuNRs apresentam ampla faixa semelhante de concentrações não citotóxicas ($\leq 2,44$ e $\leq 1,8$ mg L⁻¹, respectivamente);
- ✓ GA-AuNSs e GA-AuNRs são internalizados e encontrados em compartimentos intracelulares vesiculares em células de melanoma;
- ✓ GA-AuNSs e GA-AuNRs são capazes de reduzir características de malignidade de células de melanoma (capacidades invasiva e de formação de colônias) *in vitro* em condições não citotóxicas;
- ✓ GA-AuNSs não apresentam efeito antitumoral ou antimetastático para melanoma nas condições testadas (tratamento intravenoso diário por 10 dias consecutivos com 0,03 – 3 mg/kg);
- ✓ GA-AuNRs (2 mg/kg) reduzem o crescimento de tumor de melanoma e alteram a estrutura tecidual do tumor, levando à melhora do prognóstico;
- ✓ GA-AuNRs (2 mg/kg) reduzem a colonização intrapulmonar gerada por células de melanoma;
- ✓ GA-AuNSs e GA-AuNRs não apresentam indícios de toxicidade após tratamento contínuo *in vivo* em animais portadores de melanoma.

CAPÍTULO 2

7 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenvolver um método de síntese de nanocápsulas de sílica com núcleo hidrofílico (SiNCs) sob condições amenas de pH e sem adição de surfactantes hidrofílicos;
- Compreender o mecanismo de síntese das SiNCs e seus requisitos.

8 REVISÃO DE LITERATURA

8.1 ENCAPSULAMENTO DE PROTEÍNAS

Proteínas/enzimas encontram aplicações nos mais diversos campos. (DEMAIN; VAISHNAV, 2011; GODFREY; REICHEL, 1996; MALUCELLI et al., 2014). As proteínas produzidas por organismos vivos são geralmente extraídas de fontes sustentáveis e baratas e podem apresentar muitas propriedades vantajosas em comparação às moléculas sintéticas. Por exemplo, o espectro de ação antimicrobiana desse tipo de molécula as destaca no contexto das indústrias de alimentos e medicamentos. (BENKERROUM, 2010). O uso de proteínas para fins médicos mostra muitas vantagens em comparação aos medicamentos convencionais: maior biocompatibilidade e biodegradabilidade; função altamente específica e inércia contra o sistema imunológico. Diferentes classes de proteínas recombinantes (anticorpos, vacinas, hormônios, enzimas etc.) compreendem a maioria dos medicamentos biotecnológicos aprovados pelo FDA. (LEADER; BACA; GOLAN, 2008).

Entretanto, proteínas/enzimas não podem ser diretamente expostas a ambientes biológicos (como o corpo humano) porque apresentam baixa penetração através de tecidos biológicos e membranas celulares (devido ao seu tamanho macromolecular). (BLÜM; NICHTL; SCHEIBEL, 2014). Além disso, a maioria das proteínas é frágil por natureza (BLACK et al., 2014; FUJITA et al., 2012), pois qualquer alteração conformacional pode ser capaz de alterar seu funcionamento ou induzir perda de atividade (COLLETIER et al., 2002). A proteção efetiva e a entrega eficiente das proteínas ao alvo de interesse são os maiores desafios. Portanto, uma estratégia promissora é o encapsulamento das proteínas em *nanocontainers*, os quais têm a função de proteger as biomoléculas de agentes agressores externos – como proteases, por exemplo – e entrega-las intactas ao seu local de ação (CAO et al., 2016; NOORBATCHA; JASWIR; AHMAD, 2018).

Nesse sentido, a nanotecnologia surgiu com importantes estratégias para melhorar a estabilidade de proteínas/enzimas e protegê-las do ambiente externo (BETANCOR; LUCKARIFT, 2008; GUNKEL-GRABOLE et al., 2015; NOORBATCHA; JASWIR; AHMAD, 2018), além de aumentar a afinidade das enzimas por seus substratos, melhorando seu desempenho catalítico e capacidade de reutilização

(CAO et al., 2016). Além disso, a funcionalização da superfície dos nanocarreadores pode ser usada para direcionar ou imobilizar proteínas no local de ação, aumentando também sua disponibilidade. (BATISTA et al., 2018). Dessa forma, sistemas interessantes foram desenvolvidos, como dendrímeros, vesículas, nanopartículas sólidas, lipossomos (MUHEEM et al., 2016), nanopartículas feitas a partir de polímeros, nanocristais, nanogéis (CAO et al., 2016), nanopartículas magnéticas (VAGHARI et al., 2016), entre outros. Entretanto, esses nanossistemas apresentam desafios que prejudicam a aplicação de muitas proteínas em escala industrial, especialmente para o uso de enzimas para biocatálise (BETANCOR; LUCKARIFT, 2008): cavidade interna com espaço bastante limitado, permeabilidade das nanopartículas a substratos e produtos enzimáticos, condição de síntese (pH, composição da solução, uso de solventes orgânicos) incompatíveis com biomoléculas estruturalmente sensíveis (BETANCOR; LUCKARIFT, 2008; GUNKEL-GRABOLE et al., 2015), carregamento e liberação ineficientes devido ao alto peso molecular e à estrutura frágil das proteínas (TANG; LI; CHEN, 2012). Portanto, é necessário desenvolver nanocarreadores que possam carregar efetivamente proteínas/enzimas usando reações bioortogonais (a partir de reações químicas que não interfiram com a estrutura e função das moléculas encapsuladas), permitindo que tais moléculas permaneçam intactas e funcionais após o encapsulamento.

8.2 NANOMATERIAIS DE SÍLICA

Os nanomateriais de sílica geralmente são produzidos através do processo denominado sol-gel, o qual ocorre em duas etapas principais. Primeiramente, precursores de sílica monoméricos são hidrolisados em contato com ambientes aquosos, levando à formação de grupamentos hidroxilas reativos. Esses grupamentos, por sua vez, reagem entre si em reações de condensação que levam à ligação entre os átomos de silício através de pontes de oxigênio. Em seguida, as reações de policondensação continuam ao redor dos centros de nucleação pré-formados, levando ao aumento do grau de reticulação entre as partículas, culminando na formação de uma rede de sílica viscosa e porosa chamada de gel. (DIXIT et al., 2016; DUNN et al., 1998). O termo gel se deve ao processo denominado gelificação, onde as partículas coloidais e espécies de sílica condensada se conectam para se tornar uma rede 3D, a viscosidade aumenta,

resultando em um objeto sólido (gel) no formato do molde. A gelificação pode ser catalisada por ácido ou base, e sua velocidade depende da natureza do íon. Em solução, a hidrólise e a condensação ocorrem simultaneamente e os processos são dependentes de temperatura, natureza e concentração do eletrólito (ácido ou base), natureza do solvente e tipo de precursor do alcóxido. (HENCH; WEST, 1990). Além disso, é possível fazer nanomateriais de sílica mesoporosa organicamente funcionalizados pelo método de cocondensação. Esse método consiste de uma funcionalização diretamente através do processo de síntese, no qual organosilanos (precursores contendo pelo menos um grupamento orgânico ligado ao átomo de silício) são introduzidos na síntese juntamente com o precursor comum. (RAHMAN; JAFARZADEH; SIPAUT, 2009; TREWYN et al., 2007).

Os géis de sílica apresentam propriedades bastante interessantes: são materiais excepcionalmente porosos, mostrando áreas de superfície específicas (área superficial por unidade de massa do material) altas, alta transmissão óptica, baixas densidades, baixas condutividades térmicas (AL-OWEINI; EL-RASSY, 2009), são quimicamente inertes – porém, os precursores são passíveis de conjugação química a diversos ligantes -, mecanicamente resistentes, hidrofílicos, resistentes a ataques microbianos e baratos para sintetizar (BHATIA et al., 2000). Já os géis que contêm grupos orgânicos são mais elásticos. (BURKETT; SIMS; MANN, 1996). Nesse caso, devido à presença de grupos orgânicos não hidrolisáveis os géis se tornam hidrofóbicos. Quanto maior a densidade de grupos orgânicos incorporados, maior será a hidrofobicidade. (RAO; KALESH, 2003).

8.2.1 Nanomateriais de sílica para encapsulamento de proteínas

Nanopartículas de sílica mesoporosas têm sido bastante estudadas para aplicações de *drug delivery*. (LI; ZHANG; FENG, 2019; TANG; LI; CHEN, 2012; VALLET-REGÍ et al., 2017; ZHOU et al., 2018). Sua boa biocompatibilidade, porosidade grande e ajustável, bem como a versátil química da sílica, as torna candidatas muito promissoras para a entrega de proteínas. (LIU; XU, 2019; MODY et al., 2013; POPAT et al., 2011; SCHMIDT et al., 2017; SHI et al., 2019; TANG; LI; CHEN, 2012; YU et al., 2017). Trabalhos anteriores carregaram proteínas nesse tipo de nanopartícula através do aprisionamento das proteínas no interior da rede porosa após a síntese (MODY et al., 2013; POPAT et al., 2011). Entretanto, devido ao

tamanho relativamente grande das moléculas proteicas (~3-50 nm de diâmetro para proteínas globulares e alongadas comuns) (ERICKSON, 2009) quando comparadas ao tamanho dos mesoporos (2-50 nm de diâmetro) (MCCUSKER; LIEBAU; ENGELHARDT, 2003), a eficiência do carregamento de proteínas é geralmente baixa (TANG; LI; CHEN, 2012). Além disso, nesse tipo de nanopartícula as proteínas ficam expostas ao ambiente externo, o que permite a perda de proteínas por dessorção, assim como sua degradação por agentes agressores – como proteases – é inevitável. Para suprimir o vazamento, as proteínas podem ser covalentemente ligadas às nanopartículas, o que, no entanto, requer a modificação química das proteínas. (VRANISH et al., 2018). Por esses motivos, a utilização de nanopartículas de sílica mesoporosas para o encapsulamento de proteínas apresenta muitos desafios.

Nesse sentido, nanocápsulas com estrutura tipo núcleo-parede (onde núcleo = conteúdo interno, parede = rede polimérica de sílica mesoporosa) apresentam vantagens únicas para o encapsulamento de moléculas. Apresentam baixa densidade; a cavidade interna espaçosa permite grande capacidade de carga; a parede previne o vazamento de moléculas, bem como as protege dos perigos externos, sendo que a rede de sílica mesoporosa oferece permeabilidade à difusão de substratos e produtos de reação, além de permitir funcionalizações subsequentes da superfície. (HOOD et al., 2017; RAMALINGAM et al., 2019; WIBOWO et al., 2016; YANG et al., 2017a; ZHANG et al., 2015). Entretanto, para encapsular biomoléculas como proteínas/enzimas é preciso que o ambiente interno da cápsula seja hidrofílico. Nanocápsulas de sílica (SiNCs) com núcleo hidrofílico foram produzidas anteriormente usando métodos baseados em moldes duplos, onde uma estrutura sólida ou mole molda a cavidade interior vazia, enquanto que uma estrutura mole ou líquida direciona a formação da parede mesoporosa. (TANG; LI; CHEN, 2012). Essa estratégia requer vários passos de preparação. Em geral, as partículas (muitas vezes sólidas) que servem de molde interno, bem como surfactantes precisam ser removidos por calcinação térmica e/ou extração por solventes orgânicos. Ambas possibilidades são deletérias para muitas moléculas e por esse motivo muitas moléculas pequenas são geralmente carregadas nas SiNCs vazias após a síntese. No entanto, devido ao grande tamanho de proteínas (~ 3-50 nm de diâmetro para proteínas globulares e alongadas comuns) (ERICKSON, 2009) em comparação com o tamanho dos mesoporos (2-50 nm de diâmetro) da parede (MCCUSKER; LIEBAU;

ENGELHARDT, 2003), a eficiência de carregamento das proteínas é geralmente baixa.

Nesse sentido, o método de miniemulsão inversa (água em óleo) apresenta diversas vantagens. Uma miniemulsão consiste em um sistema de equilíbrio termodinâmico, onde o tamanho das gotas é tipicamente uniforme. Em princípio, pode-se controlar sistematicamente o tamanho alterando a curvatura interfacial através da composição de surfactante/co-surfactante ou condições da solução. (RAO; KALESH, 2003). Além disso, as gotas de solução aquosa com tamanho em escala nanométrica atuam como “automoldes” e nanorreatores individuais. Dessa maneira, as proteínas podem ser diretamente dissolvidas ou dispersas no núcleo hidrofílico antes da formação da parede da nanocápsula (ANTONIETTI, 2002). O grupo de pesquisa liderado por Mou desenvolveu uma estratégia de síntese baseada na técnica de miniemulsão inversa onde é possível produzir estruturas com interior “vazio” a partir de nanopartículas sólidas de sílica, lavando-as prolongadamente com etanol e água quente após a síntese catalisada por amônia. (CHANG et al., 2014; CHANG; CHEN; MOU, 2014). Como o processo de remoção do conteúdo interno da nanopartícula para gerar uma estrutura vazia pode ser prejudicial para muitas moléculas, elas geralmente são pós-carregadas nas SiNCs vazias pré-formadas. Nesse caso, enfrenta-se o mesmo problema do grande tamanho das proteínas em comparação com o tamanho dos mesoporos. Outros grupos também mostraram que é possível produzir SiNCs com núcleo hidrofílico usando emulsões inversas sob condições extremamente ácidas ou básicas (CAO et al., 2012; CHEN et al., 2014; HOOD et al., 2015; SCHILLER et al., 2009). Entretanto, esses métodos disponíveis requerem condições extremas de pH e/ou o uso de surfactantes como moldes (TANG; LI; CHEN, 2012), ou agentes precipitantes (FUJIWARA et al., 2004) que catalisem e confinem a condensação da rede de sílica apenas à interface água/óleo. Ambos fatores limitam sua aplicação para o encapsulamento de biomoléculas sensíveis como proteínas e enzimas. Dessa forma, a síntese de SiNCs que possam ser pré-carregadas com proteínas é ainda uma tarefa intrigante e desafiadora.

SiNCs podem ainda ser projetadas para serem multifuncionais, através da incorporação de agentes de contraste de imagem, nanopartículas magnéticas, sondas fluorescentes, drogas, ou múltiplos agentes, tanto dentro da cavidade quanto na parede de sílica e/ou voltados para a superfície externa. Tal flexibilidade funcional

lhes confere potencial para diversas aplicações em nanomedicina: bioimagem, entrega controlada de drogas e de ferramentas de manipulação genética, terapia direcionada, ferramentas de cirurgia não invasiva, dentre outras. (CHEN et al., 2011a, 2011b; SHI; CHEN; CAI, 2013; TAN et al., 2011; XUAN et al., 2015; ZHANG et al., 2015). Dessa forma, faz-se necessário o aprimoramento dos métodos de síntese de SiNCs para que não só proteínas, mas também outras biomoléculas e moléculas hidrofílicas possam ser encapsuladas de forma eficiente.

9 MATERIAIS E MÉTODOS

Os experimentos que compõem esse Capítulo foram realizados durante o período de Doutorado Sanduíche no Exterior (pelo programa CAPES/PDSE, processo número 88881.188473/2018-01), realizado entre outubro de 2018 e março de 2019, no *Max Planck Institute for Polymer Research* (MPIP), em Mainz (Alemanha), sob orientação da Prof^a. Dr^a Katharina Landfester e do Dr. Shuai Jiang. O trabalho desenvolvido é de propriedade intelectual do MPIP e ainda não foi publicado. Portanto, a metodologia – assim como os principais resultados obtidos – serão descritos de forma resumida nos tópicos a seguir.

9.1 MATERIAIS

Ciclohexano (≥ 99 , VWR Chemicals), polricinoleato de poliglicerol (GRINDSTED®PGPR 90 KOSHER, DANISCO), cloreto de sódio (NaCl, ≥ 99 , Sigma-Aldrich), solução de hidróxido de amônia (28% em H₂O, Sigma-Aldrich), ortossilicato de tetrametilo (TMOS, 99%, Sigma-Aldrich), (3-aminopropil) tretoxissilano (APTES, 99%, Sigma-Aldrich), solução de cloreto de cetiltrimetilamônio (CTAC, 25% em H₂O, Sigma-Aldrich). Água ultrapura foi usada em todos os experimentos.

9.2 SÍNTESE DAS NANOCÁPSULAS DE SÍLICA COM NÚCLEO HIDROFÍLICO

As SiNCs foram sintetizadas utilizando adaptação da técnica de miniemulsão inversa (água em óleo). (LANDFESTER; WILLERT; ANTONIETTI, 2000; OH et al., 2006; WORMUTH, 2001). Dependendo da condição de síntese, a fase aquosa era composta por água ultrapura, PBS ou soluções preparadas usando concentrações crescentes de hidróxido de amônia para a obtenção de diferentes pHs (neutro-extremamente básico). Cloreto de sódio foi adicionado como agente osmótico em todas as soluções. A fase oleosa foi composta por solução de PGPR em ciclohexano. Quando pertinente, solução de CTAC foi adicionada à fase aquosa.

Para a preparação da miniemulsão, as fases oleosa e aquosa foram misturadas na proporção de aproximadamente 30:1 sob agitação magnética. Após 5 minutos agitando para pré-emulsificação, as emulsões foram submetidas a ultrassonicação em banho de gelo por 2 minutos. Em seguida, a quantidade

correspondente de precursores de sílica foi adicionada gota a gota sobre a emulsão sob agitação magnética. A agitação foi mantida *overnight* até a completa reação dos precursores. Para a remoção do excesso de surfactante, as amostras foram lavadas com ciclohexano por centrifugação e ressuspendidas para o volume inicial.

9.3 CARACTERIZAÇÃO DOS NANOMATERIAIS OBTIDOS

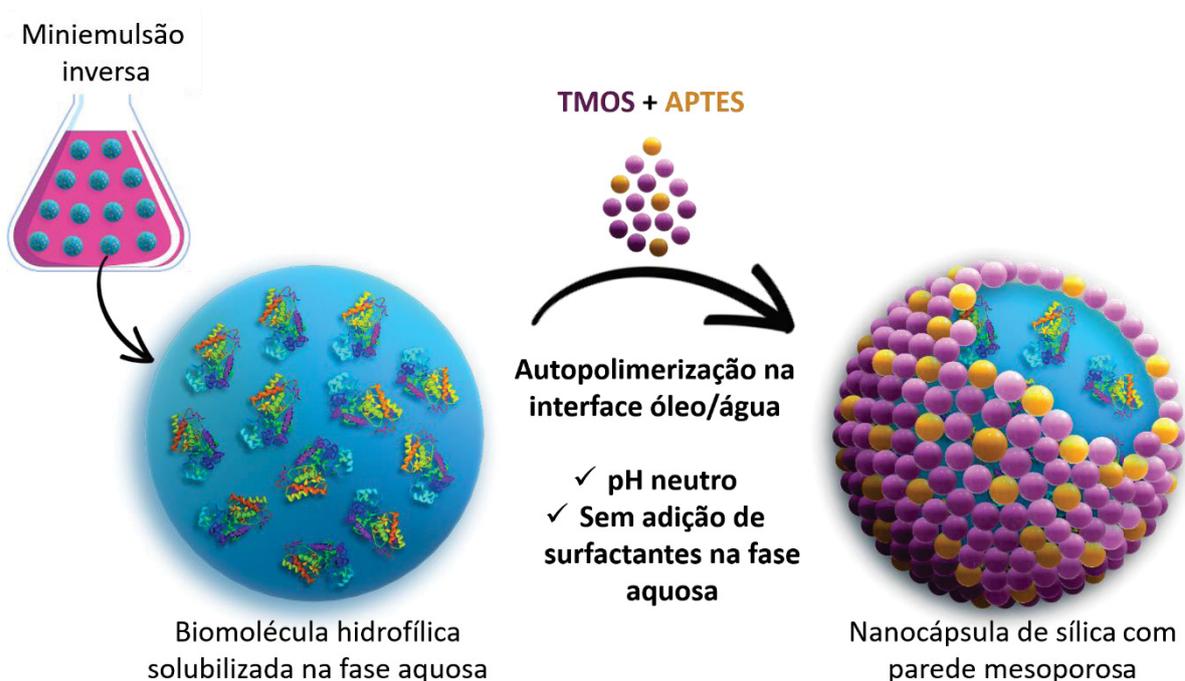
A morfologia dos nanomateriais obtidos foi caracterizada por MEV operando a 0,35 kV ou MET operando a 120 kV. As amostras para MEV ou MET foram preparadas depositando as suspensões dos nanomateriais sobre suportes de silício ou grades de cobre cobertas por filme de carbono, respectivamente, e deixando secar naturalmente.

10 RESULTADOS E DISCUSSÃO

10.1 SÍNTESE DAS NANOCÁPSULAS DE SÍLICA COM NÚCLEO HIDROFÍLICO

As SiNCs foram sintetizadas utilizando como molde gotas de água em óleo, processo denominado de miniemulsão inversa. (LANDFESTER; WILLERT; ANTONIETTI, 2000; OH et al., 2006; WORMUTH, 2001). As gotas em escala nanométrica contendo solução aquosa foram estabilizadas por surfactante não-iônico lipossolúvel em fase oleosa composta por solvente orgânico. Os precursores de sílica (uma mistura de TMOS e APTES) foram então adicionados à miniemulsão, iniciando o processo de polimerização a partir do contato com a fase aquosa. Desta forma, mantendo o núcleo hidrofílico, moléculas com as mesmas características podem ser diretamente encapsuladas em uma única etapa durante a síntese das SiNCs (Figura 21).

FIGURA 21 - ILUSTRAÇÃO ESQUEMÁTICA DO PROCESSO DE COPOLIMERIZAÇÃO INTERFACIAL EM MINIEMULSÃO INVERSA PARA A SÍNTESE DE SiNCs COM POTENCIAL PARA ABRIGAR BIOMOLÉCULAS HIDROFÍLICAS.

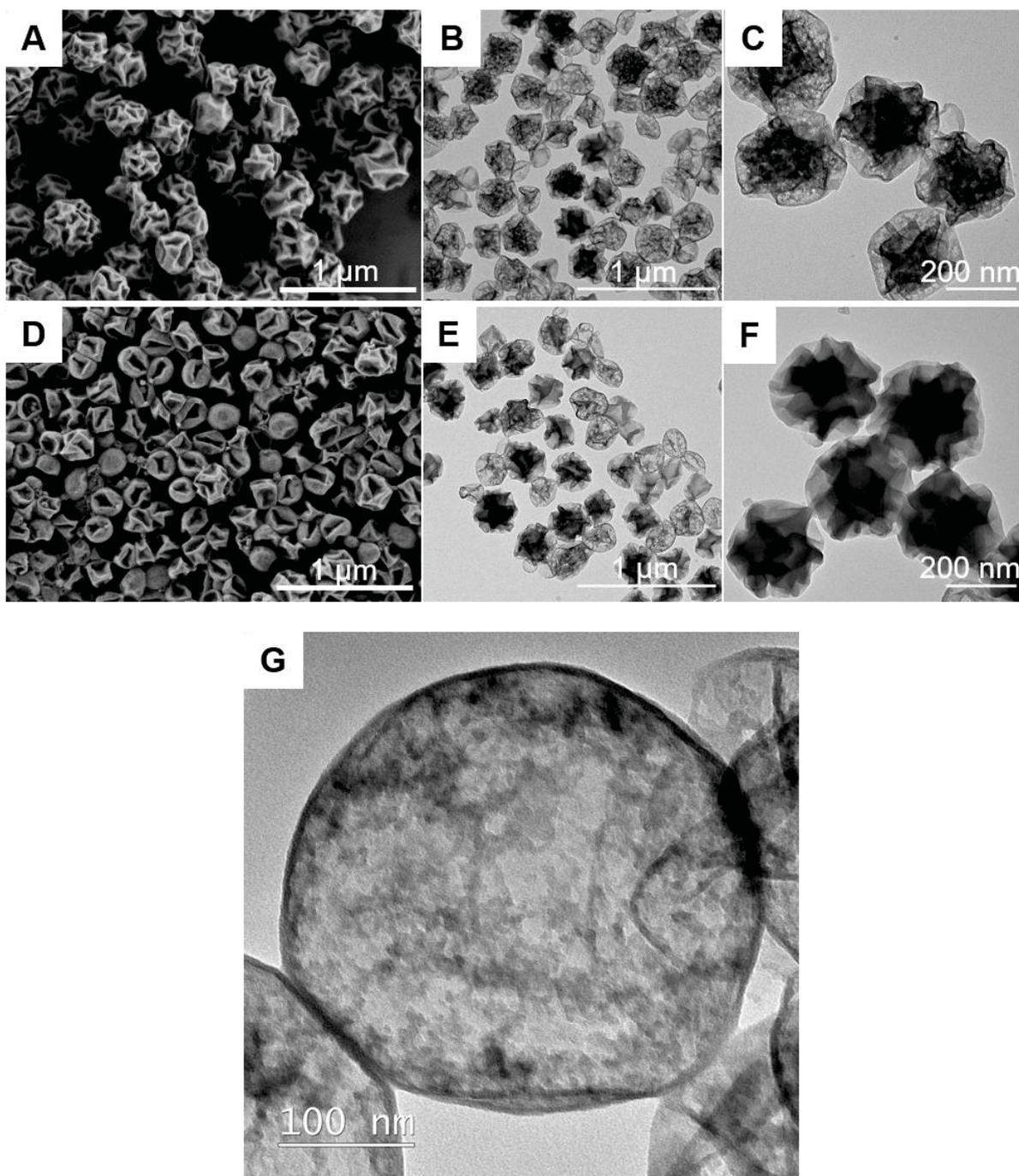


FONTE: A autora (2020).

O principal desafio para a formação de SiNCs é o confinamento eficaz da polimerização de sílica na interface água/óleo da miniemulsão. A hidrólise de alcoxissilanos gera grupamentos silanol, que aumentam a hidrofiliabilidade dos precursores. Sem um confinamento interfacial suficiente, os precursores hidrolisados migram da interface para a fase aquosa, onde a condensação dos silanóis resulta em nanopartículas sólidas. Dessa forma, o procedimento desenvolvido no presente trabalho é baseado na cinética de hidrólise e nas interações controladas por força eletrostática entre o alcoxissilano TMOS e o organossilano contendo um grupamento amina APTES. Usando essa abordagem, SiNCs foram preparadas usando apenas água ultrapura (ajustada para pH 7,0) ou PBS (pH 7,4) como fase aquosa e uma combinação de TMOS e APTES como fonte de sílica. Na Figura 22 é possível observar a morfologia característica de nanocápsula dos materiais obtidos, se assemelhando a “bolas murchas” devido à evaporação do conteúdo interno das SiNCs durante a preparação das amostras para MET. Além disso, em maior detalhe é possível perceber que a parede de uma SiNC típica é composta por uma rede de sílica mesoporosa (Figura 22G).

Os resultados mostram, portanto, que é possível produzir SiNCs com núcleo hidrofílico utilizando uma mistura de TMOS e APTES, sob condições amenas de pH e sem a necessidade de adição de catalizadores químicos ou surfactantes moldes. Entretanto, é necessário compreender o mecanismo físico-químico do processo, de forma que seja possível posteriormente manipular as características das SiNCs de forma proposital e controlada.

FIGURA 22 – SiNCs SINTETIZADAS UTILIZANDO CONDIÇÕES AMENAS DE pH NA FASE AQUOSA.



FONTE: A autora (2020).

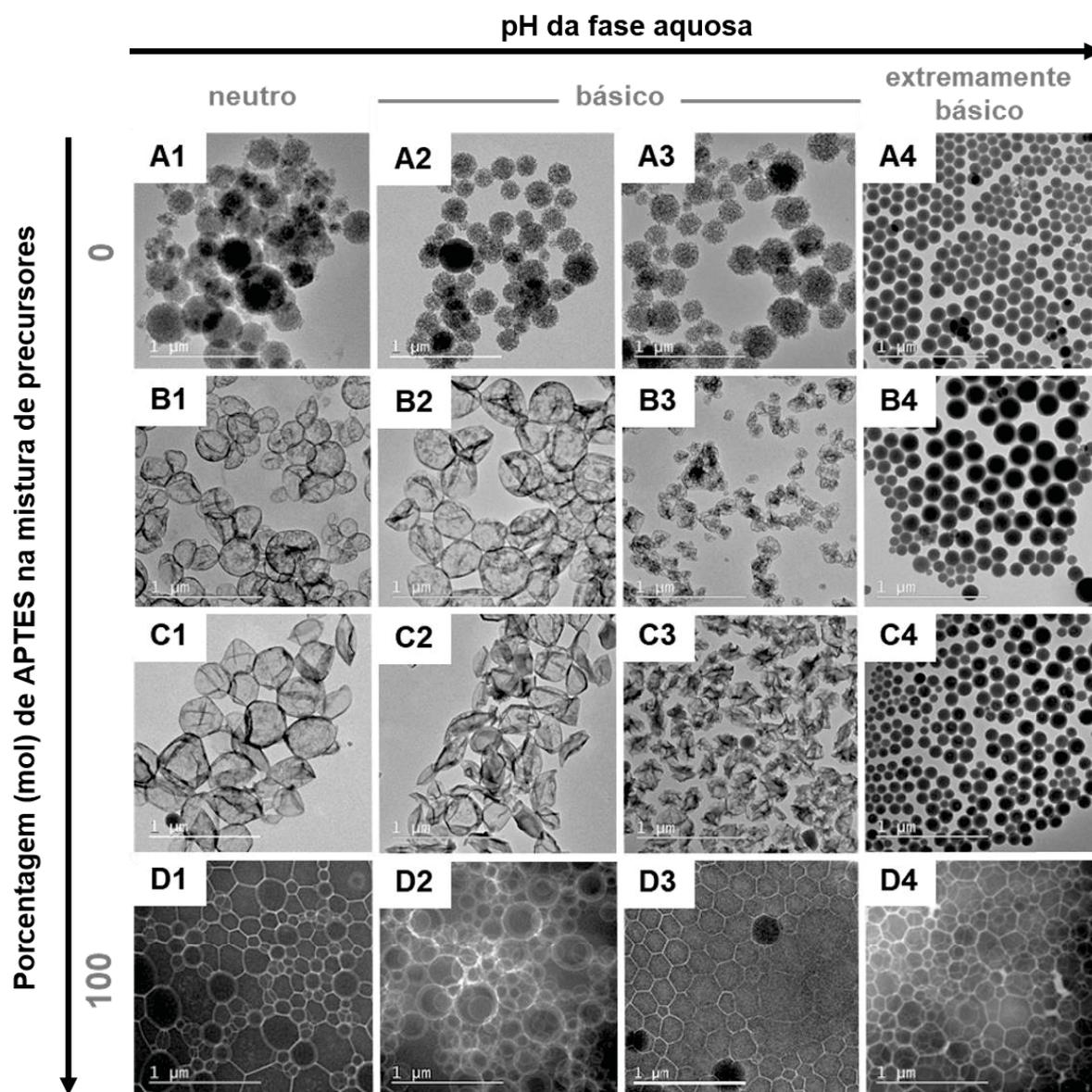
LEGENDA: Imagens de MEV (A e D) e MET (B, C, E e F) de SiNCs sintetizadas utilizando água ultrapura (pH 7,0 – imagens superiores) ou PBS (pH 7,4 – imagens inferiores) como fase aquosa. Uma mistura de TMOS e APTES foi usado como fonte de sílica. G) MET de alta resolução mostrando em detalhe a parede mesoporosa de uma SiNC.

10.2 MECANISMO DE CONFINAMENTO INTERFACIAL DA POLIMERIZAÇÃO DE SÍLICA

Um estudo sistemático foi desenvolvido com o objetivo de compreender o mecanismo de confinamento da polimerização da rede de sílica à interface óleo/água. Para tal, foram investigadas diferentes condições de pH da fase aquosa em combinação com diferentes proporções entre os precursores adicionados. Dessa forma, foi possível observar que não ocorre a formação de SiNCs quando TMOS ou APTES são utilizados isoladamente. TMOS puro leva à formação de nanopartículas mesoporosas (Figura 23, linha A), enquanto APTES puro leva à formação de nanopartículas aparentemente sólidas e flexíveis (Figura 23, linha D), devido à presença de grande quantidade de grupamentos orgânicos derivados da porção não-hidrolisável do precursor. Por outro lado, a mistura dos dois precursores em diferentes proporções leva à formação de SiNCs (Figura 23, linhas B e C 1-3). Portanto, esse resultado indica que as interações entre APTES e TMOS são essenciais para que a polimerização da sílica fique confinada na interface água/óleo.

Dessa forma, a fim de entender o papel crítico da combinação dos precursores no confinamento da polimerização de sílica na interface, foi variada a proporção entre os comonômeros APTES e TMOS e investigado o efeito do valor de pH da fase aquosa na interação entre eles, correlacionando tais fatores com a morfologia das nanoestruturas resultantes (Figura 23).

FIGURA 23 - CORRELAÇÃO ENTRE A RAZÃO MOLAR APTEs:TMOS E A MORFOLOGIA DAS SiNCs RESULTANTES EM DIFERENTES pHs.



FONTE: A autora (2020).

LEGENDA: Imagens de MET representativas das SiNCs obtidas em cada condição experimental.

A partir do estudo morfológico, pode-se constatar 2 padrões:

1. Sem APTES, o uso de TMOS sozinho gera apenas nanopartículas mesoporosas em todas as condições de pH (Figura 23A). Da mesma forma, sem TMOS, o uso de APTES sozinho gera nanopartículas sólidas independentemente do pH (Figura 23D). O pH básico, que acelera as reações de hidrólise e condensação dos precursores de sílica (POPE; MACKENZIE, 1986), não leva à formação de SiNCs nessas condições. Portanto, o pH como

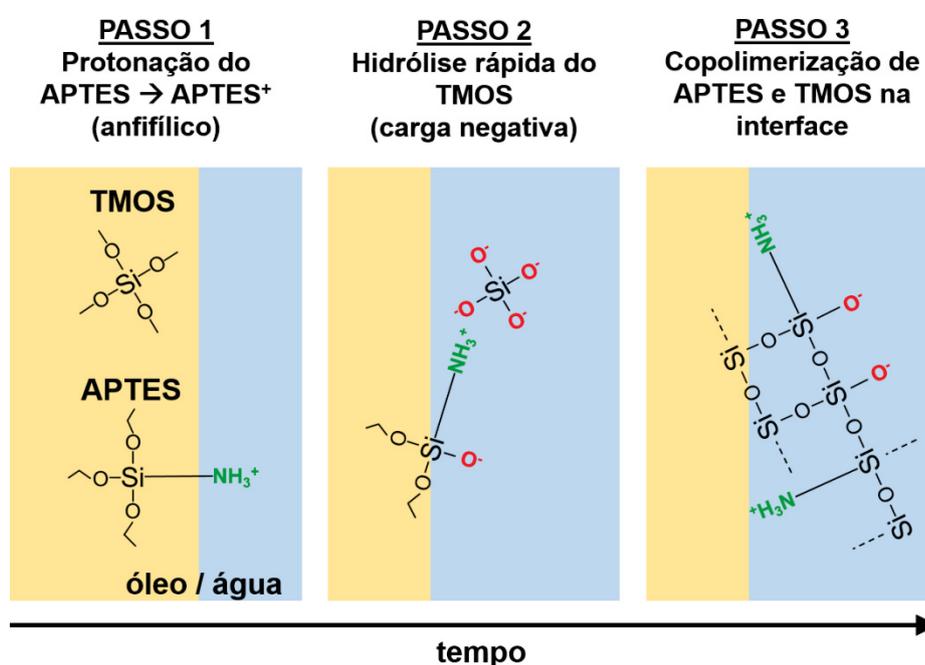
fator isolado não o responsável pela formação de SiNCs, mostrando que a combinação entre APTES e TMOS é um componente necessário para a formação desse tipo de nanoestrutura;

2. Misturas de APTES e TMOS permitem a formação de SiNCs em diferentes pHs (Figura 23 B e C 1-3). Entretanto, o aumento do pH para condições extremamente básicas leva à formação de nanopartículas sólidas (Figura 23 B4 e C4). Portanto, em pH extremamente alto a polimerização confinada à interface é inibida, mostrando que apesar de isoladamente o pH não ser o fator que permite a formação de SiNCs, ele pode sim afetar o comportamento dos precursores nesse processo.

O grupamento amina do APTES possui um pKa em torno de 10-10,8. (BORJIAN et al., 2017; CHOPRA et al., 2007; KIM; KORKMAZ; NAM, 2012; MASHHADIZADEH, 2012). Em pH inferior ao seu pKa, aumenta a probabilidade de o APTES ser carregado positivamente (APTES⁺) devido à protonação do grupo amina, o que também aumenta a hidrofiliabilidade da molécula. Em comparação com o grupamento amina, os três grupos etoxi do APTES são hidrofóbicos. Portanto, APTES⁺ se comporta como uma molécula anfifílica na interface óleo/água (Figura 24A) antes da hidrólise dos grupos etoxi, que ocorre a partir do seu contato com a fase aquosa. Após hidrólise, os grupos etoxi são convertidos em grupos silanol hidrofílicos (Figura 24B). As moléculas hidrolizadas de APTES⁺ tornam-se mais hidrofílicas e tendem a se difundir para o interior das nanogotas de água. (LIN et al., 2015). Nanopartículas sólidas são obtidas quando o APTES é usado sozinho como fonte de sílica, sugerindo que a atividade interfacial do APTES⁺ é válida apenas por um tempo limitado. Ou seja, é preciso que o processo de condensação ocorra na interface antes que as moléculas de APTES⁺ se tornem todas hidrofílicas e difundam para o interior da fase aquosa. Por outro lado, o comonômero TMOS hidrolisa rapidamente após o contato com a água, gerando grupos silanol com pKa entre 4 e 7 (KAROL, 1979), o que significa que o TMOS hidrolisado é carregado negativamente sob as condições experimentais utilizadas (pH neutro-básico). Dessa forma, quando moléculas de APTES⁺ e TMOS hidrolisados se encontram na interface, interações eletrostáticas permitem sua copolimerização de forma rápida (Figura 24C). Tal processo permite que as gotas de solução aquosa sejam rapidamente revestidas pela rede de sílica composta por APTES e TMOS, evitando

a difusão dos monômeros para o interior. Dessa forma, as características de carga positiva, anfifilicidade e catálise do APTES e uma rápida cinética de hidrólise do comonômero TMOS parecem ser os principais fatores para o confinamento interfacial da polimerização de sílica. Enquanto APTES serve como uma “âncora” que difunde mais lentamente para a fase aquosa, TMOS tem a função de completar a reação de polimerização rapidamente.

FIGURA 24 – MECANISMO DE CONFINAMENTO DA POLIMERIZAÇÃO DE SÍLICA NA INTERFACE ÓLEO/ÁGUA.



FONTE: A autora (2020).

Para confirmar a hipótese de que uma interação eletrostática permite a associação entre APTES e TMOS na interface, foi utilizado um surfactante catiônico (cloreto de cetiltrimetilamônio - CTAC) para substituir APTES no protocolo de síntese. O CTAC possui uma cadeia alquil longa e uma carga positiva derivada de um amônio quaternário, portanto um padrão estrutural semelhante ao do APTES. Ao utilizar o CTAC, é possível observar que estruturas semelhantes a SiNCs são formadas de forma dependente da proporção de CTAC adicionada em pH básico (Figura 25). Esse resultado corrobora, portanto, a ideia de que uma molécula relativamente hidrofóbica e com carga positiva é capaz de confinar a polimerização da sílica à interface óleo/água. Embora o CTAC tenha se mostrado eficiente para a

produção de SiNCs, ele interage fortemente com proteínas mesmo em baixas concentrações, levando à desnaturação e agregação das mesmas. (CARVALHO et al., 2014; SANTIAGO et al., 2007). De tal modo, o uso de CTAC seria inviável para o encapsulamento de biomacromoléculas.

FIGURA 25 - CORRELAÇÃO ENTRE A PROPORÇÃO DE CTAC:TMOS E A MORFOLOGIA DAS NANOPARTÍCULAS RESULTANTES.



FONTE: A autora (2020).

LEGENDA: Imagens de MET representativas das SiNCs obtidas em cada condição experimental.

O valor do pH da fase aquosa também influencia o confinamento interfacial da polimerização de sílica. Como mostrado nas Figuras 23 B e C, a partir da utilização de misturas com diferentes proporções entre APTES e TMOS como precursores, SiNCs são formadas na faixa de pH neutro–básico. Entretanto, apenas nanopartículas sólidas são obtidas em pH extremamente básico (Figura 23 B4 e C4). Este efeito de inibição do confinamento interfacial pode ser atribuído a duas causas. A primeira é a dependência do pH das taxas das reações de hidrólise e condensação. Dentro da faixa de pH onde obtêm-se SiNCs, a reação de condensação dos alcoxissilanos é mais rápida que a hidrólise. A partir desse valor, a taxa de condensação começa a diminuir enquanto a taxa de hidrólise aumenta continuamente de forma proporcional ao pH. (SCHUBERT, 2015). Na condição de pH extremamente básico, a taxa de hidrólise supera a taxa de condensação, o que leva à migração rápida de precursores hidrolisados para a fase aquosa devido às suas cargas negativas. Dessa forma, a polimerização não ocorre na interface de forma rápida o suficiente. A segunda razão está associada ao pKa do grupo amina do APTES. A carga positiva do APTES é o fator necessário para o confinamento eletrostático da reação. Em pH extremamente básico, o grupo amina do APTES é

desprotonado (apresentando-se como neutro na forma de $-NH_2$). Portanto, sua interação com o TMOS para manter a polimerização na interface é inibida.

As SiNCs obtidas mostram vantagens únicas para o encapsulamento de biomacromoléculas: a grande cavidade interna apresenta uma alta capacidade de carga; a parede pode evitar o vazamento das macromoléculas e protege-las de danos externos - como proteases, por exemplo -; a parede de sílica mesoporosa permitiria a difusão de substratos e produtos para reações enzimáticas. Portanto, essa abordagem de nanoencapsulamento sob condições amenas é promissora para o carregamento de biomacromoléculas sensíveis para diversas aplicações biológicas, da biocatálise às aplicações em nanomedicina. As SiNCs poderiam ser ferramentas terapêuticas úteis para terapia gênica ou carregamento e entrega de drogas antitumorais, por exemplo. (CHEN et al., 2010; WANG et al., 2019). Estudos posteriores deverão ser realizados para comprovar a eficiência de encapsulamento de biomoléculas, bem como a preservação da sua estrutura molecular e bioatividade após o encapsulamento. Além disso, adaptações do protocolo de síntese desenvolvido serão interessantes para transformar as SiNCs em sistemas de liberação controlada, a partir da incorporação de organosilanos funcionais (responsivos a estímulos, por exemplo).

11 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos nesse trabalho permitem concluir que:

- ✓ É possível produzir SiNCs com núcleo hidrofílico sob condições amenas de pH e sem adição de catalizadores químicos ou surfactantes hidrofílicos, a partir da mistura dos precursores APTES e TMOS;
- ✓ A síntese das SiNCs ocorre através da interação eletrostática entre os precursores hidrolisados na interface óleo/água, onde as características de carga positiva e anfifilicidade do APTES e de rápida condensação do TMOS permitem a formação de uma rede de sílica que reveste as nanogotas contendo a solução aquosa.

REFERÊNCIAS

AARONSON, S. A.; TODARO, G. J. Development of 3T3-like lines from Balb/c mouse embryo cultures: Transformation susceptibility to SV40. **Journal of Cellular Physiology**, v. 72, n. 2, p. 141–148, out. 1968.

ABDEL-WAHHAB, M. A.; MÁRQUEZ, F. Nanomaterials in Biomedicine. **Soft Nanoscience Letters**, v. 05, n. 03, p. 53–54, 2015.

AHMAD, M. Z. et al. Nanometric gold in cancer nanotechnology: current status and future prospect. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 65, n. 5, p. 634–651, maio 2013.

AJNAI, G. et al. Trends of Gold Nanoparticle-based Drug Delivery System in Cancer Therapy. **Journal of Experimental & Clinical Medicine**, v. 6, n. 6, p. 172–178, dez. 2014.

AKIYAMA, Y. et al. The effects of PEG grafting level and injection dose on gold nanorod biodistribution in the tumor-bearing mice. **Journal of Controlled Release**, v. 139, n. 1, p. 81–84, out. 2009.

AL-OWEINI, R.; EL-RASSY, H. Synthesis and characterization by FTIR spectroscopy of silica aerogels prepared using several Si(OR)₄ and R''Si(OR')₃ precursors. **Journal of Molecular Structure**, v. 919, n. 1–3, p. 140–145, fev. 2009.

ALBANESE, A.; CHAN, W. C. W. Effect of Gold Nanoparticle Aggregation on Cell Uptake and Toxicity. **ACS Nano**, v. 5, n. 7, p. 5478–5489, 26 jul. 2011.

ALI, M. R. K. et al. Targeting cancer cell integrins using gold nanorods in photothermal therapy inhibits migration through affecting cytoskeletal proteins. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 114, n. 28, p. E5655–E5663, 11 jul. 2017.

ALKILANY, A. M.; MURPHY, C. J. Toxicity and cellular uptake of gold nanoparticles: what we have learned so far? **Journal of Nanoparticle Research**, v. 12, n. 7, p. 2313–2333, 6 set. 2010.

AMERICAN CANCER SOCIETY. **Melanoma Skin Cancer Stages**. Disponível em: <https://www.cancer.org/cancer/melanoma-skin-cancer/detection-diagnosis-staging/melanoma-skin-cancer-stages.html#written_by>. Acesso em: 30 abr. 2020.

AMERICAN CANCER SOCIETY. **About Basal and Squamous Cell Skin Cancer**. Disponível em: <<https://www.cancer.org/content/dam/CRC/PDF/Public/8818.00.pdf>>. Acesso em: 1 maio. 2020a.

AMERICAN CANCER SOCIETY. **Survival Rates for Melanoma Skin Cancer**. Disponível em: <<https://www.cancer.org/cancer/melanoma-skin-cancer/detection-diagnosis-staging/survival-rates-for-melanoma-skin-cancer-by-stage.html>>. Acesso em: 30 abr. 2020b.

AMINABAD, N. S.; FARSHBAF, M.; AKBARZADEH, A. Recent Advances of Gold Nanoparticles in Biomedical Applications: State of the Art. **Cell Biochemistry and Biophysics**, v. 77, n. 2, p. 123–137, 20 jun. 2019.

AN, K.; HYEON, T. Synthesis and biomedical applications of hollow nanostructures. **Nano Today**, v. 4, n. 4, p. 359–373, ago. 2009.

ANSELMO, A. C.; MITRAGOTRI, S. Nanoparticles in the clinic. **Bioengineering & Translational Medicine**, v. 1, n. 1, p. 10–29, mar. 2016.

ANSELMO, A. C.; MITRAGOTRI, S. Nanoparticles in the clinic: An update. **Bioengineering & Translational Medicine**, v. 4, n. 3, p. 1–16, 5 set. 2019.

ANSORGE-SCHUMACHER, M. B.; THUM, O. Immobilised lipases in the cosmetics industry. **Chemical Society Reviews**, v. 42, n. 15, p. 6475, 2013.

ANTONIETTI, M. Polyreactions in miniemulsions. **Progress in Polymer Science**, v. 27, n. 4, p. 689–757, maio 2002.

ANTOUN, S.; BORGET, I.; LANOY, E. Impact of sarcopenia on the prognosis and treatment toxicities in patients diagnosed with cancer. **Current Opinion in Supportive and Palliative Care**, v. 7, n. 4, p. 383–389, nov. 2013.

ARGANDA-CARRERAS, I. et al. Trainable Weka Segmentation: a machine learning tool for microscopy pixel classification. **Bioinformatics**, v. 33, n. 15, p. 2424–2426, 1 ago. 2017.

ARNIDA et al. Geometry and surface characteristics of gold nanoparticles influence their biodistribution and uptake by macrophages. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 77, n. 3, p. 417–423, abr. 2011.

AUTIER, P.; DORÉ, J.-F. Ultraviolet radiation and cutaneous melanoma: a historical perspective. **Melanoma Research**, v. 30, n. 2, p. 113–125, abr. 2020.

BACHMANN, I. M. et al. Tumor necrosis is associated with increased alphavbeta3 integrin expression and poor prognosis in nodular cutaneous melanomas. **BMC Cancer**, v. 8, n. 1, p. 362, 5 dez. 2008.

BAIKA, L. M. et al. Simultaneous determination of As, Hg, Sb, and Se in mineral fertilizers using ultrasonic extraction and CVG-ICP OES. **Analytical Methods**, v. 8, n. 47, p. 8362–8367, 2016.

BARBOSA, A. J. A. et al. A Simple and Economical Modification of the Masson-Fontana Method for Staining Melanin Granules and Enterochromaffin Cells. **Stain Technology**, v. 59, n. 4, p. 193–196, 12 jan. 1984.

BARROS, H. R. DE et al. Stability of gum arabic-gold nanoparticles in physiological simulated pHs and their selective effect on cell lines. **RSC Advances**, v. 6, n. 12, p. 9411–9420, 2016a.

BARROS, H. R. et al. Surface interactions of gold nanorods and polysaccharides: From clusters to individual nanoparticles. **Carbohydrate Polymers**,

v. 152, p. 479–486, nov. 2016b.

BATAILLE, V. Risk factors for melanoma development. **Expert Review of Dermatology**, v. 4, n. 5, p. 533–539, 10 out. 2009.

BATISTA, P. et al. Recent insights in the use of nanocarriers for the oral delivery of bioactive proteins and peptides. **Peptides**, v. 101, p. 112–123, mar. 2018.

BAUER, J.; GARBE, C. Acquired Melanocytic Nevi as Risk Factor for Melanoma Development. A Comprehensive Review of Epidemiological Data. **Pigment Cell Research**, v. 16, n. 3, p. 297–306, jun. 2003.

BELLAN, D. L. et al. Non-Cytotoxic Sulfated Heterorhamnan from *Gayralia brasiliensis* Green Seaweed Reduces Driver Features of Melanoma Metastatic Progression. **Marine Biotechnology**, jan. 2020.

BENELLI, G. Gold nanoparticles – against parasites and insect vectors. **Acta Tropica**, v. 178, p. 73–80, fev. 2018.

BENKERROUM, N. Antimicrobial peptides generated from milk proteins: a survey and prospects for application in the food industry. A review. **International Journal of Dairy Technology**, v. 63, n. 3, p. 320–338, 14 abr. 2010.

BETANCOR, L.; LUCKARIFT, H. R. Bioinspired enzyme encapsulation for biocatalysis. **Trends in Biotechnology**, v. 26, n. 10, p. 566–572, out. 2008.

BHATIA, R. B. et al. Aqueous Sol–Gel Process for Protein Encapsulation. **Chemistry of Materials**, v. 12, n. 8, p. 2434–2441, ago. 2000.

BISCAIA, S. M. P. et al. Safe therapeutics of murine melanoma model using a novel antineoplastic, the partially methylated mannogalactan from *Pleurotus eryngii*. **Carbohydrate Polymers**, v. 178, p. 95–104, dez. 2017.

BLACK, K. A. et al. Protein Encapsulation via Polypeptide Complex Coacervation. **ACS Macro Letters**, v. 3, n. 10, p. 1088–1091, 21 out. 2014.

BLAGOSKLONNY, M. V. Cell Immortality and Hallmarks of Cancer. **Cell cycle**, v. 2, n. 4, p. 296–299, 2003.

BLÜM, C.; NICHTL, A.; SCHEIBEL, T. Spider Silk Capsules as Protective Reaction Containers for Enzymes. **Advanced Functional Materials**, v. 24, n. 6, p. 763–768, fev. 2014.

BOBO, D. et al. Nanoparticle-Based Medicines: A Review of FDA-Approved Materials and Clinical Trials to Date. **Pharmaceutical Research**, v. 33, n. 10, p. 2373–2387, 14 out. 2016.

BOKEMEYER, C. et al. Evaluation of long-term toxicity after chemotherapy for testicular cancer. **Journal of Clinical Oncology**, v. 14, n. 11, p. 2923–2932, nov. 1996.

BORJIAN, S. et al. **Silicon-on-Insulator Ring Resonators as Micro-Optical**

Devices for Phosphate Sensing. *Imaging and Applied Optics 2017* (3D, AIO, COSI, IS, MATH, pcAOP). **Anais...** Washington, D.C.: OSA, 2017. Disponível em: <<https://www.osapublishing.org/abstract.cfm?URI=3D-2017-JTu5A.26>>

BRAY, F. et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 68, n. 6, p. 394–424, nov. 2018.

BROWN, V. et al. The development of the Chemotherapy Symptom Assessment Scale (C-SAS): a scale for the routine clinical assessment of the symptom experiences of patients receiving cytotoxic chemotherapy. **International Journal of Nursing Studies**, v. 38, n. 5, p. 497–510, out. 2001.

BURKETT, S. L.; SIMS, S. D.; MANN, S. Synthesis of hybrid inorganic–organic mesoporous silica by co-condensation of siloxane and organosiloxane precursors. **Chem. Commun.**, n. 11, p. 1367–1368, 1996.

CAI, R.; CHEN, C. The Crown and the Scepter: Roles of the Protein Corona in Nanomedicine. **Advanced Materials**, v. 31, n. 45, p. 1805740, 27 nov. 2019.

CAISOVA, V. et al. The Significant Reduction or Complete Eradication of Subcutaneous and Metastatic Lesions in a Pheochromocytoma Mouse Model after Immunotherapy Using Mannan-BAM, TLR Ligands, and Anti-CD40. **Cancers**, v. 11, n. 5, p. 654, 11 maio 2019.

CAMERON, M. D. et al. Temporal progression of metastasis in lung: Cell survival, dormancy, and location dependence of metastatic inefficiency. **Cancer Research**, v. 60, n. 9, p. 2541–2546, 2000.

CAO, S. et al. Recent advances in immobilized enzymes on nanocarriers. **Chinese Journal of Catalysis**, v. 37, n. 11, p. 1814–1823, nov. 2016.

CAO, Z. et al. Preparation of Mesoporous Submicrometer Silica Capsules via an Interfacial Sol–Gel Process in Inverse Miniemulsion. **Langmuir**, v. 28, n. 17, p. 7023–7032, 17 maio 2012.

CARABINEIRO, S. Applications of Gold Nanoparticles in Nanomedicine: Recent Advances in Vaccines. **Molecules**, v. 22, n. 5, p. 857, 22 maio 2017.

CARNOVALE, C. et al. Identifying Trends in Gold Nanoparticle Toxicity and Uptake: Size, Shape, Capping Ligand, and Biological Corona. **ACS Omega**, v. 4, n. 1, p. 242–256, 31 jan. 2019.

CARUSO, F.; HYEON, T.; ROTELLO, V. M. Nanomedicine. **Chemical Society Reviews**, v. 41, n. 7, p. 2537, 2012.

CARVALHO, J. W. P. et al. Cetyltrimethylammonium chloride (CTAC) effect on the thermal stability of oxy-HbGp: Dynamic light scattering (DLS) and small angle X-ray scattering (SAXS) studies. **Colloid Surface B**, v. 118, p. 14–24, jun. 2014.

CASTLE, J. C. et al. Exploiting the mutanome for tumor vaccination. **Cancer Research**, v. 72, n. 5, p. 1081–1091, 2012.

CHAN, W. C. W. Nanomedicine 2.0. **Accounts of Chemical Research**, v. 50, n. 3, p. 627–632, 21 mar. 2017.

CHANG, F.-P. et al. Enzyme Encapsulated Hollow Silica Nanospheres for Intracellular Biocatalysis. **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 6, n. 9, p. 6883–6890, 14 maio 2014.

CHANG, F.-P.; CHEN, Y.-P.; MOU, C.-Y. Intracellular Implantation of Enzymes in Hollow Silica Nanospheres for Protein Therapy: Cascade System of Superoxide Dismutase and Catalase. **Small**, v. 10, n. 22, p. 4785–4795, nov. 2014.

CHEN, D. et al. Plasma protein adsorption and biological identity of systemically administered nanoparticles. **Nanomedicine**, v. 12, n. 17, p. 2113–2135, set. 2017.

CHEN, G. et al. Nanochemistry and Nanomedicine for Nanoparticle-based Diagnostics and Therapy. **Chemical Reviews**, v. 116, n. 5, p. 2826–2885, 9 mar. 2016.

CHEN, H. et al. In Vivo Study of Spherical Gold Nanoparticles : Inflammatory Effects and Distribution in Mice. **PLoS ONE**, v. 8, n. 2, p. e58208, 2013.

CHEN, Y.-S. et al. Assessment of the In Vivo Toxicity of Gold Nanoparticles. **Nanoscale Research Letters**, v. 4, p. 858–864, 8 ago. 2009.

CHEN, Y. et al. Core/Shell Structured Hollow Mesoporous Nanocapsules: A Potential Platform for Simultaneous Cell Imaging and Anticancer Drug Delivery. **ACS Nano**, v. 4, n. 10, p. 6001–6013, 26 out. 2010.

CHEN, Y. et al. Reversible Pore-Structure Evolution in Hollow Silica Nanocapsules: Large Pores for siRNA Delivery and Nanoparticle Collecting. **Small**, v. 7, n. 20, p. 2935–2944, 17 out. 2011a.

CHEN, Y. et al. Multifunctional Mesoporous Composite Nanocapsules for Highly Efficient MRI-Guided High-Intensity Focused Ultrasound Cancer Surgery. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 50, n. 52, p. 12505–12509, 23 dez. 2011b.

CHEN, Y.; CHEN, H.; SHI, J. Construction of Homogenous/Heterogeneous Hollow Mesoporous Silica Nanostructures by Silica-Etching Chemistry: Principles, Synthesis, and Applications. **Accounts of Chemical Research**, v. 47, n. 1, p. 125–137, 21 jan. 2014.

CHEN, Z. et al. Preparation of silica capsules via an acid-catalyzed sol–gel process in inverse miniemulsions. **Colloid and Polymer Science**, v. 292, n. 7, p. 1585–1597, 15 jul. 2014.

CHITHRANI, B. D.; GHAZANI, A. A.; CHAN, W. C. W. Determining the Size and Shape Dependence of Gold Nanoparticle Uptake into Mammalian Cells. **Nano Letters**, v. 6, n. 4, p. 662–668, abr. 2006.

CHO, E. C. et al. Understanding the Role of Surface Charges in Cellular

Adsorption versus Internalization by Selectively Removing Gold Nanoparticles on the Cell Surface with a I2/KI Etchant. **Nano Letters**, v. 9, n. 3, p. 1080–1084, 2009.

CHOPRA, N. et al. Functional One-Dimensional Nanomaterials: Applications in Nanoscale Biosensors. **Analytical Letters**, v. 40, n. 11, p. 2067–2096, out. 2007.

COLLETIER, J. P. et al. **Protein encapsulation in liposomes: Efficiency depends on interactions between protein and phospholipid bilayer****BMC Biotechnology**, 2002. Disponível em: <<https://bmcbiotechnol.biomedcentral.com/articles/10.1186/1472-6750-2-9>>

CONDE, J.; DORIA, G.; BAPTISTA, P. Noble Metal Nanoparticles Applications in Cancer. **Journal of Drug Delivery**, v. 2012, 2012.

COOPER, S.; GEORGIU, V. The impact of cytotoxic chemotherapy - perspectives from patients, specialists and nurses. **European Journal of Cancer**, v. 28, n. SUPPL. 1, p. S36–S38, jan. 1992.

CORRÊA, F. DE M. et al. Terapia-alvo versus dacarbazina no tratamento de primeira linha do melanoma avançado não cirúrgico e metastático: análise de impacto orçamentário na perspectiva do Sistema Único de Saúde, 2018-2020*. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 28, n. 2, p. e2018325, jul. 2019.

DAI, Y. et al. Nanoparticle design strategies for enhanced anticancer therapy by exploiting the tumour microenvironment. **Chemical Society Reviews**, v. 46, n. 12, p. 3830–3852, 2017.

DANHIER, F. To exploit the tumor microenvironment: Since the EPR effect fails in the clinic, what is the future of nanomedicine? **Journal of Controlled Release**, v. 244, p. 108–121, dez. 2016.

DAVEY, R. J.; WESTHUIZEN, A. VAN DER; BOWDEN, N. A. Metastatic melanoma treatment: Combining old and new therapies. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 98, p. 242–253, fev. 2016.

DAVIS, E. J. et al. Melanoma: What do all the mutations mean? **Cancer**, v. 124, n. 17, p. 3490–3499, 1 set. 2018.

DE OLIVEIRA, J. F. A.; CARDOSO, M. B. Partial Aggregation of Silver Nanoparticles Induced by Capping and Reducing Agents Competition. **Langmuir**, v. 30, n. 17, p. 4879–4886, 6 maio 2014.

DEMAIN, A. L.; VAISHNAV, P. Production of Recombinant Proteins by Microbes and Higher Organisms. In: **Comprehensive Biotechnology**. [s.l.] Elsevier, 2011. v. 3p. 333–345.

DING, L. et al. Size, Shape, and Protein Corona Determine Cellular Uptake and Removal Mechanisms of Gold Nanoparticles. **Small**, v. 14, n. 42, p. 1801451, out. 2018.

DIXIT, C. K. et al. Fast nucleation for silica nanoparticle synthesis using a sol-gel method. **Nanoscale**, v. 8, n. 47, p. 19662–19667, 2016.

DOMINGUES, B. et al. Melanoma treatment in review. **ImmunoTargets and Therapy**, v. Volume 7, p. 35–49, jun. 2018.

DREADEN, E. C. et al. The golden age: gold nanoparticles for biomedicine. **Chem. Soc. Rev.**, v. 41, n. 7, p. 2740–2779, 2012.

DUNN, B. et al. Strategies for encapsulating biomolecules in sol–gel matrices. **Acta Materialia**, v. 46, n. 3, p. 737–741, jan. 1998.

DYKMAN, L. A.; KHLEBTSOV, N. G. Multifunctional gold-based nanocomposites for theranostics. **Biomaterials**, v. 108, p. 13–34, nov. 2016.

DYKMAN, L. A.; KHLEBTSOV, N. G. Immunological properties of gold nanoparticles. **Chemical Science**, v. 8, n. 3, p. 1719–1735, 2017.

DYKMAN, L. A.; KHLEBTSOV, N. G. Gold nanoparticles in chemo-, immuno-, and combined therapy: review [Invited]. **Biomedical Optics Express**, v. 10, n. 7, p. 3152, 1 jul. 2019.

ECCLES, S. A.; WELCH, D. R. Metastasis: recent discoveries and novel treatment strategies. **The Lancet**, v. 369, n. 9574, p. 1742–1757, maio 2007.

EGGERMONT, A. M. M.; KIRKWOOD, J. M. Re-evaluating the role of dacarbazine in metastatic melanoma: what have we learned in 30 years? **European Journal of Cancer**, v. 40, n. 12, p. 1825–1836, ago. 2004.

ELDER, D. E. Melanoma Screening and Mortality. **JNCI: Journal of the National Cancer Institute**, v. 110, n. 10, p. 1135–1136, 1 out. 2018.

ERICKSON, H. P. Size and Shape of Protein Molecules at the Nanometer Level Determined by Sedimentation, Gel Filtration, and Electron Microscopy. **Biological Procedures Online**, v. 11, n. 1, p. 32–51, 15 dez. 2009.

EROGLU, Z.; OZGUN, A. Updates and challenges on treatment with BRAF/MEK-inhibitors in melanoma. **Expert Opinion on Orphan Drugs**, v. 6, n. 9, p. 545–551, 2 set. 2018.

FENG, D.-M. et al. Conditions affecting hydrodynamics-based gene delivery into mouse liver in vivo. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 31, n. 12, p. 850–855, dez. 2004.

FENT, G. M. et al. Biodistribution of maltose and gum arabic hybrid gold nanoparticles after intravenous injection in juvenile swine. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 5, n. 2, p. 128–135, jun. 2009.

FIDLER, I. J.; NICOLSON, G. L. Organ selectivity for implantation survival and growth of b16 melanoma variant tumor lines. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 57, n. 5, p. 1199–1202, 1976.

FIEBIG, H. .; MAIER, A.; BURGER, A. . Clonogenic assay with established human tumour xenografts. **European Journal of Cancer**, v. 40, n. 6, p. 802–820, abr. 2004.

FLOREA, A.-M.; BÜSSELBERG, D. Cisplatin as an Anti-Tumor Drug: Cellular Mechanisms of Activity, Drug Resistance and Induced Side Effects. **Cancers**, v. 3, n. 4, p. 1351–1371, 15 mar. 2011.

FLOREZ, L. et al. How Shape Influences Uptake: Interactions of Anisotropic Polymer Nanoparticles and Human Mesenchymal Stem Cells. **Small**, v. 8, n. 14, p. 2222–2230, 23 jul. 2012.

FLOYD, J. D. et al. Cardiotoxicity of Cancer Therapy. **Journal of Clinical Oncology**, v. 23, n. 30, p. 7685–7696, 20 out. 2005.

FREITAS, R. A. What is nanomedicine? **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 1, n. 1, p. 2–9, mar. 2005.

FU, S. et al. DNA methylation/hydroxymethylation in melanoma. **Oncotarget**, v. 8, n. 44, p. 78163–78173, 29 set. 2017.

FUJITA, D. et al. Protein encapsulation within synthetic molecular hosts. **Nature Communications**, v. 3, n. 1, p. 1093, 2 jan. 2012.

FUJIWARA, M. et al. Preparation and Formation Mechanism of Silica Microcapsules (Hollow Sphere) by Water/Oil/Water Interfacial Reaction. **Chemistry of Materials**, v. 16, n. 25, p. 5420–5426, dez. 2004.

GASHUA, I. B.; WILLIAMS, P. A.; BALDWIN, T. C. Molecular characteristics, association and interfacial properties of gum Arabic harvested from both Acacia senegal and Acacia seyal. **Food Hydrocolloids**, v. 61, p. 514–522, dez. 2016.

GENG, Y. A. N. et al. Shape effects of filaments versus spherical particles in flow and drug delivery. **Nature nanotechnology**, v. 2, p. 249–255, 2007.

GHARATAPE, A.; SALEHI, R. Recent progress in theranostic applications of hybrid gold nanoparticles. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 138, p. 221–233, set. 2017.

GHOSH, P. et al. Gold nanoparticles in delivery applications. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 60, p. 1307–1315, 2008.

GKRETSI, V.; STYLIANOPOULOS, T. Cell Adhesion and Matrix Stiffness: Coordinating Cancer Cell Invasion and Metastasis. **Frontiers in Oncology**, v. 8, n. MAY, 4 maio 2018.

GLAZER, A. M. et al. Analysis of Trends in US Melanoma Incidence and Mortality. **JAMA Dermatology**, v. 153, n. 2, p. 225, 1 fev. 2017.

GODFREY, T.; REICHELT, J. **Industrial enzymology: The application of enzymes in industry**. [s.l.: s.n.].

GONÇALVES, J. P. et al. In vitro attenuation of classic metastatic melanoma-related features by highly diluted natural complexes: Molecular and functional analyses. **International Journal of Oncology**, v. 55, p. 721–732, 22 jul. 2019.

GOODMAN, C. M. et al. Toxicity of Gold Nanoparticles Functionalized with Cationic and Anionic Side Chains. **Bioconjugate Chemistry**, v. 15, n. 4, p. 897–900, jul. 2004.

GRAY-SCHOPFER, V.; WELLBROCK, C.; MARAIS, R. Melanoma biology and new targeted therapy. **Nature**, v. 445, p. 851–857, 22 fev. 2007.

GREEN, H. N. et al. Gold Nanorod Bioconjugates for Active Tumor Targeting and Photothermal Therapy. **Journal of Nanotechnology**, v. 2011, p. 1–7, 2011.

GREENBERG, E. S. et al. Epigenetic biomarkers in skin cancer. **Cancer Letters**, v. 342, n. 2, p. 170–177, jan. 2014.

GREIN-IANKOVSKI, A. et al. A comprehensive study of the relation between structural and physical chemical properties of acacia gums. **Food Hydrocolloids**, v. 85, p. 167–175, dez. 2018.

GREISH, K. Enhanced permeability and retention of macromolecular drugs in solid tumors : A royal gate for targeted anticancer nanomedicines. **Journal of Drug Targeting**, v. 15, n. 7–8, p. 457–464, 2007.

GUNKEL-GRABOLE, G. et al. Polymeric 3D nano-architectures for transport and delivery of therapeutically relevant biomacromolecules. **Biomater. Sci.**, v. 3, n. 1, p. 25–40, 2015.

GUO, J. et al. Gold nanoparticles enlighten the future of cancer theranostics. **International Journal of Nanomedicine**, v. Volume 12, p. 6131–6152, ago. 2017.

GUPTA, A. K.; GUPTA, M. Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. **Biomaterials**, v. 26, p. 3995–4021, 2005.

HANNUN, Y. A. The Journal of The American Society of Hematology. **Blood**, v. 89, n. 6, p. 1845–1853, 1997.

HARE, J. I. et al. Challenges and strategies in anti-cancer nanomedicine development: An industry perspective. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 108, p. 25–38, jan. 2017.

HENCH, L. L.; WEST, J. K. The sol-gel process. **Chemical Reviews**, v. 90, n. 1, p. 33–72, jan. 1990.

HERLOFSON, B. B. et al. Oral mucosal side effects of cytotoxic chemotherapy of testicular cancer. A retrospective study. **European Journal of Oral Sciences**, v. 105, n. 5, p. 523–526, out. 1997.

HOLMES, D. The cancer that rises with the sun. **Nature**, v. 515, p. 2011–2012, 2014.

HOOD, M. A. et al. Hybrid Poly(urethane–urea)/Silica Nanocapsules with pH-Sensitive Gateways. **Chemistry of Materials**, v. 27, n. 12, p. 4311–4318, 23 jun. 2015.

HOOD, M. A. et al. Controlling hydrophobicity of silica nanocapsules prepared from organosilanes. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 532, n. February, p. 172–177, 2017.

HUANG, K. et al. Size-Dependent Localization and Penetration of Ultrasmall Gold Nanoparticles in Cancer Cells, Multicellular Spheroids, and Tumors in Vivo. **ACS Nano**, v. 6, n. 5, p. 4483–4493, 22 maio 2012.

ICCVAM. ICCVAM-Recommended Test Method Protocol BALB/c 3T3 NRU Cytotoxicity Test Method. In: **ICCVAM Test Method Evaluation Report: In Vitro Cytotoxicity Test Methods for Estimating Starting Doses for Acute Oral Systemic Toxicity Tests**. [s.l: s.n.].

INCA. **Tipos de câncer: Câncer de pele melanoma**. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-de-pele-melanoma>>. Acesso em: 13 mar. 2020.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **International Standard ISO 10993-5:2009(E)**, 2009. Disponível em: <<http://nhiso.com/wp-content/uploads/2018/05/ISO-10993-5-2009.pdf>>

ISSA, Y. et al. Cytotoxicity of metal ions to human oligodendroglial cells and human gingival fibroblasts assessed by mitochondrial dehydrogenase activity. **Dental Materials**, v. 24, n. 2, p. 281–287, fev. 2008.

IVOŠEV, V. et al. Uptake and excretion dynamics of gold nanoparticles in cancer cells and fibroblasts. **Nanotechnology**, v. 31, n. 13, p. 135102, 27 mar. 2020.

IYER, A. K. et al. Exploiting the enhanced permeability and retention effect for tumor targeting. **Drug Discovery Today**, v. 11, n. September, p. 812–818, 2006.

JAHANGIRIAN, H. et al. A review of small molecules and drug delivery applications using gold and iron nanoparticles. **International Journal of Nanomedicine**, v. Volume 14, p. 1633–1657, mar. 2019.

JIA, Y.-P. et al. The in vitro and in vivo toxicity of gold nanoparticles. **Chinese Chemical Letters**, v. 28, n. 4, p. 691–702, abr. 2017.

JIN, J. et al. PTD4-apoptin protein and dacarbazine show a synergistic antitumor effect on B16-F1 melanoma in vitro and in vivo. **European Journal of Pharmacology**, v. 654, n. 1, p. 17–25, mar. 2011.

JONES, A.-A. D.; MI, G.; WEBSTER, T. J. A Status Report on FDA Approval of Medical Devices Containing Nanostructured Materials. **Trends in Biotechnology**, v. 37, n. 2, p. 117–120, fev. 2019.

JONES, R.; OCEN, J. Cytotoxic chemotherapy: clinical aspects. **Medicine**, v. 48, n. 2, p. 97–102, fev. 2020.

JONG, W. H. DE; BORM, P. J. Drug delivery and nanoparticles : Applications and hazards. **International Journal of Nanomedicine**, v. 3, n. 2, p. 133–149, 2008.

JU, R. J.; STEHBENS, S. J.; HAASS, N. K. The Role of Melanoma Cell-Stroma Interaction in Cell Motility, Invasion, and Metastasis. **Frontiers in Medicine**, v. 5, n. NOV, p. 1–9, 6 nov. 2018.

JUSTUS, C. R. et al. *In vitro* Cell Migration and Invasion Assays. **Journal of Visualized Experiments**, n. 88, p. e51046, 1 jun. 2014.

KAM, Y.; REIJNIAK, K. A.; ANDERSON, A. R. A. Cellular modeling of cancer invasion: Integration of in silico and in vitro approaches. **J Cell Physiol**, v. 227, n. 2, p. 431–438, 2012.

KANG, B.; MACKEY, M. A.; EL-SAYED, M. A. Nuclear Targeting of Gold Nanoparticles in Cancer Cells Induces DNA Damage, Causing Cytokinesis Arrest and Apoptosis. **Journal of the American Chemical Society**, v. 132, n. 5, p. 1517–1519, 10 fev. 2010.

KAROL, F. Role of silanol groups in formation of supported chromocene catalysts. **Journal of Catalysis**, v. 60, n. 1, p. 68–76, out. 1979.

KATTUMURI, V. et al. Gum Arabic as a Phytochemical Construct for the Stabilization of Gold Nanoparticles: In Vivo Pharmacokinetics and X-ray-Contrast-Imaging Studies. **Small**, v. 3, n. 2, p. 333–341, 5 fev. 2007.

KE, C.; CHEN, X. **Anisotropic Nanomaterials**. Cham: Springer International Publishing, 2015.

KHANAL, A. et al. Synthesis of Silica Hollow Nanoparticles Templated by Polymeric Micelle with Core–Shell–Corona Structure. **Journal of the American Chemical Society**, v. 129, n. 6, p. 1534–1535, fev. 2007.

KHUTALE, G. V.; CASEY, A. Synthesis and characterization of a multifunctional gold-doxorubicin nanoparticle system for pH triggered intracellular anticancer drug release. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 119, p. 372–380, out. 2017.

KIM, JUNYOUNG; KORKMAZ, N.; NAM, C. H. Phage Assembly Using ATPES-Conjugation of Major Coated p8 Protein for Possible Scaffolds. **Interdisciplinary Bio Central**, v. 4, n. 3, p. 1–7, 14 set. 2012.

KIM, B. Y. S.; RUTKA, J. T.; CHAN, W. C. W. Nanomedicine. **New England Journal of Medicine**, v. 363, n. 25, p. 2434–2443, 16 dez. 2010.

KOLHAR, P. et al. Using shape effects to target antibody-coated nanoparticles to lung and brain endothelium. **PNAS**, v. 110, n. 26, p. 10753–10758, 2013.

KONDO, N. et al. DNA Damage Induced by Alkylating Agents and Repair Pathways. **Journal of Nucleic Acids**, v. 2010, p. 1–7, 2010.

KONG, F. Y. et al. Unique Roles of Gold Nanoparticles in Drug Delivery, Targeting and Imaging Applications. **Molecules**, v. 22, n. 9, p. 1445, 31 ago. 2017.

KÖNIG, I. R. et al. What is precision medicine? **European Respiratory**

Journal, v. 50, n. 4, p. 1700391, 19 out. 2017.

KONSTANTINOV, N. K.; ULFF-MØLLER, C. J.; DIMITROV, S. Histone variants and melanoma: facts and hypotheses. **Pigment Cell & Melanoma Research**, v. 29, n. 4, p. 426–433, jul. 2016.

KORSMEYER, R. Critical questions in development of targeted nanoparticle therapeutics. **Regenerative Biomaterials**, p. 143–147, 2016.

KOZAR, I. et al. Many ways to resistance: How melanoma cells evade targeted therapies. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer**, v. 1871, n. 2, p. 313–322, abr. 2019.

KUBO, H. et al. Primary Tumors Limit Metastasis Formation through Induction of IL15-Mediated Cross-Talk between Patrolling Monocytes and NK Cells. **Cancer Immunology Research**, v. 5, n. 9, p. 812–820, set. 2017.

KUDO-SAITO, C. et al. Cancer Metastasis Is Accelerated through Immunosuppression during Snail-Induced EMT of Cancer Cells. **Cancer Cell**, v. 15, n. 3, p. 195–206, mar. 2009.

KUDO-SAITO, C. et al. Blocking the FSTL1-DIP2A Axis Improves Anti-tumor Immunity. **Cell Reports**, v. 24, n. 7, p. 1790–1801, ago. 2018.

KUDO-SAITO, C.; FUWA, T.; KAWAKAMI, Y. Targeting ALCAM in the cryo-treated tumour microenvironment successfully induces systemic anti-tumour immunity. **European Journal of Cancer**, v. 62, p. 54–61, jul. 2016.

KUMAR TELI, M.; MUTALIK, S.; RAJANIKANT, G. K. Nanotechnology and Nanomedicine: Going Small Means Aiming Big. **Current Pharmaceutical Design**, v. 16, n. 16, p. 1882–1892, 1 jun. 2010.

LADSTEIN, R. G. et al. Tumor Necrosis Is a Prognostic Factor in Thick Cutaneous Melanoma. **The American Journal of Surgical Pathology**, v. 36, n. 10, p. 1477–1482, out. 2012.

LAMBERT, A. W.; PATTABIRAMAN, D. R.; WEINBERG, R. A. Emerging Biological Principles of Metastasis. **Cell**, v. 168, n. 4, p. 670–691, fev. 2017.

LANDFESTER, K.; WILLERT, M.; ANTONIETTI, M. Preparation of Polymer Particles in Nonaqueous Direct and Inverse Miniemulsions. **Macromolecules**, v. 33, n. 7, p. 2370–2376, abr. 2000.

LASAGNA-REEVES, C. et al. Bioaccumulation and toxicity of gold nanoparticles after repeated administration in mice. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 393, n. 4, p. 649–655, mar. 2010.

LE NOCI, V. et al. Poly(I:C) and CpG-ODN combined aerosolization to treat lung metastases and counter the immunosuppressive microenvironment. **Oncolmmunology**, v. 4, n. 10, p. e1040214, 3 out. 2015.

LEADER, B.; BACA, Q. J.; GOLAN, D. E. Protein therapeutics: a summary

and pharmacological classification. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 7, n. 1, p. 21–39, jan. 2008.

LEONARDI, G. et al. Cutaneous melanoma: From pathogenesis to therapy (Review). **International Journal of Oncology**, v. 52, n. 4, p. 1071–1080, 27 fev. 2018.

LI, B.; LANE, L. A. Probing the biological obstacles of nanomedicine with gold nanoparticles. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology**, v. 11, n. 3, p. e1542, maio 2019.

LI, R.; LIU, B.; GAO, J. The application of nanoparticles in diagnosis and theranostics of gastric cancer. **Cancer Letters**, v. 386, p. 123–130, fev. 2017.

LI, Z.; ZHANG, Y.; FENG, N. Mesoporous silica nanoparticles: synthesis, classification, drug loading, pharmacokinetics, biocompatibility, and application in drug delivery. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 16, n. 3, p. 219–237, 4 mar. 2019.

LIN, C.-H. et al. Formation of hollow silica nanospheres by reverse microemulsion. **Nanoscale**, v. 7, p. 9614–9626, 2015.

LIN, J. et al. Penetration of Lipid Membranes by Gold Nanoparticles: Insights into Cellular Uptake, Cytotoxicity, and Their Relationship. **ACS Nano**, v. 4, n. 9, p. 5421–5429, 28 set. 2010.

LINGABATHULA, H.; YELLU, N. Cytotoxicity, oxidative stress, and inflammation in human Hep G2 liver epithelial cells following exposure to gold nanorods. **Toxicology Mechanisms and Methods**, v. 26, n. 5, p. 340–347, 12 jun. 2016.

LIU-SMITH, F.; ZIOGAS, A. Age-dependent interaction between sex and geographic ultraviolet index in melanoma risk. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 82, n. 5, p. 1102–1108.e3, maio 2020.

LIU, C. et al. In-situ Formation and Assembly of Gold Nanoparticles by Gum Arabic as Efficient Photothermal Agent for Killing Cancer Cells. **Macromolecular Bioscience**, v. 13, n. 10, p. 1314–1320, out. 2013a.

LIU, H.-J.; XU, P. Smart Mesoporous Silica Nanoparticles for Protein Delivery. **Nanomaterials**, v. 9, n. 4, p. 511, 2 abr. 2019.

LIU, J. et al. Passive Tumor Targeting of Renal-Clearable Luminescent Gold Nanoparticles: Long Tumor Retention and Fast Normal Tissue Clearance. **Journal of the American Chemical Society**, v. 135, n. 13, p. 4978–4981, 3 abr. 2013b.

LIU, Y. et al. Effects of engineered nanoparticles on the innate immune system. **Seminars in Immunology**, v. 34, p. 25–32, dez. 2017.

LIU, Z. et al. Immunomodulating Nanomedicine for Cancer Therapy. **Nano Letters**, v. 18, n. 11, p. 6655–6659, 14 nov. 2018.

LOPES, T. S. et al. Advances and potential application of gold nanoparticles in nanomedicine. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 120, n. 10, p. 16370–16378, 24 out. 2019.

LOTAN, R.; RAZ, A. Low Colony Formation in Vivo and in Culture as Exhibited by Metastatic Melanoma Cells Selected for Reduced Homotypic Aggregation. **Cancer Research**, v. 43, n. May, p. 2088–2093, 1983.

LUZZI, K. J. et al. Multistep Nature of Metastatic Inefficiency. **The American Journal of Pathology**, v. 153, n. 3, p. 865–873, set. 1998.

LYNCH, I.; DAWSON, K. A. Protein-nanoparticle interactions. **Nano Today**, v. 3, n. 1–2, p. 40–47, fev. 2008.

MACKIEWICZ, J.; MACKIEWICZ, A. BRAF and MEK inhibitors in the era of immunotherapy in melanoma patients. **Contemp Oncol (Pozn)**, v. 22, n. 1A, p. 68–72, 2018.

MADAN, V.; LEAR, J. T.; SZEIMIES, R. Non-melanoma skin cancer. **The Lancet**, v. 375, n. 9715, p. 673–685, fev. 2010.

MAEDA, H. Tumor-Selective Delivery of Macromolecular Drugs via the EPR Effect: Background and Future Prospects. **Bioconjugate Chemistry**, v. 21, n. 5, p. 797–802, 19 maio 2010.

MALUCELLI, G. et al. Biomacromolecules as novel green flame retardant systems for textiles: an overview. **RSC Adv.**, v. 4, n. 86, p. 46024–46039, 5 set. 2014.

MANNAVOLA, F. et al. Extracellular Vesicles and Epigenetic Modifications Are Hallmarks of Melanoma Progression. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 1, p. 52, 20 dez. 2020.

MANUCHEHRABADI, N.; ZHU, L. **Handbook of Thermal Science and Engineering**. Cham: Springer International Publishing, 2017.

MARMORATO, P. et al. Cellular distribution and degradation of cobalt ferrite nanoparticles in Balb/3T3 mouse fibroblasts. **Toxicology Letters**, v. 207, n. 2, p. 128–136, nov. 2011.

MARQUES NETO, L. M.; KIPNIS, A.; JUNQUEIRA-KIPNIS, A. P. Role of Metallic Nanoparticles in Vaccinology: Implications for Infectious Disease Vaccine Development. **Frontiers in Immunology**, v. 8, n. MAR, 8 mar. 2017.

MARTINS, G. G. et al. Sesquiterpene lactones of *Moquiniastrum polymorphum* subsp. *floccosum* have antineoplastic effects in Walker-256 tumor-bearing rats. **Chemico-Biological Interactions**, v. 228, p. 46–56, fev. 2015.

MASHHADIZADEH, M. H. Drug-Carrying Amino Silane Coated Magnetic Nanoparticles as Potential Vehicles for Delivery of Antibiotics. **Journal of Nanomedicine & Nanotechnology**, v. 03, n. 04, p. 3–9, 2012.

MASSAGUÉ, J.; BATLLE, E.; GOMIS, R. R. Understanding the molecular mechanisms driving metastasis. **Molecular Oncology**, v. 11, n. 1, p. 3–4, jan. 2017.

MASSE, F. et al. Synthesis of Ultrastable Gold Nanoparticles as a New Drug Delivery System. **Molecules**, v. 24, n. 16, p. 2929, 13 ago. 2019.

MATTHEWS, N. H. et al. Epidemiology of Melanoma. In: WARD, W. H.; FARMA, J. M. (Eds.). . **Cutaneous Melanoma: Etiology and Therapy**. [s.l.] Codon Publications, 2017. v. 6p. 676–688.

MAVERAKIS, E. et al. Metastatic Melanoma – A Review of Current and Future Treatment Options. **Acta Dermato-Venereologica**, v. 95, 2015.

MCALLISTER, T. W. et al. Cognitive effects of cytotoxic cancer chemotherapy: Predisposing risk factors and potential treatments. **Current Psychiatry Reports**, v. 6, n. 5, p. 364–371, set. 2004.

MCCUSKER, L. B.; LIEBAU, F.; ENGELHARDT, G. Nomenclature of structural and compositional characteristics of ordered microporous and mesoporous materials with inorganic hosts. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 58, n. 1, p. 3–13, fev. 2003.

MEYLE, K. D.; GULDBERG, P. Genetic risk factors for melanoma. **Human Genetics**, v. 126, n. 4, p. 499–510, 8 out. 2009.

MEYSKENS, F. L.; SALMON, S. E. Inhibition of Human Melanoma Colony Formation by Retinoids. **Cancer Research**, v. 39, n. October, p. 4055–4057, 1979.

MICEVIC, G.; THEODOSAKIS, N.; BOSENBERG, M. Aberrant DNA methylation in melanoma: biomarker and therapeutic opportunities. **Clinical Epigenetics**, v. 9, n. 1, p. 34, 4 dez. 2017.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (BRASIL). SECRETARIA DE ATENÇÃO À SAÚDE. Protocolos clínicos e diretrizes terapêuticas em oncologia. **Ministério Da Saúde**, v. 1, p. 356, 2014.

MISHRA, H. et al. Melanoma treatment: from conventional to nanotechnology. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, v. 144, n. 12, p. 2283–2302, 9 dez. 2018.

MITRAGOTRI, S. et al. Accelerating the Translation of Nanomaterials in Biomedicine. **ACS Nano**, v. 9, n. 7, p. 6644–6654, 28 jul. 2015.

MODY, K. T. et al. **Mesoporous silica nanoparticles as antigen carriers and adjuvants for vaccine delivery** Nanoscale, 2013.

MONOPOLI, M. P. et al. Biomolecular coronas provide the biological identity of nanosized materials. **Nature nanotechnology**, v. 7, n. December, p. 779–786, 2012.

MORI, S. et al. Anchorage-independent cell growth signature identifies tumors with metastatic potential. **Oncogene**, v. 28, n. 31, p. 2796–2805, 1 ago. 2009.

MUHEEM, A. et al. A review on the strategies for oral delivery of proteins and peptides and their clinical perspectives. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 24, n. 4, p. 413–428, jul. 2016.

MUKERABIGWI, J. F.; GE, Z.; KATAOKA, K. Therapeutic Nanoreactors as In Vivo Nanoplatforms for Cancer Therapy. **Chemistry - A European Journal**, v. 24, n. 59, p. 15706–15724, 22 out. 2018.

NATIVO, P.; PRIOR, I. A.; BRUST, M. Uptake and Intracellular Fate of Surface- Modified Gold Nanoparticles. **ACS Nano**, v. 2, n. 8, p. 1639–1644, 2008.

NCT00436410. **Tumor Necrosis Factor in Patients Undergoing Surgery for Primary Cancer or Metastatic Cancer**. Disponível em: <<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00436410>>. Acesso em: 29 abr. 2020.

NCT02680535. **MRI/US Fusion Imaging and Biopsy in Combination With Nanoparticle Directed Focal Therapy for Ablation of Prostate Tissue**. Disponível em: <<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02680535>>. Acesso em: 26 abr. 2020.

NCT03020017. **NU-0129 in Treating Patients With Recurrent Glioblastoma or Gliosarcoma Undergoing Surgery**. Disponível em: <<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03020017>>. Acesso em: 26 abr. 2020.

NEL, A. et al. Toxic Potential of Materials at the Nanolevel. **Science**, v. 311, p. 622–627, 2006.

NEL, A. Toxic Potential of Materials at the Nanolevel. **Science**, v. 311, n. 5761, p. 622–627, 3 fev. 2006.

NEVES, A. R.; REIS, S. **Nanoparticles in Life Sciences and Biomedicine**. 1st. ed. New York: Jenny Stanford Publishing, 2018.

NIEHS. Guidance Document on Using In Vitro Data to Estimate In Vivo Starting Doses for Acute Toxicity. **NIH Publication No. 01-4500**, n. 01, p. 1–102, 2001.

NIKURA, K. et al. Gold Nanoparticles as a Vaccine Platform: Influence of Size and Shape on Immunological Responses in Vitro and in Vivo. **ACS Nano**, v. 7, n. 5, p. 3926–3938, 2013.

NIKALJE, A. P. Nanotechnology and its applications in medicine. **Medicinal chemistry**, v. 5, n. 2, p. 81–89, 4 mar. 2015.

NOORBATCHA, I. A.; JASWIR, I.; AHMAD, H. Nano-encapsulation of Proteins and Peptides. **Current Nanomaterials**, v. 2, n. 2, p. 76–83, 27 abr. 2018.

NOROUZI, M. Gold Nanoparticles in Glioma Theranostics. **Pharmacological Research**, v. 156, n. llii, p. 104753, jun. 2020.

OH, J. K. et al. Inverse Miniemulsion ATRP: A New Method for Synthesis and Functionalization of Well-Defined Water-Soluble/Cross-Linked Polymeric Particles. **Journal of the American Chemical Society**, v. 128, n. 16, p. 5578–5584, abr.

2006.

OSMAN, M. E. et al. Characterization of commercial samples of gum arabic. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 41, n. 1, p. 71–77, jan. 1993.

OVERWIJK, W. W.; RESTIFO, N. P. B16 as a Mouse Model for Human Melanoma. **Current Protocols in Immunology**, v. 39, n. 1, p. 1–33, 15 out. 2000.

PAN, Y. et al. Gold Nanoparticles of Diameter 1.4 nm Trigger Necrosis by Oxidative Stress and Mitochondrial Damage. **Small**, v. 5, n. 18, p. 2067–2076, 2009.

PANARIELLO, L. et al. Highly reproducible, high-yield flow synthesis of gold nanoparticles based on a rational reactor design exploiting the reduction of passivated Au(III). **Reaction Chemistry & Engineering**, 2020.

PANG, R. W. C.; POON, R. T. P. Clinical implications of angiogenesis in cancers. **Vascular Health and Risk Management**, v. 2, n. 2, p. 97–108, abr. 2006.

PARK, J. H.; OH, N. Endocytosis and exocytosis of nanoparticles in mammalian cells. **International Journal of Nanomedicine**, v. 9, n. SUPPL.1, p. 51, maio 2014.

PATEL, S.; GOYAL, A. Applications of Natural Polymer Gum Arabic: A Review. **International Journal of Food Properties**, v. 18, n. 5, p. 986–998, 4 maio 2015.

PATIL, M. P.; KIM, G. Eco-friendly approach for nanoparticles synthesis and mechanism behind antibacterial activity of silver and anticancer activity of gold nanoparticles. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 101, p. 79–92, 3 jan. 2017.

PELAZ, B. et al. Diverse Applications of Nanomedicine. **ACS Nano**, v. 11, n. 3, p. 2313–2381, 28 mar. 2017.

PENN, I. Malignancies associated with immunosuppressive or cytotoxic therapy. **Surgery**, v. 83, n. 5, p. 492–502, 1978.

PONTI, J. et al. Genotoxicity and morphological transformation induced by cobalt nanoparticles and cobalt chloride: an in vitro study in Balb/3T3 mouse fibroblasts. **Mutagenesis**, v. 24, n. 5, p. 439–445, 1 set. 2009.

POPAT, A. et al. Mesoporous silica nanoparticles for bioadsorption, enzyme immobilisation, and delivery carriers. **Nanoscale**, v. 3, n. 7, p. 2801, 2011.

POPE, E. J. A.; MACKENZIE, J. D. Sol-gel processing of silica. **Journal of Non-Crystalline Solids**, v. 87, n. 1–2, p. 185–198, out. 1986.

POURAHMAD, J. et al. Biological reactive intermediates that mediate dacarbazine cytotoxicity. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 65, n. 1, p. 89–96, 28 dez. 2009.

PRASAD, M. et al. Nanotherapeutics: An insight into healthcare and multi-

dimensional applications in medical sector of the modern world. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 97, n. August 2017, p. 1521–1537, jan. 2018.

PRASAD, V. The precision-oncology illusion. **Nature**, v. 537, p. S63, 2016.

RAHMAN, I. A.; JAFARZADEH, M.; SIPAUT, C. S. Synthesis of organo-functionalized nanosilica via a co-condensation modification using γ -aminopropyltriethoxysilane (APTES). **Ceramics International**, v. 35, n. 5, p. 1883–1888, jul. 2009.

RAJKUMAR, S.; WATSON, I. R. Molecular characterisation of cutaneous melanoma: Creating a framework for targeted and immune therapies. **British Journal of Cancer**, v. 115, p. 145–155, 2016.

RAMALINGAM, S. et al. Adsorption of Proteins on Dual Loaded Silica Nanocapsules. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 123, n. 7, p. 1708–1717, 21 fev. 2019.

RAO, P. V. et al. Phytochemicals and Biogenic Metallic Nanoparticles as Anticancer Agents. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, 2016.

RAO, V.; KALESH, R. Comparative studies of the physical and hydrophobic properties of TEOS based silica aerogels using different co-precursors. **Science and Technology of Advanced Materials**, v. 4, n. 6, p. 509–515, 11 jan. 2003.

REPETTO, G.; DEL PESO, A.; ZURITA, J. L. Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. **Nature Protocols**, v. 3, n. 7, p. 1125–1131, 12 jul. 2008.

RIBATTI, D.; ANNESE, T.; LONGO, V. Angiogenesis and Melanoma. **Cancers**, v. 2, n. 1, p. 114–132, 25 fev. 2010.

RIES, F.; KLASTERSKY, J. Nephrotoxicity Induced by Cancer Chemotherapy With Special Emphasis on Cisplatin Toxicity. **American Journal of Kidney Diseases**, v. 8, n. 5, p. 368–379, nov. 1986.

RILEY, R. S.; DAY, E. S. Gold nanoparticle-mediated photothermal therapy: applications and opportunities for multimodal cancer treatment. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology**, v. 9, n. 4, 2017.

ROIDER, E. M.; FISHER, D. E. Red Hair, Light Skin, and UV-Independent Risk for Melanoma Development in Humans. **JAMA Dermatology**, v. 152, n. 7, p. 751, 1 jul. 2016.

SAHA. Nanomedicine: Promising Tiny Machine for the Healthcare in Future-A Review. **Oman Medical Journal**, v. 24, n. 4, p. 242–247, 2009.

SANTIAGO, P. S. et al. Giant extracellular *Glossoscolex paulistus* Hemoglobin (HbGp) upon interaction with cetyltrimethylammonium chloride (CTAC) and sodium dodecyl sulphate (SDS) surfactants: Dissociation of oligomeric structure and autoxidation. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v. 1770,

n. 4, p. 506–517, abr. 2007.

SANTOS, C. A. DOS; SOUZA, D. L. B. Melanoma mortality in Brazil: trends and projections (1998-2032). **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 24, n. 4, p. 1551–1561, abr. 2019.

SCHADENDORF, D. et al. Melanoma. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 1, n. 1, p. 15003, 23 dez. 2015.

SCHADENDORF, D. et al. Melanoma. **The Lancet**, v. 392, n. 10151, p. 971–984, set. 2018.

SCHADENDORF, D.; LIVINGSTONE, E.; ZIMMER, L. Treatment in metastatic melanoma—time to re-think. **Annals of Oncology**, v. 30, n. 4, p. 501–503, 1 abr. 2019.

SCHILLER, R. et al. Synthesis of Mesoporous Silica Particles and Capsules by Miniemulsion Technique. **Chemistry of Materials**, v. 21, n. 21, p. 5088–5098, 10 nov. 2009.

SCHIMMEL, K. J. M. et al. Cardiotoxicity of cytotoxic drugs. **Cancer Treatment Reviews**, v. 30, n. 2, p. 181–191, abr. 2004.

SCHINDELIN, J. et al. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. **Nature Methods**, v. 9, n. 7, p. 676–682, 28 jul. 2012.

SCHLEY, P. D.; FIELD, C. J. The immune-enhancing effects of dietary fibres and prebiotics. **British Journal of Nutrition**, v. 87, n. S2, p. S221–S230, 9 maio 2002.

SCHMIDT, S. et al. Silica Nanoparticles for Intracellular Protein Delivery: a Novel Synthesis Approach Using Green Fluorescent Protein. **Nanoscale Research Letters**, v. 12, n. 1, p. 545, 25 dez. 2017.

SCHUBERT, U. Chemistry and Fundamentals of the Sol-Gel Process. In: **The Sol-Gel Handbook**. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2015. p. 1–28.

SENGANI, M.; GRUMEZESCU, A. M.; RAJESWARI, V. D. Recent trends and methodologies in gold nanoparticle synthesis – A prospective review on drug delivery aspect. **OpenNano**, v. 2, p. 37–46, 2017.

SHAH, S. W. A. et al. Surface engineered gold nanorods: intelligent delivery system for cancer therapy. In: **Metal Nanoparticles for Drug Delivery and Diagnostic Applications**. [s.l.] Elsevier, 2020. p. 85–98.

SHAIN, A. H.; BASTIAN, B. C. From melanocytes to melanomas. **Nature Reviews Cancer**, v. 16, n. 6, p. 345–358, 29 jun. 2016.

SHANG, L.; NIENHAUS, K.; NIENHAUS, G. Engineered nanoparticles interacting with cells: size matters. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 12, n. 1, p. 5, 2014.

SHARIFI, M. et al. Plasmonic gold nanoparticles: Optical manipulation, imaging, drug delivery and therapy. **Journal of Controlled Release**, v. 311–312, n. August, p. 170–189, out. 2019.

SHI, H. et al. Charge-Selective Delivery of Proteins Using Mesoporous Silica Nanoparticles Fused with Lipid Bilayers. **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 11, n. 4, p. 3645–3653, 30 jan. 2019.

SHI, J. et al. Cancer nanomedicine: progress, challenges and opportunities. **Nat Rev Cancer**, v. 17, n. 1, p. 20–37, jul. 2017.

SHI, S.; CHEN, F.; CAI, W. Biomedical applications of functionalized hollow mesoporous silica nanoparticles: focusing on molecular imaging. **Nanomedicine**, v. 8, n. 12, p. 2027–2039, dez. 2013.

SILVA, M. G. A. et al. New aspects of gold nanorod formation via seed-mediated method. **Comptes Rendus Chimie**, v. 16, p. 640–650, 2013.

SKIN CANCER FOUNDATION. **Skin Cancer 101**. Disponível em: <<https://skincancer.org/skin-cancer-information/>>. Acesso em: 1 maio. 2020.

SOARES, J. C. et al. Application of immobilized enzyme technologies for the textile industry: a review. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 29, n. 6, p. 223–237, 14 dez. 2011.

SOLESVIK, O. V; ROFSTAD, E. K.; BRUSTAD, T. Vascular structure of five human malignant melanomas grown in athymic nude mice. **British Journal of Cancer**, v. 46, n. 4, p. 557–567, out. 1982.

SONAVANE, G.; TOMODA, K.; MAKINO, K. Biointerfaces Biodistribution of colloidal gold nanoparticles after intravenous administration: Effect of particle size. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 66, p. 274–280, 2008.

SONG, H. et al. Biocompatible PEGylated Gold nanorods function As cytokinesis inhibitors to suppress angiogenesis. **Biomaterials**, v. 178, p. 23–35, set. 2018.

STECKIEWICZ, K. P. et al. Impact of gold nanoparticles shape on their cytotoxicity against human osteoblast and osteosarcoma in in vitro model. Evaluation of the safety of use and anti-cancer potential. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 30, n. 2, p. 22, 12 fev. 2019.

STREBHARDT, K.; ULLRICH, A. Paul Ehrlich's magic bullet concept: 100 years of progress. **Nature Reviews Cancer**, v. 8, n. 6, p. 473–480, 12 jun. 2008.

SZENDE, B. et al. Effect of a novel somatostatin analogue combined with cytotoxic drugs on human tumour xenografts and metastasis of B16 melanoma. **British Journal of Cancer**, v. 88, n. 1, p. 132–136, 28 jan. 2003.

TAN, H. et al. Silica Nanocapsules of Fluorescent Conjugated Polymers and Superparamagnetic Nanocrystals for Dual-Mode Cellular Imaging. **Chemistry - A European Journal**, v. 17, n. 24, p. 6696–6706, 6 jun. 2011.

TANG, F.; LI, L.; CHEN, D. Mesoporous Silica Nanoparticles: Synthesis, Biocompatibility and Drug Delivery. **Advanced Materials**, v. 24, n. 12, p. 1504–1534, 22 mar. 2012.

TANG, J.-Q. et al. Recent developments in nanomedicine for melanoma treatment. **International Journal of Cancer**, v. 141, n. 4, p. 646–653, 15 ago. 2017.

TCGA. Genomic Classification of Cutaneous Melanoma. **Cell**, v. 161, n. 7, p. 1681–1696, jun. 2015.

TENZER, S. et al. Rapid formation of plasma protein corona critically affects nanoparticle pathophysiology. **Nature Nanotechnology**, v. 8, n. 10, p. 772–781, 22 out. 2013.

THAKUR, R. et al. Transcriptomic analysis reveals prognostic molecular signatures of stage I melanoma. **Clinical Cancer Research**, v. 25, n. 24, p. 7424–7435, 2019.

THAMBIRAJ, S.; HEMA, S.; RAVI SHANKARAN, D. Functionalized gold nanoparticles for drug delivery applications. **Materials Today: Proceedings**, v. 5, n. 8, p. 16763–16773, 2018.

THIAM, A. et al. Years of life lost due to metastatic melanoma in 12 countries. **Journal of Medical Economics**, v. 19, n. 3, p. 259–264, 3 mar. 2016.

THONGPRAYOON, C.; CHEUNGPASITPORN, W.; KASHANI, K. Serum creatinine level, a surrogate of muscle mass, predicts mortality in critically ill patients. **Journal of Thoracic Disease**, v. 8, n. 5, p. E305–E311, maio 2016.

TORINO, F. et al. Recognizing menopause in women with amenorrhea induced by cytotoxic chemotherapy for endocrine-responsive early breast cancer. **Endocrine-Related Cancer**, v. 19, n. 2, p. R21–R33, abr. 2012.

TREWYN, B. G. et al. Synthesis and Functionalization of a Mesoporous Silica Nanoparticle Based on the Sol–Gel Process and Applications in Controlled Release. **Accounts of Chemical Research**, v. 40, n. 9, p. 846–853, set. 2007.

UBOLDI, C. et al. Amorphous silica nanoparticles do not induce cytotoxicity, cell transformation or genotoxicity in Balb/3T3 mouse fibroblasts. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 745, n. 1–2, p. 11–20, jun. 2012.

UBOLDI, C. et al. Role of the crystalline form of titanium dioxide nanoparticles: Rutile, and not anatase, induces toxic effects in Balb/3T3 mouse fibroblasts. **Toxicology in Vitro**, v. 31, p. 137–145, mar. 2016.

ULLAH, M. F. Cancer multidrug resistance (MDR): A major impediment to effective chemotherapy. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 9, n. 1, p. 1–6, 2008.

VAGHARI, H. et al. Application of magnetic nanoparticles in smart enzyme immobilization. **Biotechnology Letters**, v. 38, n. 2, p. 223–233, 15 fev. 2016.

VALLET-REGÍ, M. et al. Mesoporous Silica Nanoparticles for Drug Delivery: Current Insights. **Molecules**, v. 23, n. 1, p. 47, 25 dez. 2017.

VALSAMI-JONES, E.; LYNCH, I. How safe are nanomaterials? **Science**, v. 350, n. 6259, p. 388–389, 23 out. 2015.

VEGA-AVILA, E.; PUGSLEY, M. K. An overview of colorimetric assay methods used to assess survival or proliferation of mammalian cells. **Proceedings of the Western Pharmacology Society**, v. 54, p. 10–14, 2011.

VON HIPPEL, P. H.; SCHLEICH, T. Ion effects on the solution structure of biological macromolecules. **Accounts of Chemical Research**, v. 2, n. 9, p. 257–265, set. 1969.

VRANISH, J. N. et al. Enhancing Coupled Enzymatic Activity by Colocalization on Nanoparticle Surfaces: Kinetic Evidence for Directed Channeling of Intermediates. **ACS Nano**, v. 12, n. 8, p. 7911–7926, 28 ago. 2018.

WALSH, G. A.; POWER, R. F.; HEADON, D. R. Enzymes in the animal-feed industry. **Trends in Biotechnology**, v. 11, n. 10, p. 424–430, out. 1993.

WANG, L. et al. Selective Targeting of Gold Nanorods at the Mitochondria of Cancer Cells: Implications for Cancer Therapy. **Nano Letters**, v. 11, n. 2, p. 772–780, 9 fev. 2011.

WANG, P. et al. Thermo-triggered Release of CRISPR-Cas9 System by Lipid-Encapsulated Gold Nanoparticles for Tumor Therapy. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 57, n. 6, p. 1491–1496, 5 fev. 2018a.

WANG, S. et al. Regulation of Ca²⁺ Signaling for Drug-Resistant Breast Cancer Therapy with Mesoporous Silica Nanocapsule Encapsulated Doxorubicin/siRNA Cocktail. **ACS Nano**, v. 13, n. 1, p. 274–283, 22 jan. 2019.

WANG, X. et al. Photothermal Ablation of Cancer Cells by Albumin-Modified Gold Nanorods and Activation of Dendritic Cells. **Materials**, v. 12, n. 1, p. 31, 21 dez. 2018b.

WANG, Z. et al. Novel Tubulin Polymerization Inhibitors Overcome Multidrug Resistance and Reduce Melanoma Lung Metastasis. **Pharmaceutical Research**, v. 29, n. 11, p. 3040–3052, 13 nov. 2012.

WATANABE, H. et al. Possible cardiac side effects of granisetron, an antiemetic agent, in patients with bone and soft-tissue sarcomas receiving cytotoxic chemotherapy. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 35, n. 4, p. 278–282, 1 jul. 1995.

WELCH, D. R.; HURST, D. R. Defining the Hallmarks of Metastasis. **Cancer Research**, v. 79, n. 12, p. 3011–3027, 15 jun. 2019.

WESTERDAHL, J. et al. Risk of cutaneous malignant melanoma in relation to use of sunbeds: further evidence for UV-A carcinogenicity. **British Journal of Cancer**, v. 82, n. 9, p. 1593–1599, 3 abr. 2000.

WIBOWO, D. et al. Interfacial engineering for silica nanocapsules. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 236, p. 83–100, out. 2016.

WILLIAMS, A. L. B.; HOOFNAGLE, J. H. Ratio of Serum Aspartate to Alanine Aminotransferase in Chronic Hepatitis Relationship to Cirrhosis. **Gastroenterology**, v. 95, n. 3, p. 734–739, set. 1988.

WISE, H. C.; SOLIT, D. B. Precision Oncology: Three Small Steps Forward. **Cancer Cell**, v. 35, p. 825–826, 2019.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Ultraviolet radiation (UV) - Skin cancers**. Disponível em: <<https://www.who.int/uv/faq/skincancer/en/index1.html>>. Acesso em: 1 maio. 2020a.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Health effects of UV radiation**. Disponível em: <http://www.who.int/uv/health/uv_health2/en/index1.html>. Acesso em: 30 abr. 2020b.

WORMUTH, K. Superparamagnetic Latex via Inverse Emulsion Polymerization. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 241, n. 2, p. 366–377, set. 2001.

WU, Y. et al. Gold Nanorod Photothermal Therapy Alters Cell Junctions and Actin Network in Inhibiting Cancer Cell Collective Migration. **ACS Nano**, v. 12, n. 9, p. 9279–9290, 25 set. 2018.

XIE, X. et al. The Effect of shape on Cellular Uptake of Gold Nanoparticles in the forms of Stars, Rods, and Triangles. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 3827, 19 dez. 2017.

XIN, Y. et al. Circulating epigenetic biomarkers in melanoma. **Tumor Biology**, v. 37, n. 2, p. 1487–1492, 11 fev. 2016.

XU, W. et al. A Review on Cancer Therapy Based on the Photothermal Effect of Gold Nanorod. **Current Pharmaceutical Design**, v. 25, n. 46, p. 4836–4847, 10 jan. 2020.

XUAN, M. et al. Macrophage Cell Membrane Camouflaged Mesoporous Silica Nanocapsules for In Vivo Cancer Therapy. **Advanced Healthcare Materials**, v. 4, n. 11, p. 1645–1652, ago. 2015.

XUAN, N. T. et al. Stimulation of Mouse Dendritic Cells by Gum Arabic. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 25, n. 6, p. 641–648, 2010.

YANG, D. D. et al. Trends in malignant melanoma mortality in 31 countries from 1985 to 2015. **British Journal of Dermatology**, p. bjd.19010, 4 mar. 2020.

YANG, G.-Z. et al. Biomimetic Silica Nanocapsules for Tunable Sustained Release and Cargo Protection. **Langmuir**, v. 33, n. 23, p. 5777–5785, 13 jun. 2017a.

YANG, Y. et al. Gold nanoparticle-gated mesoporous silica as redox-triggered drug delivery for chemo-photothermal synergistic therapy. **Journal of Colloid and**

Interface Science, v. 508, p. 323–331, dez. 2017b.

YAO, C. et al. Gold Nanoparticle Mediated Phototherapy for Cancer. **Journal of Nanomaterials**, v. 2016, p. 1–29, 2016.

YU, M. et al. Silica-based nanoparticles for therapeutic protein delivery. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 5, n. 18, p. 3241–3252, 2017.

ZAIDI, M. R.; DAY, C.-P.; MERLINO, G. From UVs to metastases: modeling melanoma initiation and progression in the mouse. **Journal of investigative dermatology**, v. 128, p. 2381–2391, out. 2008.

ZHANG, F. et al. Lysosome-dependent necrosis specifically evoked in cancer cells by gold nanorods. **Nanomedicine**, v. 12, n. 13, p. 1575–1589, jul. 2017.

ZHANG, K. et al. Shape effects of nanoparticles conjugated with cell-penetrating peptides (HIV Tat PTD) on CHO cell uptake. **Bioconjug Chem.**, v. 19, n. 9, p. 1880–1887, 2008.

ZHANG, L. et al. Selective metabolic effects of gold nanorods on normal and cancer cells and their application in anticancer drug screening. **Biomaterials**, v. 34, n. 29, p. 7117–7126, set. 2013.

ZHANG, X.-Y.; ZHANG, P.-Y. Genetics and epigenetics of melanoma. **Oncology Letters**, v. 12, n. 5, p. 3041–3044, nov. 2016.

ZHANG, X. et al. Toxicologic effects of gold nanoparticles in vivo by different administration routes. **International Journal of Nanomedicine**, v. 5, p. 771–781, 2010.

ZHANG, X. et al. Biomaterials In vivo renal clearance , biodistribution , toxicity of gold nanoclusters. **Biomaterials**, v. 33, p. 4628–4638, 2012.

ZHANG, Y. et al. Silica-based nanocapsules: synthesis, structure control and biomedical applications. **Chemical Society Reviews**, v. 44, n. 1, p. 315–335, 2015.

ZHAO, P.; LI, N.; ASTRUC, D. State of the art in gold nanoparticle synthesis. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 257, n. 3–4, p. 638–665, fev. 2013.

ZHOU, F.; NORDQUIST, R. E.; CHEN, W. R. Photonics immunotherapy — A novel strategy for cancer treatment. **Journal of Innovative Optical Health Sciences**, v. 09, n. 01, p. 1630001, 4 jan. 2016.

ZHOU, Y. et al. Mesoporous silica nanoparticles for drug and gene delivery. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, v. 8, n. 2, p. 165–177, mar. 2018.

ZIEROLD, K. Heavy metal cytotoxicity studied by electron probe X-ray microanalysis of cultured rat hepatocytes. **Toxicology in Vitro**, v. 14, n. 6, p. 557–563, dez. 2000.