

AMANDA PATRÍCIA GONÇALVES

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA CITOTOXICIDADE E ENDOCITOSE DA
NANOPARTÍCULA DOXO-VLDP EM CÉLULAS TUMORAIS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

Orientadora: Anésia Aparecida dos Santos

**VIÇOSA – MINAS GERAIS
2019**

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

G635a
2019
Gonçalves, Amanda Patrícia, 1994-
Avaliação *in vitro* da citotoxicidade e endocitose da
nanopartícula Doxo-VLDP em células tumorais / Amanda
Patrícia Gonçalves. – Viçosa, MG, 2019.
60f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Anesia Aparecida dos Santos.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. Nanotecnologia. 2. Câncer. 3. Doxorrubicina.
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Biologia
Geral. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e
Estrutural. II. Título.

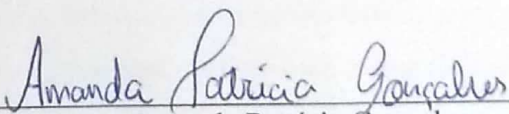
CDD 22 ed. 620.5

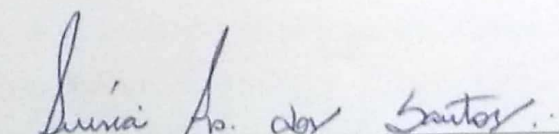
AMANDA PATRÍCIA GONÇALVES

AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA CITOTOXICIDADE E ENDOCITOSE DA
NANOPARTÍCULA DOXO-VLDP EM CÉLULAS TUMORAIS

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 10 de julho de 2019.


Amanda Patricia Gonçalves
Autora


Anésia Aparecida dos Santos
Orientadora

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a todas as pessoas do mundo. Foi por elas que o fiz.

AGRADECIMENTOS

Não fazemos nada sozinhos nesta vida. E ela me ensinou a ser grata a todos os companheiros de caminhada.

Agradeço a minha vó, minha mãe e minha irmã, por serem a minha fortaleza.

Aos governos Lula e Dilma, pela criação e manutenção de políticas que permitiram a minha entrada e permanência na Universidade Pública.

À Universidade Federal de Viçosa, pela excelente formação e pela oportunidade de realização deste trabalho.

Aos órgãos de fomento, CAPES, CNPQ e Fapemig, pela concessão de bolsa e suporte financeiro.

Aos departamentos de Biologia Geral e de Física, pelo acolhimento e concessão de instalações.

Aos laboratórios multiusuários da UFV, pela manutenção dos equipamentos necessários para a realização deste estudo.

Aos membros da banca, pelas valiosas contribuições.

Aos colegas de laboratório, em especial Viktor, Mariá, Karol, Bela e Gabi, por estarem sempre presentes e dispostos a ajudar e a nos abraçar quando tudo parece não funcionar. E claro, obrigada também por todos os cafezinhos conjuntos.

À professora Anésia, a melhor orientadora que o destino poderia colocar no meu caminho. Obrigada por todas as contribuições na minha formação científica, por toda a confiança em meu trabalho e por enxergar em mim, além de uma pesquisadora, uma mulher, humana, como qualquer outra.

Aos amigos e colegas que cruzaram meu caminho nestes seis anos de Viçosa, por tornar a caminhada mais agradável e cheia de sorrisos.

Às companheiras da república Yodinha: Micaele, Jaciane, Geniana e Laura, por serem companhia e suporte diário. Vocês foram a minha família aqui, e eu não poderia ser mais grata.

Ao meu namorado Fichter, por toda a leveza do seu amor e o companheirismo em todas as etapas da realização deste trabalho. Por me trazer tranquilidade, acreditar em meu potencial, incentivar o meu crescimento e vibrar, junto comigo, a cada conquista.

Aos meus sogros, por estarem sempre na torcida pelo meu sucesso.

Às forças maiores deste mundo, que ainda não compreendo, mas acredito que existam.

E por fim, a mim, por nunca ter desistido.

Sou grata.

RESUMO

GONÇALVES, Amanda Patrícia, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2019. **Avaliação *in vitro* da citotoxicidade e endocitose da nanopartícula Doxo-VLDP em células tumorais.** Orientadora: Anésia Aparecida dos Santos.

O câncer ocupa o segundo lugar dentre as causas de morte no mundo e a quimioterapia é um dos principais métodos para o seu tratamento. No entanto, esta possui vários problemas associados, como por exemplo: acesso limitado do quimioterápico ao tecido tumoral e ausência de seletividade. Estudos recentes apontam a nanotecnologia como uma alternativa terapêutica para superar tais obstáculos, seja pela possibilidade de associação de nanomateriais a ferramentas moleculares que lhes proporcionem seletividade ou pela capacidade destes serem retidos no microambiente de tumores sólidos. Na tentativa de contornar os problemas expostos, este trabalho objetivou o desenvolvimento da nanopartícula Doxo-VLDP (*Virus-Like DNA Protein*): uma nanopartícula revestida por proteína sintética *virus-like*, constituída de moléculas DNA carreando a droga intercalante doxorrubicina, bem como a investigação dos processos celulares de morte e endocitose desencadeados por esta construção. A eficiência da construção sobre a viabilidade de células tumorais foi avaliada por ensaio de MTT. Os resultados demonstraram que o potencial quimioterápico e a seletividade da droga, quando carregada em nanopartículas, foi aumentado. Avaliação do tipo de morte causado por Doxo-VLDP, determinada por citometria de fluxo, também confirmou a atividade antitumoral da construção. Doxo-VLDP causou morte celular por apoptose em linhagens tumorais de melanoma (B16F10) e glioma (C6) murinos. Além disso, observações em microscópio de fluorescência comprovaram que a nanopartícula Doxo-VLDP é interiorizada pelas células e libera seu conteúdo no citosol e ensaios com inibidores endocíticos sugeriram que Doxo-VLDP alcança o interior celular por mecanismos ativos de endocitose, rota diferente da droga pura. Com base nos resultados obtidos, podemos concluir que Doxo-VLDP é capaz de internalizar células tumorais, conferindo citotoxicidade aumentada à droga. Além disso, é possível inferir que a nova construção possui potencial para utilização na clínica médica, uma vez que esta pode ser engenheirada a fim de minimizar os efeitos colaterais e o aparecimento de resistência.

Palavras-chave: Nanotecnologia. Câncer. Doxorrubicina.

ABSTRACT

GONÇALVES, Amanda Patrícia, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2019. **In vitro evaluation of cytotoxicity and endocytosis of Doxo-VLDP nanoparticle in tumor cells.** Adviser: Anésia Aparecida dos Santos.

Cancer is the second leading cause of death in the world and chemotherapy is one of the main methods for its treatment. However, it has several associated problems, such as limited access of chemotherapy to tumor tissue and lack of selectivity. Recent studies point to nanotechnology as a therapeutic alternative to overcome such obstacles, either by the possibility of associating nanomaterials with molecular tools that provide them with selectivity or by their ability to be retained in the solid tumor microenvironment. In order to overcome the above problems, this work aimed at the development of the Doxo-VLDP (Virus-Like DNA Protein) nanoparticle: a virus-like synthetic protein-coated nanoparticle, consisting of DNA molecules carrying the doxorubicin intercalating drug, as well as research of the cellular processes of death and endocytosis triggered by this construction.. The efficiency of the construct on the viability of tumor cells was assessed by MTT assay. The results demonstrated that the chemotherapeutic potential and the selectivity of the drug, when carried in nanoparticles, was increased. Evaluation of the type of death caused by Doxo-VLDP, determined by flow cytometry, also confirmed the antitumor activity of the construct. Doxo-VLDP caused cell death by apoptosis in murine melanoma (B16F10) and murine (C6) glioma lines. In addition, fluorescence microscopy observations have shown that the Doxo-VLDP nanoparticle is internalized by cells and releases their contents into the cytosol, and endocytic inhibitor assays have suggested that Doxo-VLDP reaches the cell interior by active mechanisms of endocytosis, a route different from pure drug . Based on the results obtained, we can conclude that Doxo-VLDP is able to internalize tumor cells, conferring increased cytotoxicity to the drug. In addition, it is possible to infer that the new construction has potential for use in the medical clinic, since it can be engineered in order to minimize the side effects and the appearance of resistance.

Key words: Nanotechnology. Cancer. Doxorubicin.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Incidência de câncer a cada 100 mil habitantes, por estado brasileiro.....	14
Figura 2	Tecnologias revolucionárias na história.....	15
Figura 3	Estrutura química da doxorubicina.....	16
Figura 4	Mecanismos que conferem atividade antineoplásica à doxorubicina.....	17
Figura 5	Estrutura tridimensional da proteína C ₄ S ₁₀ K ₁₂	18
Figura 6	Automontagem da proteína C ₄ S ₁₀ K ₁₂	23
Figura 7	Ensaio de citotoxicidade de Doxo pura e Doxo-VLDP.....	24
Figura 8	Ensaio de citotoxicidade dos componentes de VLDP	25
Figura 9	Reação de redução da molécula de MTT à Formazan.....	26
Figura 10	Estabilidade de DNA em condições fisiológicas.....	31
Figura 11	Estabilidade de DNA puro sob ação de endonucleases.....	31
Figura 12	Estabilidade de DNA encapsulado sob ação de endonucleases.....	31
Figura 13	Viabilidade celular das células B16F10 após exposição à proteína C ₄ S ₁₀ K ₁₂	32
Figura 14	Viabilidade celular das células B16F10 após exposição à molécula de DNA pura ou revestida pela proteína C ₄ S ₁₀ K ₁₂	33
Figura 15	Viabilidade celular das células B16F10 após exposição à Doxo pura e Doxo-VLDP.....	34
Figura 16	Viabilidade celular das células C6 após exposição à Doxo pura e Doxo-VLDP.....	34
Figura 17	Viabilidade celular das células Melan-A após exposição à Doxo pura e Doxo-VLDP.....	35
Figura 18	Determinação do tipo de morte celular induzida por citometria de fluxo.....	36
Figura 19	Micrografia de vesículas autofágicas em microscopia de fluorescência.....	37
Figura 20	Determinação da autofagia por análise densitométrica de vesículas autofágicas fluorescentes.....	37
Figura 21	Visualização de doxorubicina intracelular por microscopia confocal após 12h de tratamento.....	38
Figura 22	Visualização de doxorubicina intracelular por microscopia confocal após 3h de tratamento.....	39
Figura 23	Visualização de VLDP conjugada a FITC por microscopia confocal.....	39
Figura 24	Confirmação da transformação da linhagem B16F10 por visualização de endossomos primários na microscopia confocal.....	40

Figura 25	Visualização de doxorubicina intracelular em células B16F10 tratadas com Doxo-VLDP e Sacarose.....	42
Figura 26	Determinação da endocitose de Doxo-VLDP em células B16F10 tratadas com Sacarose.....	42
Figura 27	Visualização de doxorubicina intracelular em células B16F10 tratadas com Doxo-VLDP e Nistatina.....	43
Figura 28	Determinação da endocitose de Doxo-VLDP em células B16F10 tratadas com Nistatina.....	43
Figura 29	Visualização de doxorubicina intracelular em células B16F10 tratadas com Doxo-VLDP e Genisteína.....	44
Figura 30	Determinação da endocitose de Doxo-VLDP em células B16F10 tratadas com Genisteína.....	44
Figura 31	Visualização de doxorubicina intracelular em células C6 tratadas com Doxo-VLDP e Sacarose.....	45
Figura 32	Determinação da endocitose de Doxo-VLDP em células C6 tratadas com Sacarose.....	45
Figura 33	Visualização de doxorubicina intracelular em células C6 tratadas com Doxo-VLDP e Nistatina.....	46
Figura 34	Determinação da endocitose de Doxo-VLDP em células C6 tratadas com Nistatina.....	46
Figura 35	Visualização de doxorubicina intracelular em células C6 tratadas com Doxo-VLDP e Genisteína.....	47
Figura 36	Determinação da endocitose de Doxo-VLDP em células C6 tratadas com Genisteína.....	47
Figura 37	Visualização de doxorubicina intracelular em células B16F10 tratadas com Doxo pura e Nistatina.....	48
Figura 38	Determinação da endocitose de Doxo pura em células B16F10 tratadas com Nistatina.....	48
Figura 39	Visualização de doxorubicina intracelular em células B16F10 tratadas com Doxo pura e Genisteína.....	49
Figura 40	Determinação da endocitose de Doxo pura em células B16F10 tratadas com Genisteína.....	49
Figura 41	Visualização de doxorubicina intracelular em células B16F10 tratadas com Doxo pura e Sacarose.....	50

Figura 42	Determinação da endocitose de Doxo pura em células B16F10 tratadas com Sacarose.....	50
Figura 43	Relação entre mecanismo de endocitose e tamanho da carga transportada.....	55

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	12
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	13
2.1	Câncer.....	13
2.2	Nanotecnologia.....	14
2.3	Doxorrubicina.....	17
2.4	Morte Celular e Endocitose.....	18
3	OBJETIVOS.....	21
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	21
4.1	Linhagens Celulares.....	21
4.2	Condições de Cultivo.....	22
4.3	Passagem Celular.....	22
4.4	Montagem da Nanopartícula VLDP.....	22
4.5	Ensaio de Estabilidade.....	23
4.6	Ensaio de Citotoxicidade.....	24
4.7	Cálculo de Viabilidade Celular.....	26
4.8	Cálculo de Índice de Seletividade.....	26
4.9	Ensaio de Detecção de Células Apoptóticas e Necróticas.....	27
4.10	Detecção de Autofagia.....	28
4.11	Manipulação de Rota Endocítica.....	28
4.12	Análise de Fluorescência Por Densitometria de Imagem.....	29
4.13	Transformação de Organelas Ácidas.....	29
4.14	Conjugação de Fitc a VLDP.....	29
4.15	Avaliação da Sub-Localização Celular de VLDP.....	30
4.16	Análise Estatísticas.....	30
5	RESULTADOS.....	30
5.1	Doxo-VLDP é estável em condições fisiológicas e mais resistente a ação de endonucleases.....	30
5.2	A proteína C₄S₁₀K₁₂ não apresenta toxicidade celular.....	32
5.3	A molécula de DNA da construção Doxo-VLDP não apresenta toxicidade celular.....	32
5.4	A nanopartícula Doxo-VLDP aumenta a toxicidade de Doxorrubicina.....	33

5.5	Doxo-VLDP apresenta discreta seletividade.....	35
5.6	Doxo-VLDP induz a morte de células tumorais por apoptose.....	36
5.7	Doxo-VLDP induz autofagia em células tumorais.....	37
5.8	A construção Doxo-VLDP permite a entrada de Doxorubicina no interior das células.....	38
5.9	A entrada de Doxorubicina nas células é atrasada quando carregada em VLDP.....	38
5.10	A nanopartícula VLDP é interiorizada antes de liberar seu conteúdo no citosol.....	39
5.11	Doxo-VLDP é co-localizada com endossomos primários.....	40
5.12	Doxo-VLDP entra nas células por transporte mediado por vesículas.....	40
6	DISCUSSÃO.....	51
7	CONCLUSÕES.....	57
	REFERÊNCIAS.....	58

1. INTRODUÇÃO

O câncer é considerado uma das doenças mais devastadoras que existem. Ele envolve alterações celulares drásticas e o tratamento tende a ser extremamente agressivo à saúde do paciente. A busca por tratamentos alternativos que contornam os temidos efeitos colaterais é um anseio urgente para toda a comunidade civil e acadêmica.

Uma alternativa que vem sendo bastante estudada é o emprego da nanotecnologia no tratamento do câncer. O termo nanotecnologia é atribuído a produtos e/ou processos que ocorrem em escala nanométrica, ou seja, com escalas menores ou iguais a 100 nm em ao menos uma direção (WANG; LANGER; FAROKHZAD, 2012).

No caso de tratamentos oncológicos, a possibilidade de associar ferramentas moleculares às nanopartículas que as tornem capazes de direcionar drogas ao tecido alvo é uma das características que tornam esta uma alternativa atrativa (WANG; LANGER; FAROKHZAD, 2012).

Algumas características intrínsecas de tumores fazem com que compostos de tamanho reduzido os acessem preferencialmente. Tumores sólidos tendem a apresentar vasos sanguíneos mais fracos e drenagem linfática menos eficiente quando comparados a tecidos saudáveis. Tais características levam ao acúmulo e retenção de nanopartículas e macromoléculas no interior do mesmo, uma vez que sua permeabilidade é aumentada com a fragilidade dos vasos sanguíneos e sua retenção é possível devido ao retardo na atividade linfática. Esse fenômeno é definido como Efeito de Permeabilidade Aumentada (SHI *et al.*, 2017).

Dessa forma, os sistemas terapêuticos baseados em nanopartículas vem sendo cada vez mais desenvolvidos e têm demonstrado características desejáveis para o tratamento oncológico tais como uma baixa toxicidade, capacidade de liberação prolongada de drogas e direcionamento molecular da mesma (PRADOS *et al.*, 2012). Diversos materiais podem ser usados na construção dessas plataformas, que variam desde materiais inorgânicos, como nanoesferas de metais e nanotubos de carbono, até biopolímeros como moléculas de DNA e proteínas de revestimento viral, sendo esta última categoria apontada como uma das mais promissoras para construção de sistemas de entrega de fármacos (SAMANTA; MEDINTZ, 2016).

Diversos autores já demonstraram em seus trabalhos que drogas comumente utilizadas no tratamento do câncer têm sua eficiência aumentada quando carregadas em partículas de escala

nanométrica. Isso pode ser explicado pelo tamanho e o formato das nanopartículas, que fazem com que estas sejam diferencialmente interiorizadas pelas células (CHARIOU *et al.*, 2017).

Com base no exposto, o objetivo geral deste trabalho foi desenvolver uma nanopartícula biopolimérica carreadora de droga quimioterápica e avaliar sua interiorização e consequentes efeitos sobre células tumorais *in vitro*. Os polímeros escolhidos foram moléculas de DNA dupla fita e proteínas de revestimento *virus-like* e a droga carreada é o quimioterápico doxorrubicina. As características desses componentes e motivação para a escolha são apresentadas na Revisão de Literatura.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 CÂNCER

Câncer é um termo genérico para um grande grupo de doenças cuja principal característica é a rápida proliferação de células com fenótipos alterados, podendo afetar qualquer parte do corpo e até mesmo migrar para outros tecidos. Em 2018, estimou-se que cerca de 9,8 milhões de mortes foram causadas devido ao câncer, conferindo à doença o segundo lugar dentre as principais causas de morte no mundo (OPAS BRASIL, 2018).

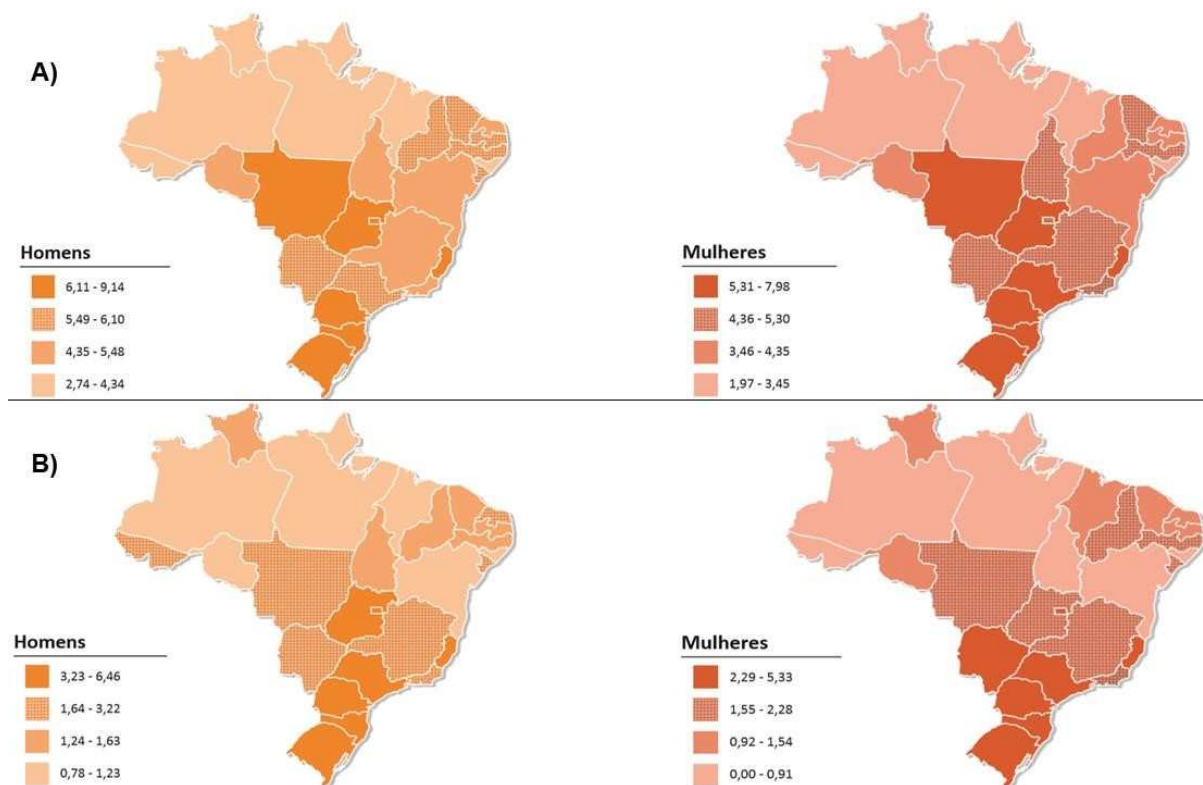
No Brasil, os tratamentos mais comuns são a quimioterapia, a radioterapia, a remoção cirúrgica e o transplante de medula óssea, sendo este último direcionado ao tratamento de leucemias e linfomas. Em muitos casos é necessário combinar mais de uma modalidade de tratamento. Estes tratamentos podem oferecer um bom prognóstico quando a detecção da doença é precoce, mas os efeitos colaterais são numerosos e praticamente inevitáveis (INCA, 2019).

A quimioterapia, especificamente, além de promover diversos sintomas físicos como efeitos colaterais, tais como queda de cabelo, prisão de ventre, feridas na boca, enjoos, vômitos e anemia, possui outros problemas associados como ausência de seletividade, acesso limitado ao tecido alvo e desenvolvimento de resistência a drogas nos tumores (WANG; LANGER; FAROKHZAD, 2012; YIN *et al.*, 2013).

Estes obstáculos são a principal causa do mau prognóstico de alguns tipos específicos de câncer. Dentre eles podemos citar o melanoma cutâneo, um dos tipos mais letais e metastáticos, cuja propensão ao desenvolvimento de resistência a quimioterápicos é alta (RATHORE *et al.*, 2019); e o glioma, que além da impossibilidade de intervenção cirúrgica,

apresenta altas taxas de retorno pós quimioterapia bem como resistência a fármacos antineoplásicos (CRUNKHORN, 2019). No Brasil, é prevista a ocorrência de 12.520 novos casos de câncer do tipo melanoma e 22.640 novos casos de câncer do tipo glioma para o biênio 2018-2019 (MINISTÉRIO DA SAÚDE (BRASIL), 2018). A incidência prevista para estes tipos de câncer, por estado brasileiro, é apresentada na figura 1.

Figura 1 - Incidência de câncer a cada 100 mil habitantes, por estado brasileiro.



A) Câncer do Sistema Nervoso Central (Gliomas inclusos); B) Câncer de pele tipo melanoma. Fonte: Ministério da Saúde, 2018.

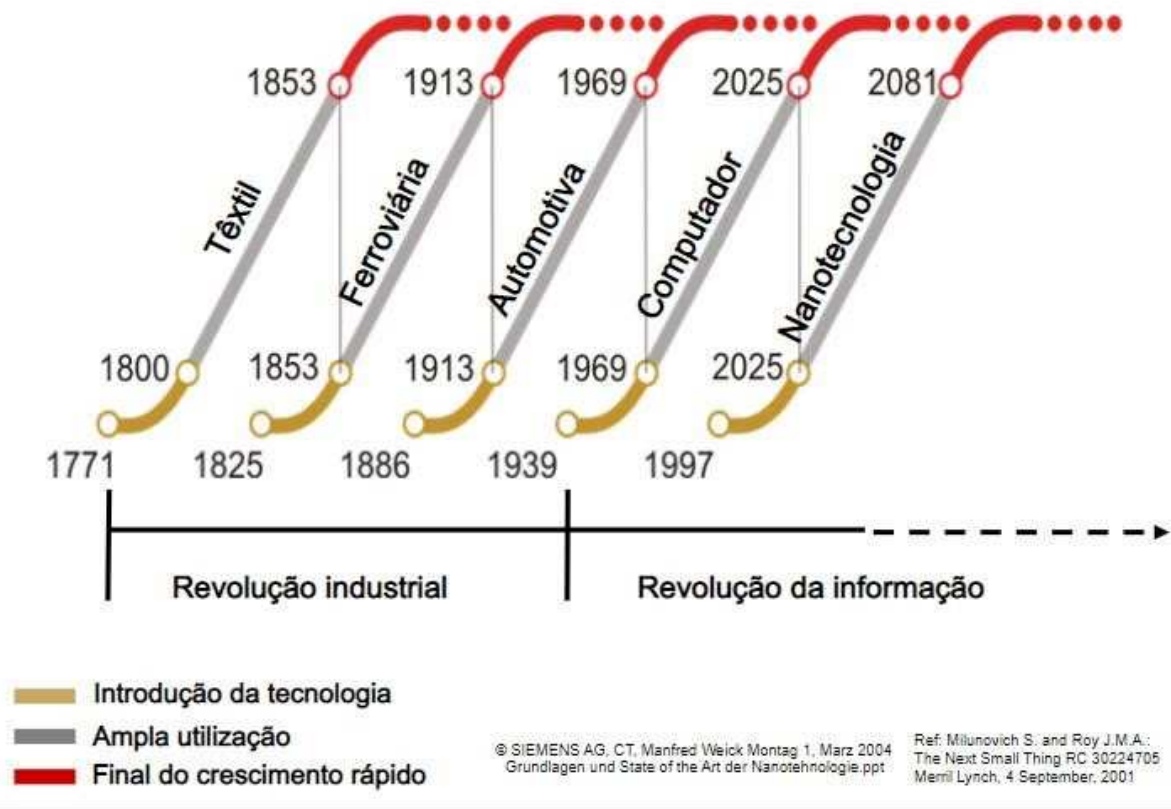
Frente a estes dados, pesquisadores de todo o mundo procuram alternativas de tratamento que eliminem ou minimizem os obstáculos da quimioterapia e uma delas é o emprego da nanotecnologia no tratamento do câncer (WANG; LANGER; FAROKHZAD, 2012).

2.2 NANOTECNOLOGIA

A nanotecnologia é apontada como a quinta força tecnológica revolucionária da história (Figura 2) e o seu uso na medicina tem aumentado cada vez mais nos últimos anos (MILUNOVICH; ROY, 2001). Na última década cerca de 57,5 bilhões de dólares foram

investidos em nanotecnologia (HAASE; LYNCH, 2018) e, até 2014, cerca de 150 drogas com base nanotecnológica já haviam sido desenvolvidas, embora algumas ainda estivessem em fase de testes. Destas, 26 já estavam regulamentadas no Brasil (ARAÚJO *et al.*, 2014).

Figura 2 - Tecnologias revolucionárias na história.

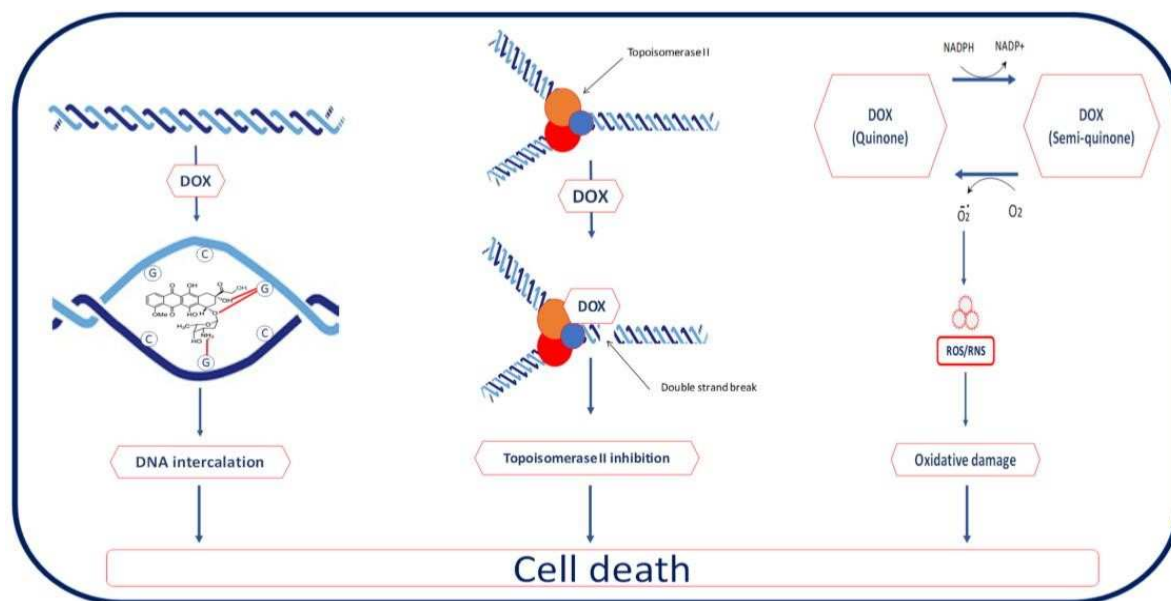


Fonte: Milunovich & Roy, 2001.

Este investimento crescente se deve, principalmente, aos resultados cada vez mais promissores obtidos pela comunidade científica. Muitos estudos têm demonstrado que, no caso do câncer, algumas drogas têm sua eficácia aumentada quando carregadas por veículos nanométricos. Isto pode ser explicado pelo aumento de citotoxicidade e direcionamento ao tecido alvo e/ou pela capacidade de se obter concentração elevada de fármaco em seu sítio de ação (ARAÚJO *et al.*, 2014).

A capacidade de carregamento de mais de uma substância em um mesmo veículo vem sendo estudada como alternativa para contornar a resistência a quimioterápicos que muitas células tumorais adquirem, fenômeno conhecido como Resistência Multi-Drogas (MDR). Alguns trabalhos já apontaram a possibilidade de carrear inibidores dos complexos de resistência junto a drogas quimioterápicas (PARHI; MOHANTY; SAHOO, 2012).

Figura 4 - Mecanismos que conferem atividade antineoplásica à doxorubicina.



Fonte: El-Agamy et al., 2019.

2.3 DOXORRUBICINA

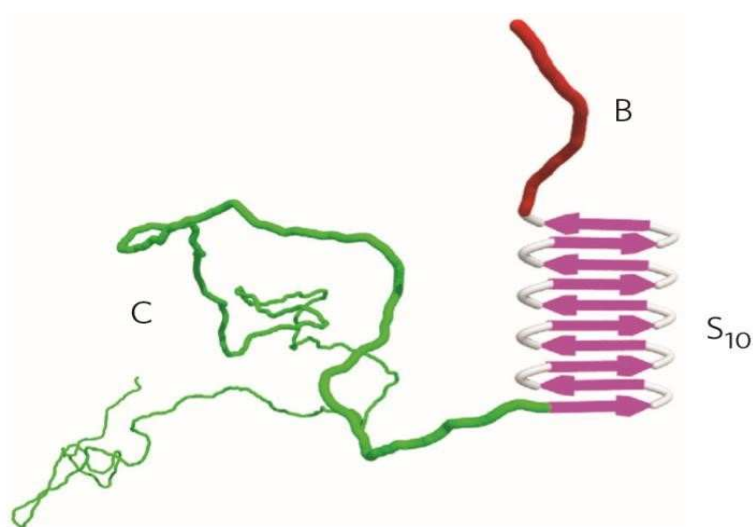
Estudos com Doxo são numerosos pelo fato de ela ser uma das mais utilizadas no tratamento quimioterápico mundial (EL-AGAMY *et al.*, 2019). No Brasil, Doxo é o composto mais utilizado para o tratamento do câncer de mama, o tipo de câncer com maior incidência na população feminina brasileira (MARTINS *et al.*, 2011; INCA, 2019). No entanto, embora apresente alta atividade antineoplásica, é pouco seletivo, o que causa danos em vários tecidos, principalmente o cardíaco (PEREIRA *et al.*, 2011).

Desta forma, alternativas que contornam tais efeitos colaterais se fazem necessárias para o emprego desta droga na quimioterapia e alguns estudos apontam o uso da nanotecnologia como uma possível solução. Na literatura já foi demonstrado, por exemplo, que Doxo carregada em nanopartículas que utilizam o capsídeo do Vírus Mosaico do Tabaco como componente carreador ofereceu maior citotoxicidade e seletividade que Doxo pura, em experimentos tanto *in vitro* e quanto *in vivo* (TIAN *et al.*, 2016).

O uso do revestimento proteico de origem viral na confecção de nanopartículas tem se mostrado promissor no carregamento de diversos fármacos. Proteínas de origem viral ou sintética que imitam a estrutura tridimensional de proteínas capsidiais são capazes de montar revestimento ao redor de ácidos nucleicos, tal como ocorre em vírus encapsulados. Um exemplo disso é a proteína C₄S₁₀K₁₂ (figura 5), um polipeptídeo sintético de cerca de 500 aminoácidos

que possui afinidade por moléculas de DNA e capacidade de automontagem ao seu redor, formando partículas denominadas *virus-like*. Estas construções protegem o ácido nucleico em seu interior da ação de endonucleases, oferecendo uma maior estabilidade fisiológica (HERNANDEZ-GARCIA *et al.*, 2014). Ademais, estudos recentes já demonstraram que nanopartículas de naturezas diversas têm sua internalização e direcionamento aumentados quando revestidas com proteínas *virus-like* (MIKKILÄ *et al.*, 2014; BIABANIKHANKAHDANI *et al.*, 2016).

Figura 5 - Estrutura tridimensional da proteína C₄S₁₀K₁₂.



A região vermelha se liga ao DNA, a região rosa promove a automontagem ao redor do ácido nucleico e a região verde é a porção carboxi terminal do peptídeo. Fonte: Hernandez-Garcia *et al.*, 2014.

O referencial teórico apresentado até agora mostra o papel crucial da nanotecnologia na medicina e deu suporte para a idealização deste trabalho: a criação de uma nanopartícula carreadora de doxorrubicina que utilize componentes biopoliméricos tais como DNA e proteínas *virus-like*. Este trabalho propõe também a avaliação dos mecanismos de endocitose e morte celular que tal construção causará sobre células tumorais, uma vez que a maneira como determinado composto induz a morte celular bem como a forma como ocorre sua entrada na célula pode esclarecer muitos aspectos acerca do sucesso de um tratamento.

2.4 MORTE CELULAR E ENDOCITOSE

A morte celular pode acontecer por mecanismos passivos ou programados. Nos mecanismos passivos não há ativação de nenhuma via de sinalização: a morte celular ocorre

devido a situações de injúria e/ou stress, o que comumente chamamos de necrose. Já os mecanismos programados ocorrem sob ativação altamente regulada de vias de sinalização específicas, sendo extremamente importantes para a manutenção da homeostase. Nesta categoria podemos citar morte celular por apoptose, necroptose, piroptose, ferroptose e autofagia. Dentre os mecanismos citados os mais estudados são a autofagia, a necrose e a apoptose (EMANUELE *et al.*, 2018).

A autofagia é um mecanismo celular que promove a digestão lisossomal do conteúdo da própria célula ocorrendo geralmente em resposta a diferentes formas de estresse celular, tais como privação de nutrientes, infecções e hipóxia. Dessa forma, sua principal função é prover nutrientes para a manutenção das funções vitais de uma célula quando esta passa por situações de estresse (DIKIC; ELAZAR, 2018).

Embora seja primeiramente considerado um mecanismo pró-sobrevivência, a autofagia pode levar células a morte. Alguns autores já demonstraram que o desbalanço nesse processo está relacionado a doenças e que tratamentos quimioterápicos podem induzir a autofagia em células tumorais (KIM *et al.*, 2012; LAHA *et al.*, 2014; CHEN *et al.*, 2018 e SIL; WONG; MARTINEZ, 2018).

O processo necrótico geralmente ocorre em resposta a algum tipo de injúria e/ou processo patológico, levando as células ao estado de turgescência extrema, culminando com o rompimento de membrana e extravasamento de conteúdo intracelular. A apoptose, por outro lado, é desencadeada por uma via de sinalização bem definida, cujo resultado é a morte celular. Neste caso, não há extravasamento de conteúdo intracelular (JOHNSON *et al.*, 2017).

O extravasamento de conteúdo intracelular libera certas moléculas que são reconhecidas pelo sistema imune como um sinal de perigo. Alguns padrões moleculares chave, tais como ATP e DNA extracelulares, são gerados com tal extravasamento e são reconhecidos pela célula, estimulando a produção de citocinas e outras moléculas pró-inflamatórias, o que mantém o sistema imune ativo e causa inflamação. Tais padrões são denominados Padrões Moleculares Associados ao Dano ou, simplesmente, DAMPs (ROCK; KONO, 2008; DING; BUCKWALTER; MARTIN, 2017).

Em um tratamento quimioterápico é desejado que a droga utilizada cause morte celular programada, evitando dessa forma respostas inflamatórias sistêmicas como efeitos colaterais.

Estudos apontam que quimioterápicos da classe das antraciclinas, da qual faz parte a doxorubicina, provocam morte por apoptose a partir da inibição da enzima topoisomerase II, que leva a dano do DNA e consequente ativação da proteína p53, uma grande responsável pela

resposta apoptótica celular (MINOTTI, 2004). Além disso, doxorrubicina é capaz de induzir o aumento nos níveis de Bax, uma proteína pró-apoptótica, o que, por consequência, leva a aumento na liberação de citocromo c da membrana mitocondrial, necessário para a resposta apoptótica. Células tratadas com doxorrubicina também apresentaram diminuição nos níveis da proteína Bcl2, cuja ação é anti-apoptótica (CHILDS *et al.*, 2002).

No entanto, uma molécula pode induzir respostas celulares diferentes quando carregada em nanopartículas, tornando necessário o estudo das vias de morte celular desencadeadas pela combinação droga/carreador. A interiorização de uma molécula contida em nanocarreadores também pode ser diferente ou até mesmo não ocorrer, o que afeta diretamente sua eficiência.

Compostos de naturezas diversas podem ser interiorizados por células por dois mecanismos gerais: mecanismos passivos, nos quais a força motriz é o gradiente eletroquímico dos compostos e não há gasto de energia no processo, e mecanismos ativos, nos quais é necessário gasto de energia da célula para a interiorização do composto (JOHNSON *et al.*, 2017).

Dentre os mecanismos ativos podemos destacar a interiorização por meio de transportadores de membrana e por meio do transporte vesicular. Esse último é especialmente denominado endocitose, que pode ainda ser dividido em processos dependentes e independentes de clatrina (JOHNSON *et al.*, 2017). Todos estes mecanismos são dependentes de energia, no entanto, por meio de qual deles determinado composto é interiorizado depende de fatores intrínsecos, como por exemplo, o tamanho dele (AKINC; BATTAGLIA, 2013).

É essencial estudar como ocorre a endocitose em células submetidas a tratamento farmacológico, pois é por meio do processo endocítico que ocorre a internalização de grande parte dos compostos exógenos. Além disso, é através dela que ocorre a interiorização de compostos cujo mecanismo de ação exige o direcionamento a compartimentos intracelulares, como o processamento lisossomal, por exemplo (AKINC; BATTAGLIA, 2013).

Principalmente porque a liberação de certas drogas carregadas por nanopartículas é mediada pela mudança de pH no ambiente celular, tal como a acidez no interior de tumores sólidos e das organelas endossomos e lisossomos (BHASKAR; LIM, 2017). Também é válido ressaltar que o direcionamento de nanopartículas aos lisossomos, embora seja crucial para a liberação de certas drogas no citoplasma, pode fazer com que este processo seja mais lento, quando comparado com a internalização de drogas não direcionadas aos lisossomos (DURBIN; PHIPPS; LIAO, 2018).

Os dados expostos mostram a importância social e científica da nanotecnologia na medicina e dão suporte para a idealização de um nanocarreador de Doxo à base de DNA com revestimento proteico *virus-like*, bem como na investigação dos mecanismos de internalização e morte celular causados por tal construção em células tumorais.

3. OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho foi desenvolver a nanopartícula Doxo-VLDP (*Virus-like DNA protein*), um nanocarreador biopolimérico de doxorubicina, baseado em DNA e proteína, bem como avaliar os seus efeitos sobre células tumorais *in vitro*.

Os objetivos específicos foram:

- 1) Avaliar a estabilidade de Doxo-VLDP em condições fisiológicas;
- 2) Avaliar a citotoxicidade de Doxo-VLDP e de seus componentes isolados em células tumorais e não-tumorais;
- 3) Avaliar o índice de seletividade celular (IS) obtido com Doxo-VLDP;
- 4) Identificar o tipo de morte celular induzido por esta construção;
- 5) Avaliar o processo de internalização celular de Doxo-VLDP;
- 6) Demonstrar a forma internalizada da Doxo-VLDP e sugerir o modo de liberação de droga para a célula tumoral.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 LINHAGENS CELULARES

Neste estudo foram utilizadas três linhagens celulares murinas: B16F10 (ATCC® CRL-6475™), derivada de melanoma de camundongo (*Mus musculus*); C6 (ATCC® CCL-107™), derivada de glioma de rato (*Rattus norvegicus*) e Melan-a (Ximbio®, 153599™), derivada de melanócitos saudáveis de camundongo (*Mus musculus*).

As três linhagens citadas são aderentes.

4.2 CONDIÇÕES DE CULTIVO

Células das linhagens C6 e B16F10 foram cultivadas em meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) alta glicose (Sigma-Aldrich[®], St. Louis, MO, USA), pH 7,2, suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB-Gibco[®] - Invitrogen), 1% de ampicilina (Sigma-Aldrich[®]), 1% de estreptomicina (Sigma-Aldrich[®]) e 0,0025% de anfotericina B (Sigma-Aldrich[®]). Células da linhagem Melan-a foram cultivadas em meio RPMI 1640 (Sigma-Aldrich[®]), pH 6,9, suplementado com 10% de SFB (Gibco[®] - Invitrogen), 1% de ampicilina (Sigma-Aldrich[®]), 1% de estreptomicina (Sigma-Aldrich[®]), 0,0025% de anfotericina B (Sigma-Aldrich[®]) e 20 nM de forbol-12-miristato-13-acetato (PMA - Sigma-Aldrich[®]).

Todas as linhagens foram crescidas em garrafas apropriadas para o cultivo de linhagens aderentes e mantidas em estufa de cultivo a 37°C, atmosfera de 5% de CO₂ e 95% de umidade relativa.

4.3 PASSAGEM CELULAR

O processo de passagem celular, que consiste em desfazer a aderência célula-célula e célula-superfície, foi realizado por meio de duas lavagens sucessivas com tampão PBS pH 7,2, seguidas da adição de 1 mL da enzima proteolítica tripsina (Sigma-Aldrich[®]) 0,25% e incubada em estufa por 5 minutos em condições padrão de crescimento. A reação foi interrompida pela adição de 2 mL de meio de cultura contendo 10% de SFB.

4.4 MONTAGEM DA NANOPARTÍCULA VLDP

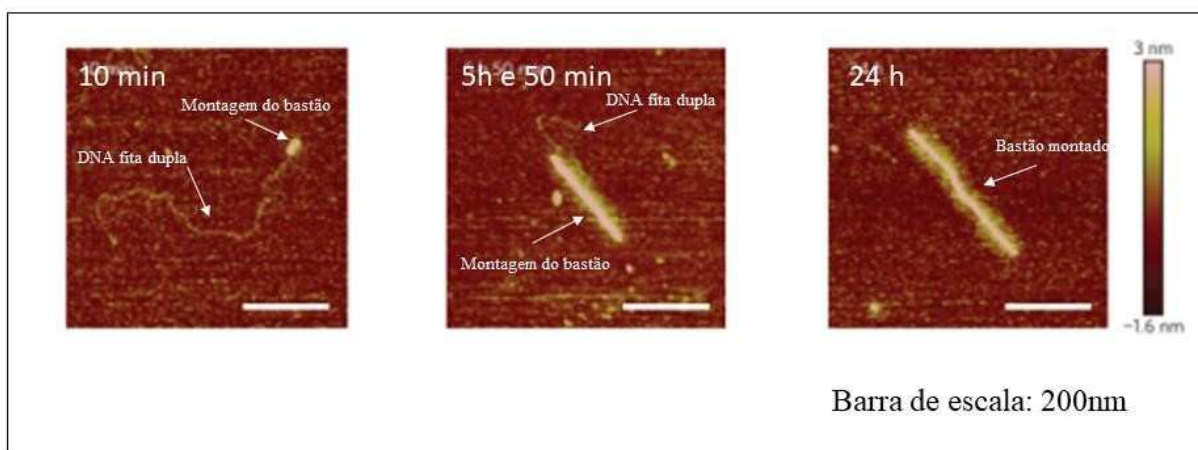
A primeira etapa de montagem da nanopartícula consistiu na intercalação da droga doxorrubicina (Sigma-Aldrich[®]) entre os pares de bases da molécula de DNA. A molécula de DNA nesta preparação possui função apenas estrutural, criando um eixo de ancoramento para as moléculas de doxorrubicina, permitindo o uso de moléculas oriundas de quaisquer indivíduos.

Para isto, em um tubo protegido da luz foram adicionados 400 ng de DNA 3000 pb (ThermoFisher[®], Vilnius, VNO, Lituânia), 19 uL de Tris-HCl 10 mM e 0,3 uL de doxorrubicina (Doxo) na concentração estoque (7,3 mM). A solução DNA-Tris-Doxo foi então incubada por

1 hora, no escuro, em temperatura ambiente. Esta etapa deve ser realizada no escuro devido à fotosensibilidade da molécula de doxorrubicina.

A segunda etapa consistiu na automontagem da nanopartícula propriamente dita. Decorrido o período de intercalação de Doxo, 150 µg/mL da proteína sintética C₄S₁₀K₁₂ (*virus like protein* - Hernandez-Garcia *et al.*, 2014) dissolvida em 0,5 µL de Tris-HCl 10mM foi adicionada a solução DNA-Tris-Doxo. A solução final foi incubada no escuro, em temperatura ambiente por 24 horas. A reação deve ocorrer como demonstrado na figura 6. (Protocolo adaptado de Hernandez-Garcia e colaboradores, 2014).

Figura 6 - Automontagem da proteína C₄S₁₀K₁₂.



Após 24h, a proteína C₄S₁₀K₁₂ monta um bastão ao redor da molécula de DNA fita dupla. Imagem de microscopia de força atômica obtida por Hernandez-Garcia *et al.*, 2014.

Afim de separar as moléculas de doxorrubicina livre da doxorrubicina intercalada e encapsulada em nanopartícula (Doxo-VLDP), a solução obtida passou pelo procedimento de gelfiltração, utilizando filtros para centrífuga Microcon[®] 3K. A etapa de separação de doxorrubicina livre na amostra foi feita por centrifugação a 10.000 rpm, por 10 minutos e a recuperação de doxo encapsulada em nanopartículas foi realizada por centrifugação a 2000 rpm, por 3 minutos.

4.5 ENSAIO DE ESTABILIDADE

Considerando a função estrutural da molécula de DNA na preparação de Doxo-VLDP a estabilidade desta molécula, nua ou encapsulada em VLDP, foi testada de duas formas. A primeira metodologia foi realizada submetendo a molécula de DNA a condições fisiológicas (37°C, pH 7,2, atmosfera de 5% de CO₂ e 95% de umidade) por diferentes tempos (0, 10, 12,

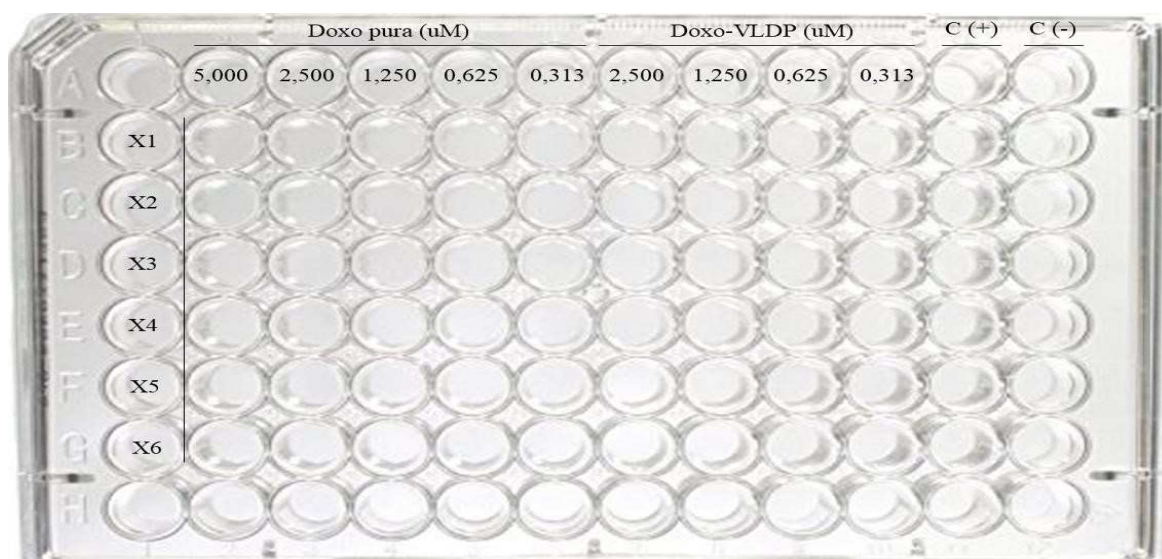
14, 15, 16, 17 e 18 horas). Na segunda metodologia, a estabilidade foi avaliada por tratamento do DNA encapsulado com a enzima DNaseI (Sigma-Aldrich®), seguindo as instruções do fabricante, nos tempos 0, 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50 e 60 minutos.

As amostras dos dois ensaios foram submetidas a eletroforese não desnaturante em gel de agarose (0,8%) e reveladas em transiluminador L-PIX (Loccus®) para visualização dos fragmentos de DNA.

4.6 ENSAIO DE CITOTOXICIDADE

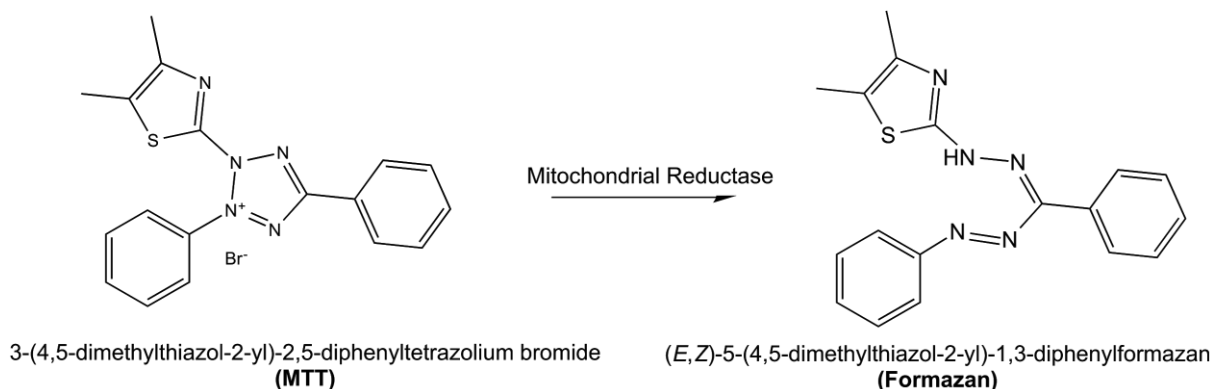
Para determinar a citotoxicidade dos componentes da nanopartícula Doxo-VLDP, foram utilizadas placas de 96 poços contendo 5×10^3 células/poço de cada uma das linhagens: B16F10, C6 e Melan-a. Separadamente foram realizados 2 ensaios: a) para testar a citotoxicidade de Doxo, pura ou carregada e, b) para testar a citotoxicidade dos componentes isolados de VLDP. Tanto as drogas quanto os componentes da nanopartícula foram diluídos em meio de cultura completo apropriado a cada linhagem celular. A maior concentração usada nos experimentos foi determinada a partir da capacidade máxima de encapsulamento da proteína $C_{4S_{10}K_{12}}$ ao redor da molécula de DNA e da capacidade máxima de intercalação das moléculas de Doxo nos fragmentos de DNA de 3000 pb (RAMOS-JUNIOR, não publicado; SILVA, 2018). As concentrações usadas e o número de repetições estão indicados nas figuras abaixo.

Figura 7 - Ensaio de citotoxicidade de Doxo pura e Doxo-VLDP.



Foram aplicadas diferentes concentrações de Doxo pura (5; 2,5; 1,25; 0,625 e 0,313 μ M) e Doxo-VLDP (2,5; 1,25; 0,625 e 0,313 μ M). Os poços do grupo C (+) receberam células, mas não receberam droga; os poços do C (-) não receberam células nem droga. Foram feitas 6 repetições de cada concentração de cada tratamento e dos grupos controles.

Figura 9 - Reação de redução da molécula de MTT à Formazan.



Fonte: Wikimedia Commons, 2014.

4.7 CÁLCULO DE VIABILIDADE CELULAR

Os valores de absorbância obtidos no espectrofotômetro foram utilizados para o cálculo da viabilidade celular dos tratamentos e controles, usando a equação:

$$\text{Viabilidade celular (\%)} = [(m\u00e9dia AT - m\u00e9dia ACN)/(m\u00e9dia ACP - m\u00e9dia ACN)] \times 100$$

onde: *m\u00e9dia AT*: m\u00e9dia dos valores de absorb\u00e2ncia do tratamento;

m\u00e9dia ACN: m\u00e9dia dos valores de absorb\u00e2ncia do controle negativo;

m\u00e9dia ACP: m\u00e9dia dos valores de absorb\u00e2ncia do controle positivo.

4.8 CÁLCULO DE ÍNDICE DE SELETIVIDADE

Para quantificar a seletividade de Doxo e VLDP sobre células tumorais em detrimento das células normais foi calculado o índice de seletividade das drogas através da equação:

$$\text{Índice de seletividade (IS)} = IC50n/IC50t$$

onde:

IC50n: Concentração de droga que mata 50% da população de células normais;

IC50t: Concentração de droga que mata 50% da população de células tumorais.

4.9 ENSAIO DE DETECÇÃO DE CÉLULAS APOPTÓTICAS E NECRÓTICAS

Para determinar o tipo de morte celular induzido por VLDP, células das linhagens B16F10 e C6 foram submetidas a citometria de fluxo após o tratamento com a nanopartícula Doxo-VLDP na concentração de 2,5 μ M.

Em placa de 6 poços foram cultivadas cerca de 1x10⁶ células/poço das linhagens C6 e B16F10. Decorrido o período de 24 horas de tratamento, as células foram tripsinizadas, transferidas para um tubo de fundo cônico de 15mL e centrifugadas em 5mL de meio de cultura a 600 rpm por 5 minutos. Descartou-se o sobrenadante e as células foram ressuspensas em 1mL de tampão PBS. O pellet obtido foi lavado em tampão Hanks e as células ressuspensas em 200 μ L de tampão Hanks.

Após esta etapa, as células foram transferidas para tubo de microcentrífuga (Eppendorf[®]) e coradas com 5 μ L de anexina V -FITC (ImunoTools[®], Friesoythe, NI, Alemanha) por 5 minutos no escuro. Posteriormente, estas foram contracoradas pela adição de 5 μ L de solução de iodeto de propídeo (Sigma-Aldrich[®]) na concentração estoque 10 μ g/mL. A contagem e análise foi realizada no Citômetro de fluxo BD FACS Verse[®].

O conhecimento das características da membrana celular de uma célula saudável é fundamental para entender a utilização da citometria de fluxo na diferenciação de células viáveis, apoptóticas e necróticas de uma população.

Células viáveis naturalmente apresentam assimetria na bicamada lipídica da membrana plasmática. Um exemplo disso é a presença do lipídeo fosfatidilserina exclusivamente na face citosólica da membrana celular. Em um evento de morte celular por apoptose, um dos primeiros eventos observados é a perda de assimetria da membrana, levando à exposição de fosfatidilserina no lado não citosólico da membrana. Esse fenômeno permite a ligação de moléculas de anexina V, proteína capaz de interagir com fosfatidilserina na presença de cálcio. Quando conjugada com o fluoróforo FITC, anexinaV pode ser detectada por citometria de fluxo, possibilitando a quantificação de células que perderam a assimetria de membrana e, por consequência, iniciaram o processo de apoptose. A detecção de células necróticas também é feita considerando características da membrana celular. Após a necrose celular, a membrana plasmática se rompe, perdendo a seletividade e permitindo a entrada de moléculas, como o iodeto de propídeo, molécula fluorescente que se liga ao DNA e também pode ser detectada por citometria. Dessa forma, considera-se células apoptóticas aquelas ligadas à anexinaV-FITC,

necróticas aquelas ligadas à iodeto de propídeo e viáveis aquelas que não se ligaram a nenhuma das moléculas (SCHUTTE *et al.*, 1998).

4.10 DETECÇÃO DE AUTOFAGIA

Para a detecção de autofagia foi escolhida a droga Monodansilcadaverina, um composto fluorescente utilizado como marcador exclusivo de vesículas autofágicas, considerando sua incapacidade de se ligar a outras organelas ácidas, como endossomos, por exemplo (BIEDERBICK, KERN & ELSÄSSER, 1995).

Cerca de 5×10^4 células da linhagem B16F10 foram cultivadas em placas de vidro de 35 mm (IBIDI®) conforme as condições de cultivo do item 4.2. Então foi adicionado Doxo ou VLDP, obtendo a concentração final de 1 μ M. Placas controle para Doxo/VLDP não receberam nenhum tipo de tratamento com droga ou nanopartícula.

Após 24h adicionou-se Monodansilcadaverina (MDC) (Sigma-Aldrich®) obtendo a concentração final de 100 μ M. Após incubação de 1h, a presença de vesículas autofágicas foi observada utilizando o microscópio de fluorescência Biostation IMq (Nikon®) sob luz com comprimentos de onda de 350 nm de excitação (ex) e emissão (em) 460 nm (Protocolo adaptado de Kim e colaboradores, 2012).

4.11 MANIPULAÇÃO DE ROTA ENDOCÍTICA

Para avaliar a rota endocítica das nanopartículas, foram escolhidas drogas que atuam inibindo as rotas dependentes e independentes de clatrina e dependente de cavéolas.

Cerca de 5×10^4 células das linhagens B16F10 e C6 foram cultivadas em placas de vidro 35mm (IBIDI®) e incubadas por 1h, conforme condições de cultivo do item 2, contendo: 1) 0,4 M de sacarose (Sigma-Aldrich®), inibidor de endocitose dependente de clatrina; ou 2) 100 μ g/ml de genisteína (Sigma-Aldrich®), inibidor de endocitose independente de clatrina ou 3) 50 μ g/ml de nistatina (Sigma-Aldrich®), inibidor de endocitose dependente de caveolina/balsas lipídicas. Placas controle não receberam nenhum tipo de tratamento com inibidores de endocitose.

Após este tempo foi adicionado Doxo ou VLDP, obtendo a concentração final de 1 μ M. A detecção de droga no interior das células foi observada utilizando microscópio de

fluorescência Biostation IMq (Nikon®) sob luz com comprimentos de onda de $\lambda_{ex}=545$ nm e $\lambda_{em}=620$ nm.

As observações foram realizadas nos tempos de 24 h, 96 h e 168 h após a adição da droga e a escolha das imagens analisadas foi feita por varredura aleatória da placa de cultivo (Protocolo adaptado de Peng e colaboradores, 2010 e He e colaboradores, 2018).

4.12 ANÁLISE DE FLUORESCÊNCIA POR DENSITOMETRIA DE IMAGEM

Considerando a intensidade de fluorescência diretamente proporcional à quantidade de vesículas autofágicas, no caso do item 4.10, e à quantidade intracelular de droga endocitada pelas células, no caso do item 4.11, esta foi quantificada através da análise do valor médio de cinza das imagens obtidas por microscopia. Para tal análise foi utilizado o software livre ImageJ®, delimitando-se as células e obtendo apenas os valores de cinza correspondentes ao conteúdo intracelular. Neste experimento cada célula/grupo celular independente foi considerada como uma repetição.

4.13 TRANSFORMAÇÃO DE ORGANELAS ÁCIDAS

As organelas da via endocítica modificam as características bioquímicas de seus conteúdos no decorrer do processo, propiciando a realização da digestão intracelular. Para avaliar tal processo foram utilizados marcadores moleculares fluorescentes específicos para as organelas endossomos e lisossomos.

Cerca de 5×10^4 células da linhagem B16F10 foram cultivadas em placas de vidro de 35 mm de espessura (IBIDI®) de acordo com item 2. O kit CellLight™ Early Endosomes-RFP, BacMam 2.0 (ThermoFisher®), foi utilizado para transformar as células com a construção da proteína Rab-5, exclusiva de membrana de endossomos primários, fazendo-a expressar Rab-5 fusionada a proteína fluorescente vermelha RFP (*red fluorescent protein*). A transformação foi realizada conforme instruções do fabricante.

4.14 CONJUGAÇÃO DE FITC A VLDP

Uma vez que a nanopartícula não pode ser acompanhada visualmente por microscopia de luz convencional, optou-se por marcar a superfície proteica da mesma com molécula

fluorescente. A nanopartícula VLDP foi conjugada ao fluoróforo verde Isotiocianato de Fluoresceína (FITC – Sigma Aldrich®) pela aplicação de FITC na concentração final de 400 ng/mL sobre a nanopartícula VLDP em tubo escuro, incubado por 10 minutos.

Decorrido este tempo, procedeu-se a gel filtração da amostra, utilizando filtros para centrífuga Microcon® 3K. A etapa de separação do FITC livre da amostra foi realizada por centrifugação a 10000 rpm, por 10 minutos. A recuperação da proteína conjugada a FITC foi obtida com a inversão do filtro e centrifugação a 2000 rpm, por 3 minutos. Neste procedimento utilizou-se microcentrífuga Eppendorf®.

4.15 AVALIAÇÃO DA SUB-LOCALIZAÇÃO CELULAR DE VLDP

Cerca de 5×10^4 células da linhagem B16F10, com endossomos expressando a proteína vermelha fluorescente (RFP) fusionada a Rab-5, foram cultivadas em placas de vidro 35 mm de espessura (IBIDI®) e tratadas com VLDP conjugada a FITC. A localização dos endossomos e da nanopartícula no interior da célula foi observada utilizando o microscópio confocal de varredura a laser LSM510 META (Zeiss®) nos comprimentos de onda ex=555nm e em=584nm, para visualização dos endossomos-RFP e ex=490nm e em=525nm, para visualização de VLDP-FITC.

4.16 ANÁLISE ESTATÍSTICAS

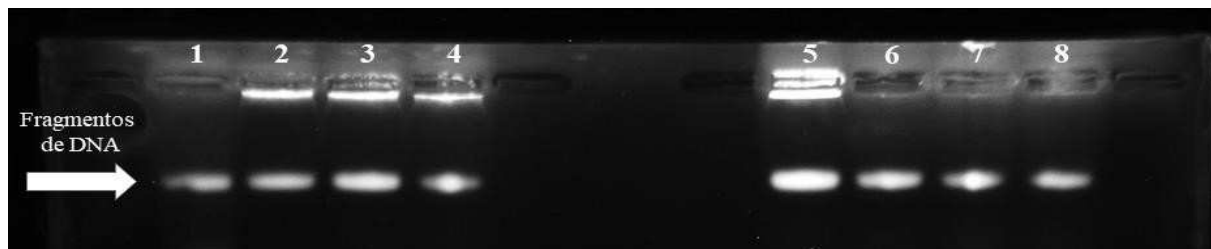
Para calcular a significância estatística entre os tratamentos foram utilizados os testes: Teste-T Student, para tratamentos pareados e ANOVA One-way, para tratamentos com 3 ou mais variáveis. Os testes de Tukey e Dunnet foram escolhidos como testes *a posteriori*. P-valores menores que 0,05 foram considerados significativos. A análise dos dados foi feita utilizando o software Graphpad Prism 5®.

5. RESULTADOS

5.1 DOXO-VLDP É ESTÁVEL EM CONDIÇÕES FISIOLÓGICAS E MAIS RESISTENTE A AÇÃO DE ENDONUCLEASES

Para averiguar se a utilização da nanopartícula em condições fisiológicas é viável em aplicações clínicas, a Doxo-VLDP foi submetida a ensaio de estabilidade, conforme descrito em Material e Métodos, item 4.5. A construção se mostrou capaz de proteger a molécula de DNA carreadora de Doxo por até 14 horas, em condições fisiológicas (37°C, pH 7,2), conforme mostra a figura 10.

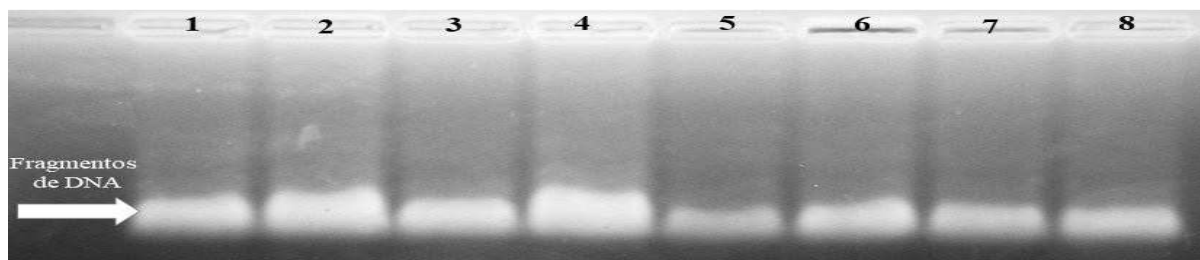
Figura 10 - Estabilidade de DNA em condições fisiológicas.



Eletroforese em gel de agarose contendo as amostras de DNA, puro ou carreado em VLDP, mantidas em condições fisiológicas nos seguintes tempos: 1) DNA puro 0h; 2) DNA puro 10h; 3) DNA puro 12h; 4) DNA puro 14h; 5) DNA-VLDP 0h; 6) DNA-VLDP 10h; 7) DNA-VLDP 12h; 8) DNA-VLDP 14h.

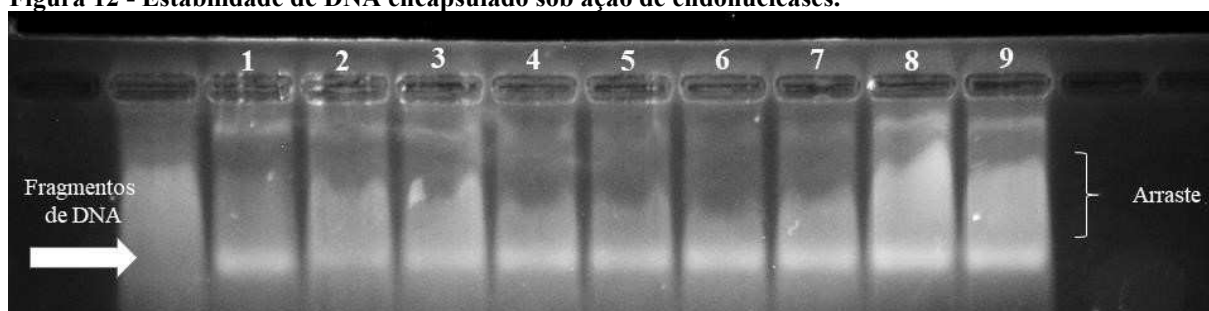
Além disso, a molécula de DNA carreadora se mostrou resistente a ação da enzima DNaseI por 60 minutos (Figuras 11 e 12). Segundo o fabricante, o tempo de degradação das moléculas de DNA sob ação da enzima é, em média, 15 minutos.

Figura 11 - Estabilidade de DNA puro sob ação de endonucleases.



Eletroforese em gel de agarose contendo as amostras de DNA puro sob ação da enzima DNaseI nos seguintes tempos: 1) 5 min; 2) 10 min; 3) 15 min; 4) 20 min; 5) 30 min; 6) 40 min; 7) 50 min; 8) 60 min.

Figura 12 - Estabilidade de DNA encapsulado sob ação de endonucleases.

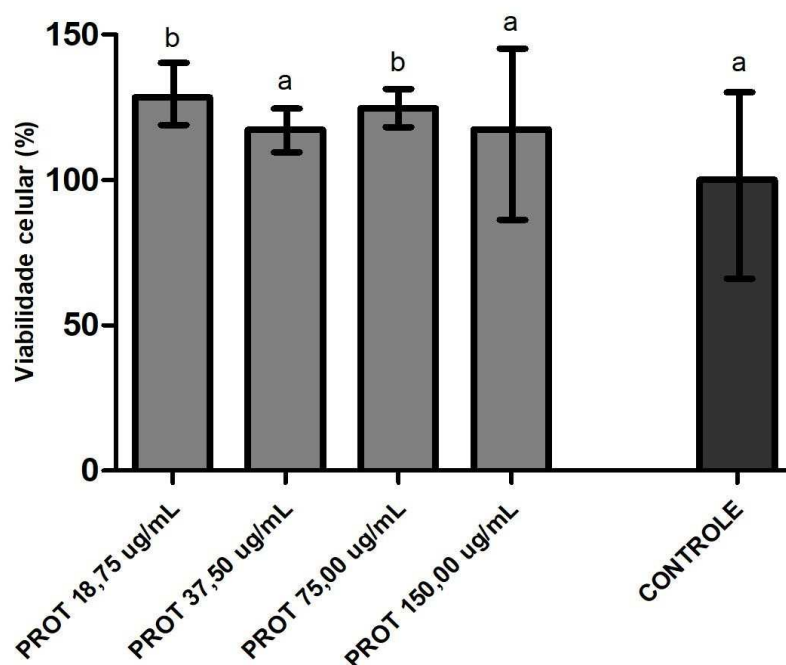


Eletroforese em gel de agarose contendo as amostras de DNA carreado em VLDP sob ação da enzima DNaseI nos seguintes tempos: 1) 0 min; 2) 5 min; 3) 10 min; 4) 15 min; 5) 20 min; 6) 30 min; 7) 40 min; 8) 50 min; 9) 60 min.

5.2 A PROTEÍNA C₄S₁₀K₁₂ NÃO APRESENTA TOXICIDADE CELULAR

Para verificar possível toxicidade de Doxo-VLDP sobre células tumorais em cultura, foram realizados ensaios de citotoxicidade, descritos nos itens 4.6 a 4.8 do tópico Material e Métodos. O primeiro deles demonstrou que proteína auto montável C₄S₁₀K₁₂, utilizada no revestimento de Doxo-VLDP, não é capaz de matar células da linhagem B16F10. Como mostra a Figura 13, grupos de células tratados com a proteína pura, em diferentes concentrações, apresentaram viabilidade celular superior à do grupo não tratado.

Figura 13 - Viabilidade celular das células B16F10 após exposição à proteína C₄S₁₀K₁₂.



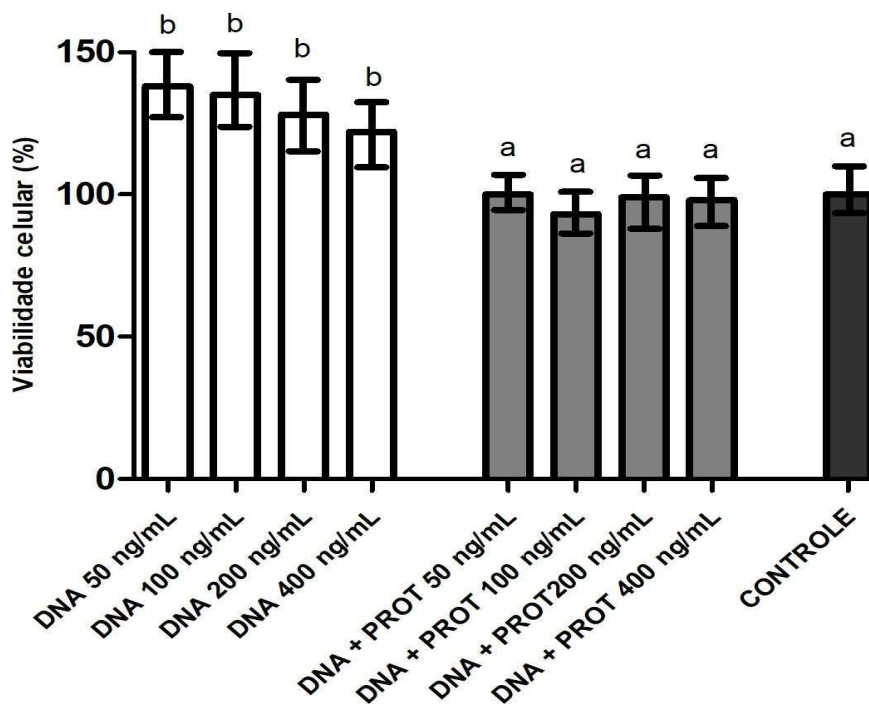
Após 60 h de tratamento, a viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio de MTT e leitura realizada em espectrofotômetro a 570 nm. Barras representam o desvio padrão de uma quintuplicata. Letras diferentes representam diferença estatística entre tratamentos (p -valor <0,05; *One-way* ANOVA, Teste de Dunnet).

5.3 A MOLÉCULA DE DNA DA CONSTRUÇÃO DOXO-VLDP NÃO APRESENTA TOXICIDADE CELULAR

Uma vez comprovada a inexistência de toxicidade do revestimento proteico de Doxo-VLDP, um segundo ensaio de citotoxicidade foi realizado para avaliar a toxicidade da molécula de DNA carreadora de droga. Nas concentrações utilizadas na montagem de Doxo-VLDP, a molécula de DNA não foi capaz de matar células da linhagem B16F10 quando administrada na

forma livre, tampouco quando administrada junto com a proteína de revestimento C₄S₁₀K₁₂, conforme exposto na figura 14.

Figura 14 - Viabilidade celular das células B16F10 após exposição à molécula de DNA pura ou revestida pela proteína C₄S₁₀K₁₂

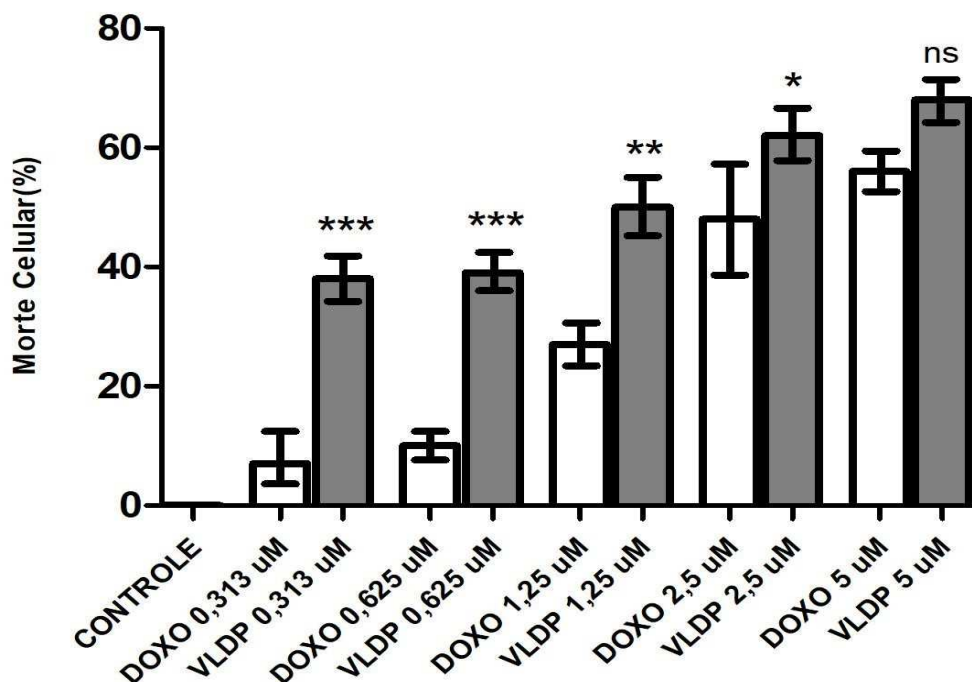


Após 60 h de tratamento, a viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio de MTT e leitura realizada em espectrofotômetro a 570 nm. Barras representam o desvio padrão de uma triplicata. Letras diferentes representam diferença estatística entre tratamentos (p -valor <0,05; *One-way* ANOVA, Teste de Dunnet).

5.4 A NANOPARTÍCULA DOXO-VLDP AUMENTA A TOXICIDADE DE DOXORRUBICINA

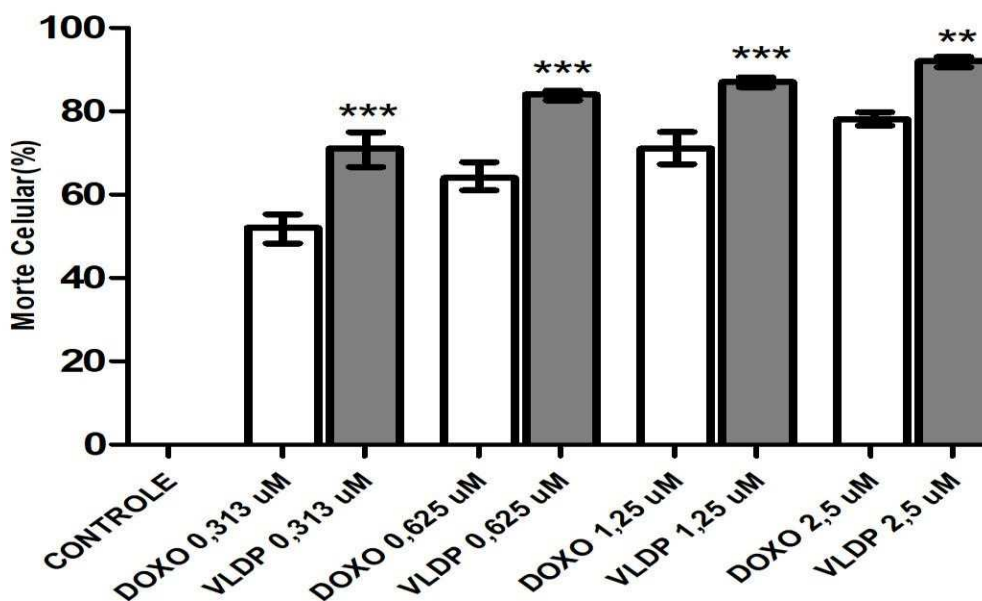
Considerando que os componentes de revestimento e carregamento da nanopartícula não são tóxicos, um último ensaio de toxicidade foi realizado com o objetivo de testar a ação da construção completa (proteína C₄S₁₀K₁₂ + DNA + Doxo). Em concentrações similares, a nanopartícula Doxo-VLDP matou mais células tumorais em cultura do que Doxo pura, como demonstrado nas figuras 15 e 16.

Figura 15 - Viabilidade celular das células B16F10 após exposição à Doxo pura e Doxo-VLDP.



Após 60h de tratamento, a viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio de MTT e leitura realizada em Leitor de Elisa a 570nm. Barras representam o desvio padrão de uma quintuplicata. Asteriscos representam diferença estatística entre os tratamentos Doxo e Doxo-VLDP em concentrações iguais (* p -valor <0,05, ** p -valor <0,01, *** p -valor <0,001; *One-way* ANOVA, Teste de Tukey).

Figura 16 - Viabilidade celular das células C6 após exposição à Doxo pura e Doxo-VLDP.

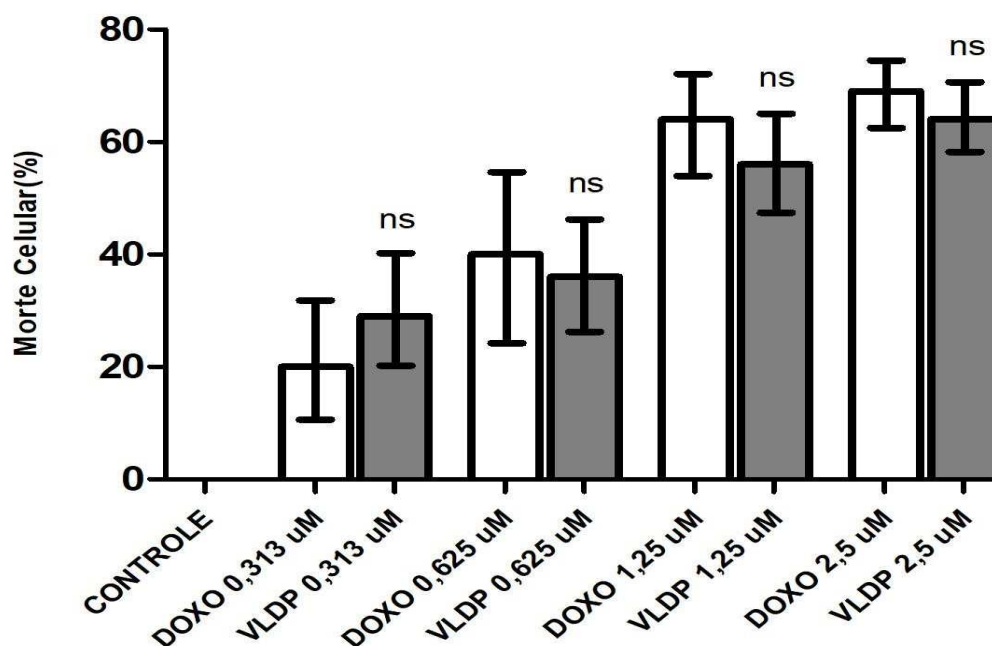


Após 60 h de tratamento, a viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio de MTT e leitura realizada em Leitor de Elisa a 570nm. Barras representam o desvio padrão de uma sextuplicata. Asteriscos representam diferença estatística entre tratamentos os tratamentos Doxo e Doxo-VLDP em concentrações iguais (* p -valor <0,05, ** p -valor <0,01, *** p -valor <0,001; *One-way* ANOVA, Teste de Tukey).

5.5 DOXO-VLDP APRESENTA DISCRETA SELETIVIDADE

Ensaio de citotoxicidade utilizando a linhagem celular Melan-A demonstraram que o comportamento de Doxo-VLDP é um pouco diferente em células normais em cultura: as taxas de morte celular não apresentaram diferenças em relação ao tratamento com doxorubicina pura, como mostra a figura abaixo (figura 17):

Figura 17 - Viabilidade celular das células Melan-A após exposição à Doxo pura e Doxo-VLDP.



Após 60h de tratamento, a viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio de MTT e leitura realizada em Leitor de Elisa a 570nm. Barras representam o desvio padrão de uma sextuplicata. Asteriscos representam diferença estatística entre tratamentos os tratamentos Doxo e Doxo-VLDP em concentrações iguais (* p -valor <0,05, ** p -valor <0,01, *** p -valor <0,001; *One-way* ANOVA, Teste de Tukey).

Assim sendo, a seletividade da construção para cada linhagem foi mensurada com base na concentração mínima necessária para matar 50% das células de uma população, denominada IC_{50} . Os valores de IC_{50} encontrados mostram que, em células tumorais, é possível diminuir a concentração de Doxo carreada e ter o mesmo desempenho obtido com concentrações mais altas de Doxo pura ao passo que, em células normais, observamos o contrário. Isto sugere um aumento de seletividade conferido pela montagem da nanopartícula. A tabela 1 mostra os valores de IC_{50} e índices de seletividade (IS) de doxorubicina pura e carreada em Doxo-VLDP, nas duas linhagens tumorais.

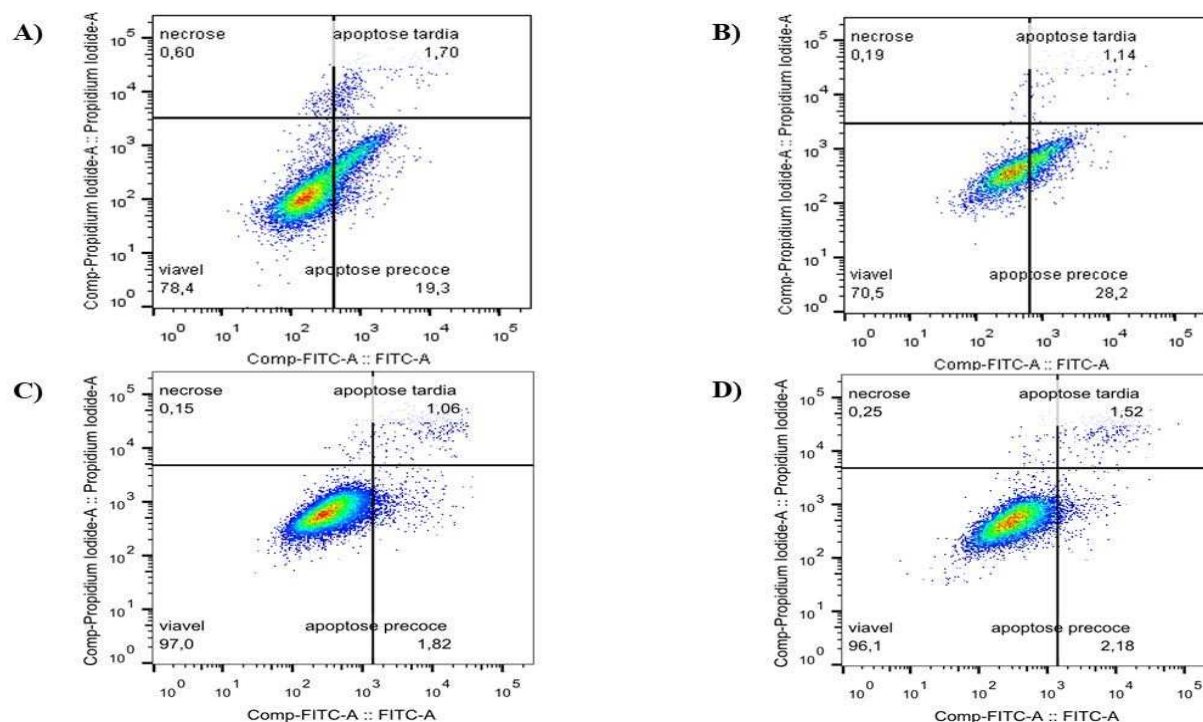
Tabela 1: IC₅₀ e Índice de seletividade (IS) de Doxo pura e Doxo-VLDP em células tumorais e normais.

LINHAGEM	IC ₅₀ DOXO (μM)	IS DOXO	IC ₅₀ VLDP (μM)	IS VLDP
Normal (Melan-A)	0,97 ± 0,46	-	1,06 ± 0,59	-
Melanoma (B16F10)	3,45 ± 1,40	0,28	1,19 ± 0,41	0,89
Glioma (C6)	0,39 ± 0,07	2,49	0,13 ± 0,02	8,15

5.6 DOXO-VLDP INDUZ A MORTE DE CÉLULAS TUMORAIS POR APOPTOSE

A toxicidade de Doxo-VLDP sobre células tumorais foi confirmada por meio de citometria de fluxo. Por essa metodologia foi possível também averiguar que, após 24 horas de tratamento com Doxo-VLDP na concentração de 2,5 μM, células da linhagem B16F10 e C6 ativam, ambas, a via de morte celular programada por apoptose (figura 18).

Figura 18 - Determinação do tipo de morte celular induzida por citometria de fluxo.

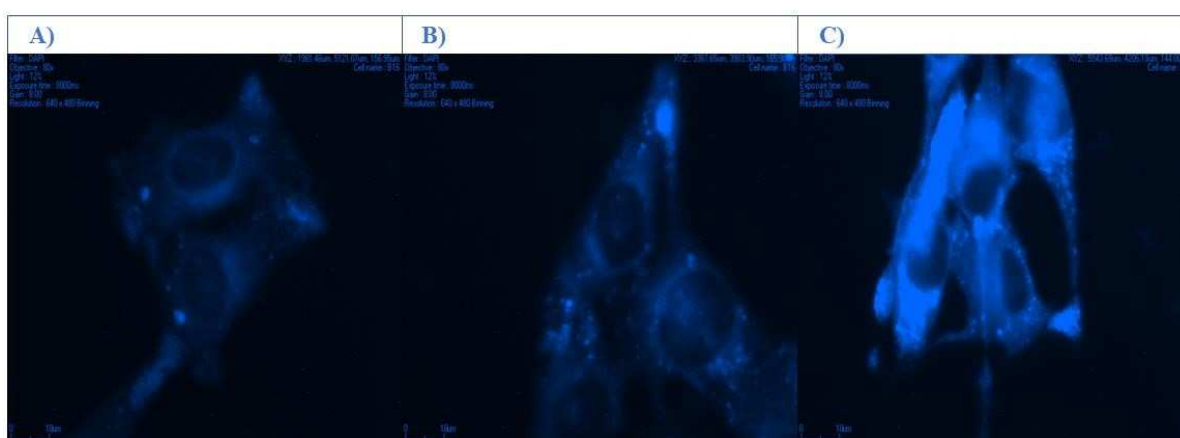


Células das linhagens B16F10 e C6 foram tratadas com Doxo-VLDP na concentração de 2,5 μM e após 24h de tratamento foi feita a detecção de células apoptóticas e necróticas por citometria de fluxo: A) Células de melanoma (B16) não tratadas (grupo controle); B) Células de melanoma (B16F10) tratadas; C) Células de glioma (C6) não tratadas (grupo controle); D) Células de glioma (C6) tratadas.

5.7 DOXO-VLDP INDUZ AUTOFAGIA EM CÉLULAS TUMORAIS

Para averiguar uma possível relação entre mecanismos de morte e mecanismos pró-sobrevivência celular, procedeu-se um ensaio de detecção de autofagia. Observações em microscópio de fluorescência sugerem que os grupos de células tratados com Doxo ou Doxo-VLDP, na concentração de $1\mu\text{M}$, apresentam um maior número de vesículas autofágicas que o grupo não tratado, como demonstra a figura 19.

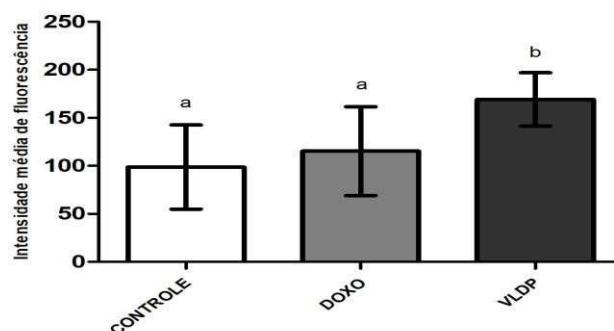
Figura 19 - Micrografia de vesículas autofágicas em microscopia de fluorescência



Células B16F10 foram tratadas com Monodansilcadaverina (MDC) na concentração de $100\mu\text{M}$: A) Grupo controle (sem droga); B) Grupo tratado com Doxo $1\mu\text{M}$ e C) Grupo tratado com VLDP $1\mu\text{M}$. Imagens obtidas nos comprimentos de onda $\text{ex}=350\text{ nm}$ e $\text{em}=460\text{ nm}$; aumento de $80\times$.

De fato, a intensidade de fluorescência mensurada, por densitometria, no interior das células tratadas com Doxo-VLDP é superior à mensurada no interior das células não tratadas (figura 20).

Figura 20 - Determinação da autofagia por análise densitométrica de vesículas autofágicas fluorescentes.



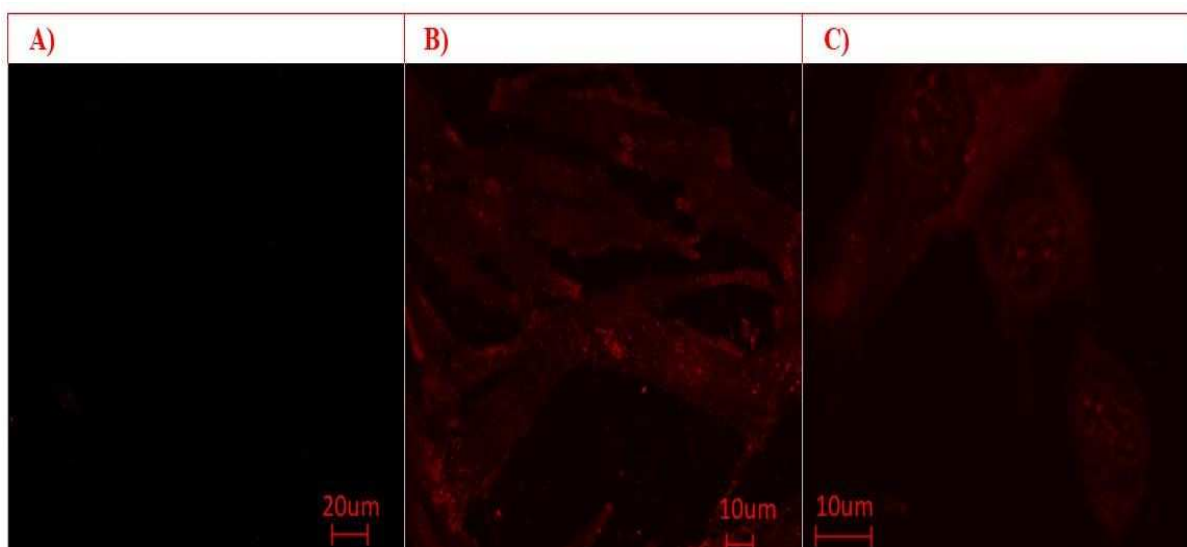
As imagens foram obtidas em microscópio de fluorescência e analisadas no software ImageJ. Barras representam o desvio padrão de dezoito repetições. Letras diferentes representam diferença estatística entre tratamentos (p -valor $<0,05$; *One-way* ANOVA, Teste de Dunnet).

5.8 A CONSTRUÇÃO DOXO-VLDP PERMITE A ENTRADA DE DOXORRUBICINA NO INTERIOR DAS CÉLULAS

Uma vez determinada a capacidade citotóxica da construção, bem como os mecanismos de morte celular desencadeados por ela, foram realizados diversos ensaios para investigar se Doxo-VLDP era capaz de ser internalizada pelas células tumorais desencadeando internamente os danos já mencionados.

Imagens de microscopia de fluorescência confirmaram que, após 12 h de tratamento, células tratadas com a nanopartícula Doxo-VLDP apresentam Doxorubicina livre em seu conteúdo celular, como mostra a figura 21. Células tratadas com a forma pura de Doxo, em concentrações similares, foram utilizadas como controle positivo na observação.

Figura 21 - Visualização de doxorubicina intracelular por microscopia confocal após 12h de tratamento.

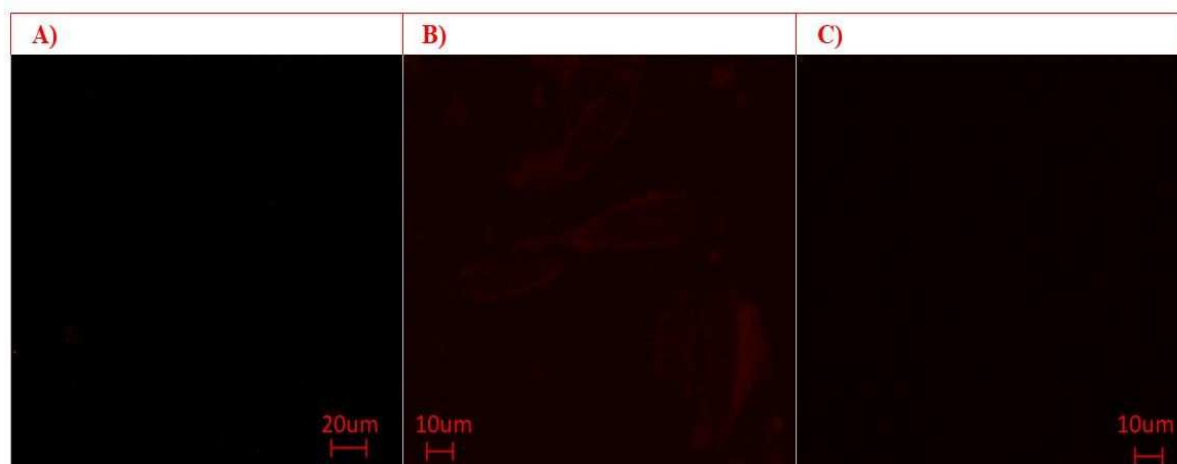


Células B16F10 foram tratadas com doxorubicina na concentração 2,5 μM , 12h antes da visualização: A) Grupo controle (sem droga); B) Grupo tratado com Doxo pura 2,5 μM e C) Grupo tratado com Doxo-VLDP 2,5 μM . Imagens obtidas nos comprimentos de onda $\text{ex}=480\text{ nm}$ e $\text{em}=592\text{ nm}$; aumentos de 20x e 40x.

5.9 A ENTRADA DE DOXORRUBICINA NAS CÉLULAS É ATRASADA QUANDO CARREADA EM VLDP

Também por meio de microscopia de fluorescência, foi observado que, em um intervalo de 3h, já era possível a detecção de doxorubicina no interior de células tratadas com Doxo pura, ao passo que, em células tratadas com Doxo-VLDP tal visualização não era possível (figura 22).

Figura 22 - Visualização de doxorubicina intracelular por microscopia confocal após 3h de tratamento.

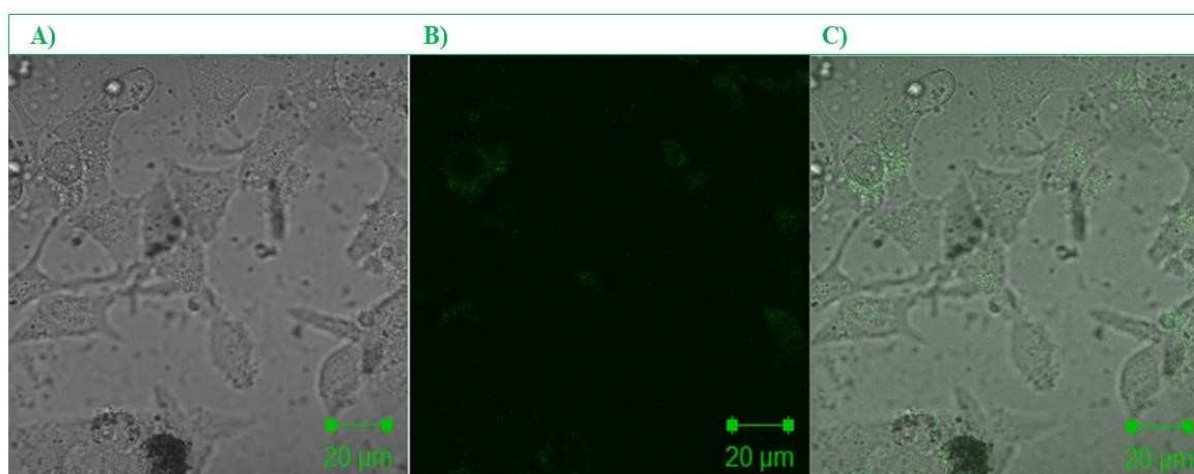


Células B16F10 foram tratadas com doxorubicina na concentração 2,5 μM , 3h antes da visualização: A) Grupo controle (sem droga); B) Grupo tratado com Doxo pura 2,5 μM e C) Grupo tratado com Doxo-VLDP 2,5 μM . Imagens obtidas nos comprimentos de onda $\text{ex}=480\text{ nm}$ e $\text{em}=592\text{ nm}$; aumentos de 20x e 40x.

5.10 A NANOPARTÍCULA VLDP É INTERIORIZADA ANTES DE LIBERAR SEU CONTEÚDO NO CITOSOL

A fim de averiguar se a nanopartícula VLDP entra intacta nas células ou se ela libera seu conteúdo na matriz extracelular antes que este seja interiorizado, a proteína de revestimento C₄S₁₀K₁₂ foi conjugada com o fluoróforo FITC. Como mostra a figura 23, após 1 hora de tratamento é possível visualizar a nanopartícula no interior das células.

Figura 23 - Visualização de VLDP conjugada a FITC por microscopia confocal.



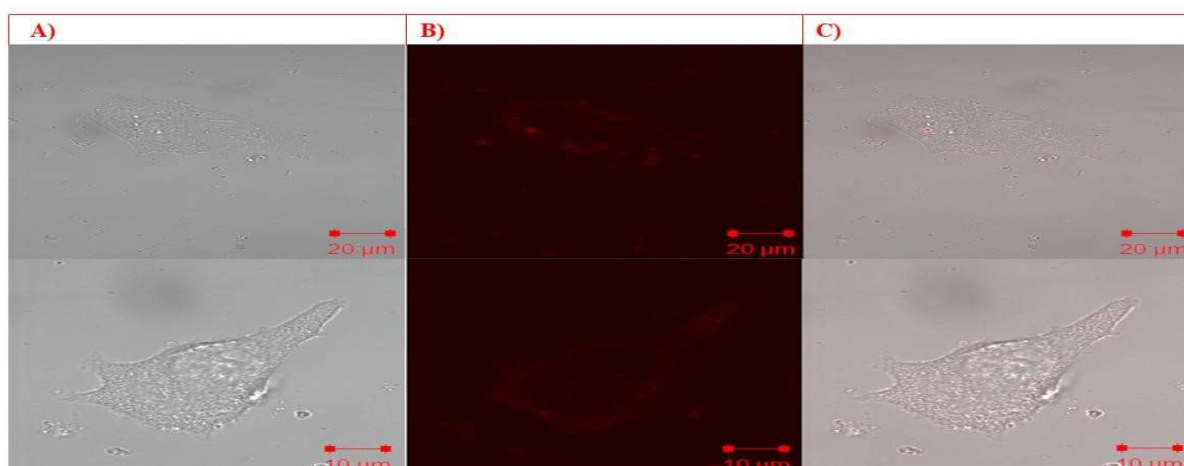
Células B16F10 foram tratadas com Doxo-VLDP-FITC na concentração 2,5 μM , 1h antes da visualização: A) Campo claro; B) Campo com fluorescência e C) Campo com imagens A e B sobrepostas. Imagens obtidas nos comprimentos de onda $\text{ex}=490\text{ nm}$ e $\text{em}=525\text{ nm}$; aumento de 40x.

5.11 DOXO-VLDP É CO-LOCALIZADA COM ENDOSSOMOS PRIMÁRIOS

O atraso na liberação de Doxo no interior das células, quando carregada, levantou também a hipótese de que a nanopartícula Doxo-VLDP necessitasse de processamento em organelas de degradação, tais como endossomos e lisossomos, para enfim liberar o seu conteúdo no citosol. Para avaliar esta possibilidade, células foram transformadas, de modo que a membrana dos endossomos primários expressassem a proteína vermelha fluorescente RFP.

Observações em microscópio confocal mostraram que as células da linhagem B16F10 possuem endossomos primários, localizados preferencialmente na região próxima à membrana plasmática, como demonstra a figura 24.

Figura 24 - Confirmação da transformação da linhagem B16F10 por visualização de endossomos primários na microscopia confocal.



Células B16F10 foram transformadas para expressar a proteína vermelha fluorescente RFP na membrana dos endossomos primários. A) Campo claro; B) Campo com fluorescência e C) Sobreposição das imagens A) e B). Imagens obtidas nos comprimentos de onda $\lambda_{ex}=555$ nm e $\lambda_{em}=584$ nm; aumentos de 40x e 80x.

5.12 DOXO-VLDP ENTRA NAS CÉLULAS POR TRANSPORTE MEDIADO POR VESÍCULAS

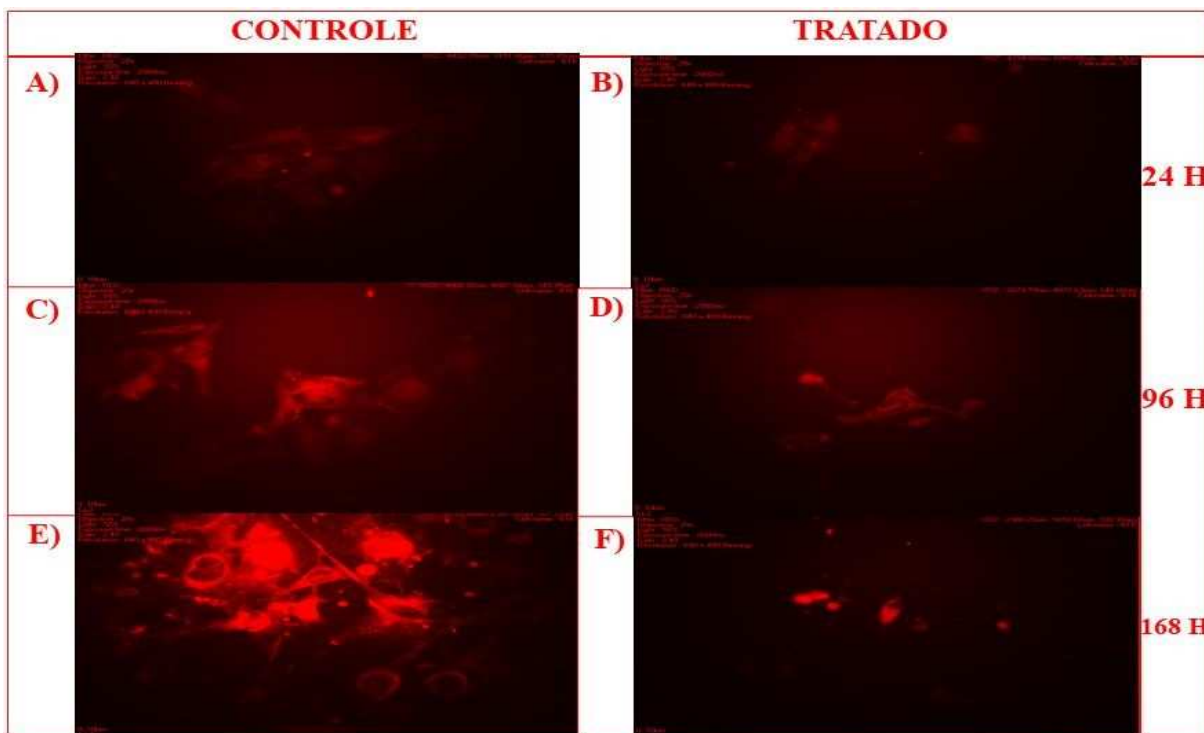
O atraso na liberação de Doxo no conteúdo intracelular levantou a hipótese de que a nanopartícula Doxo-VLDP poderia ser interiorizada pelas células por mecanismos diferentes dos conhecidos em células tratadas por Doxo pura. Frezard & Garnier-Suillero (1990) e Speelman (1994) já demonstraram que Doxorubicina, em condições fisiológicas, alcança o interior das células pelo mecanismo passivo de difusão através da membrana plasmática.

Para desvendar os mecanismos envolvidos na interiorização de Doxo-VLDP, foram realizados ensaios de manipulação de rota endocítica empregando três inibidores de endocitose: 1) Sacarose: inibe a endocitose mediada por vesículas revestidas de clatrina; 2) Nistatina: inibe a endocitose mediada por balsas lipídicas e caveolina; 3) Genisteína: inibe a atividade de enzimas tirosina-quinases, indispensáveis em mecanismos de endocitose independentes de clatrina.

Como demonstrado nas figuras 25 a 30, os três inibidores testados interferiram na capacidade das células de interiorizar Doxo carregada na nanopartícula, o que sugere que a entrada de Doxo-VLDP nas células da linhagem B16F10 depende de mecanismos ativos de transporte, tais como endocitose dependente e independente de clatrina. No entanto o uso dos mesmo inibidores endocíticos apresentaram pouco ou nenhum efeito na quantidade de doxorrubicina intracelular sobre as células da linhagem C6, como mostra as figuras 29 a 34.

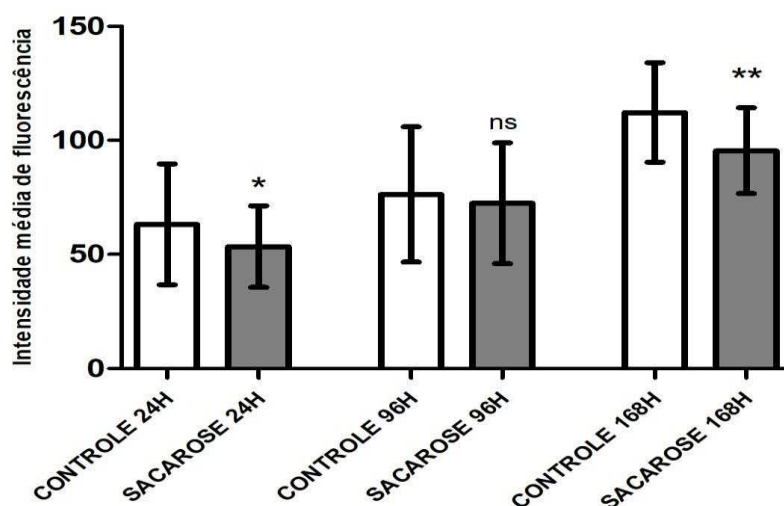
As figuras 25 a 36 também sugerem que há um aumento gradativo na internalização de Doxo ao longo do tempo em ambas as linhagens.

Figura 25 - Visualização de doxorubicina intracelular em células B16F10 tratadas com Doxo-VLDP e Sacarose.



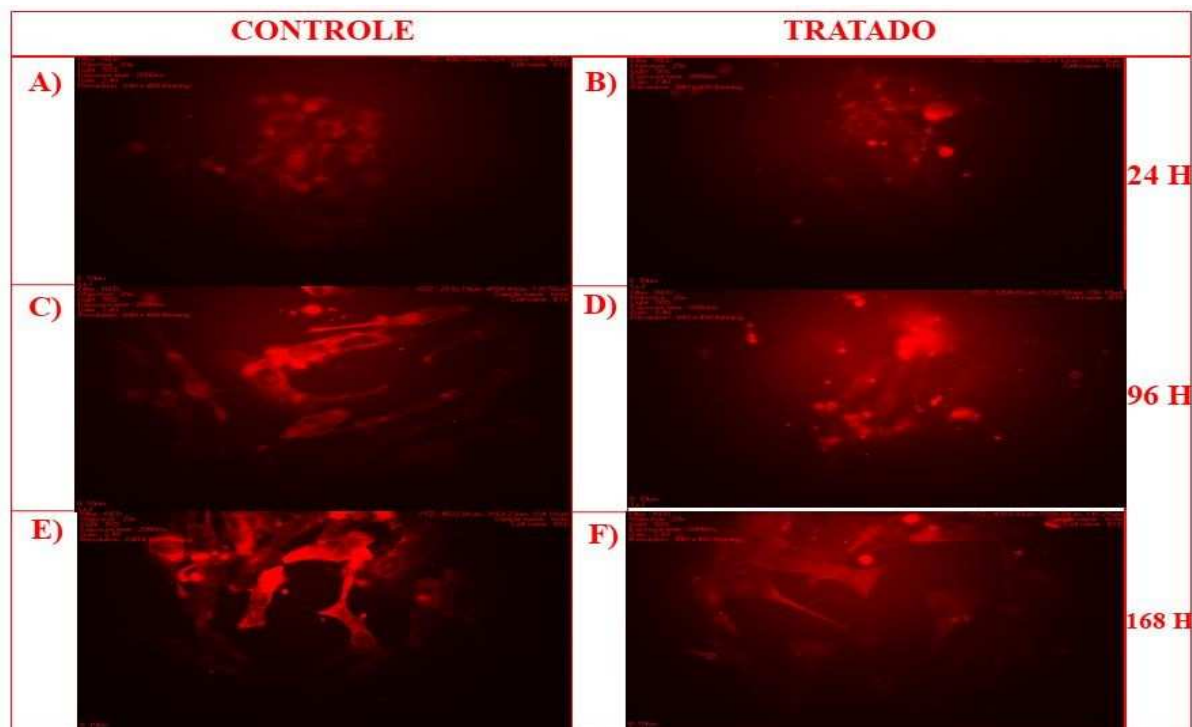
Células da linhagem B16F10 foram tratadas com o inibidor de endocitose Sacarose na concentração de 0,4M e com a nanopartícula Doxo-VLDP na concentração de 1 μ M. As células foram visualizadas em microscópio de fluorescência em tempos distintos: A) Grupo controle (sem sacarose), 24h; B) Grupo tratado, 24h; C) Grupo controle (sem sacarose), 96h; D) Grupo tratado, 96h; E) Grupo controle (sem sacarose), 168h; F) Grupo tratado, 168h. Imagens obtidas nos comprimentos de onda $\text{ex}=545$ nm e $\text{em}=620$ nm; aumento de 20x.

Figura 26 - Determinação da endocitose de Doxo-VLDP em células B16F10 tratadas com Sacarose.



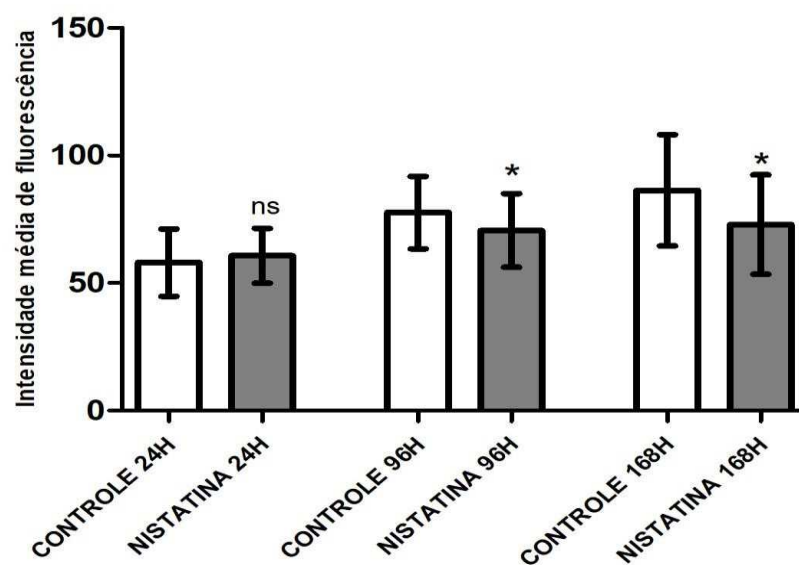
Células da linhagem B16F10 foram tratadas com o inibidor de endocitose Sacarose na concentração de 0,4M e com a nanopartícula Doxo-VLDP na concentração de 1 μ M. A quantificação da fluorescência foi feita através de análise densitométrica. As imagens foram obtidas em microscópio de fluorescência e analisadas no software ImageJ. Barras representam o desvio padrão de nove repetições. Asteriscos representam diferença estatística entre o grupo controle e o grupo tratado (* p -valor <0,05, ** p -valor <0,01, *** p -valor <0,001; ns-não significativo; Teste-T Student).

Figura 27 - Visualização de doxorrubicina intracelular em células B16F10 tratadas com Doxo-VLDP e Nistatina.



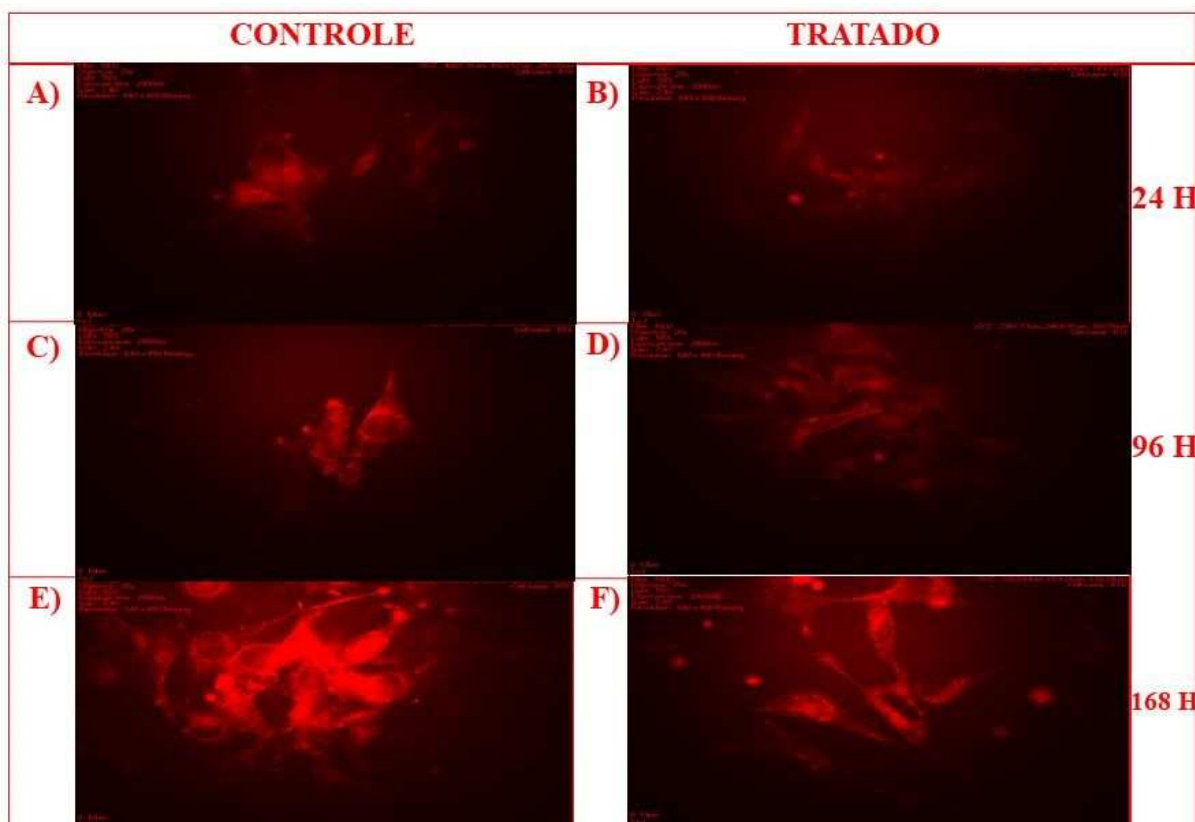
Células da linhagem B16F10 foram tratadas com o inibidor de endocitose Nistatina na concentração de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e com a nanopartícula Doxo-VLDP na concentração de 1 μM . As células foram visualizadas em microscópio de fluorescência em tempos distintos: A) Grupo controle (sem nistatina), 24h; B) Grupo tratado, 24h; C) Grupo controle (sem nistatina), 96h; D) Grupo tratado, 96h; E) Grupo controle (sem nistatina), 168h; F) Grupo tratado, 168h. Imagens obtidas nos comprimentos de onda $\text{ex}=545\text{ nm}$ e $\text{em}=620\text{ nm}$; aumento de 20x.

Figura 28 - Determinação da endocitose de Doxo-VLDP em células B16F10 tratadas com Nistatina.



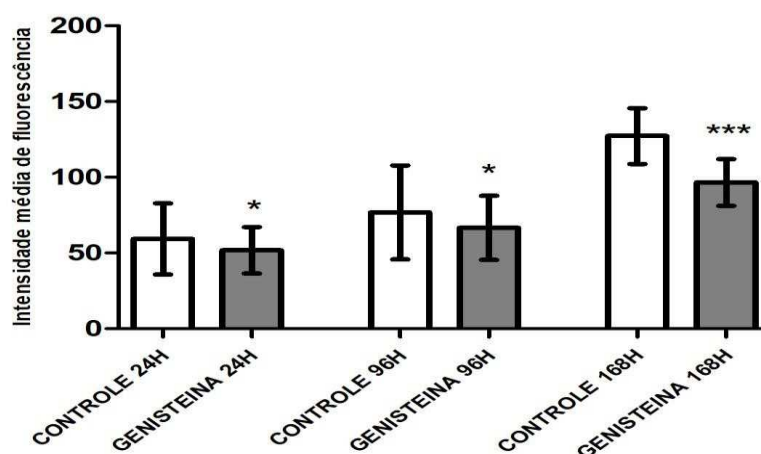
Células da linhagem B16F10 foram tratadas com o inibidor de endocitose Nistatina na concentração de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e com a nanopartícula Doxo-VLDP na concentração de 1 μM . A quantificação da fluorescência foi feita através de análise densitométrica. As imagens foram obtidas em microscópio de fluorescência e analisadas no software ImageJ. Barras representam o desvio padrão de nove repetições. Asteriscos representam diferença estatística entre tratamentos (* p -valor $<0,05$, ** p -valor $<0,01$, *** p -valor $<0,001$; ns-não significativo; Teste-T Student).

Figura 29 - Visualização de doxorubicina intracelular em células B16F10 tratadas com Doxo-VLDP e Genisteína.



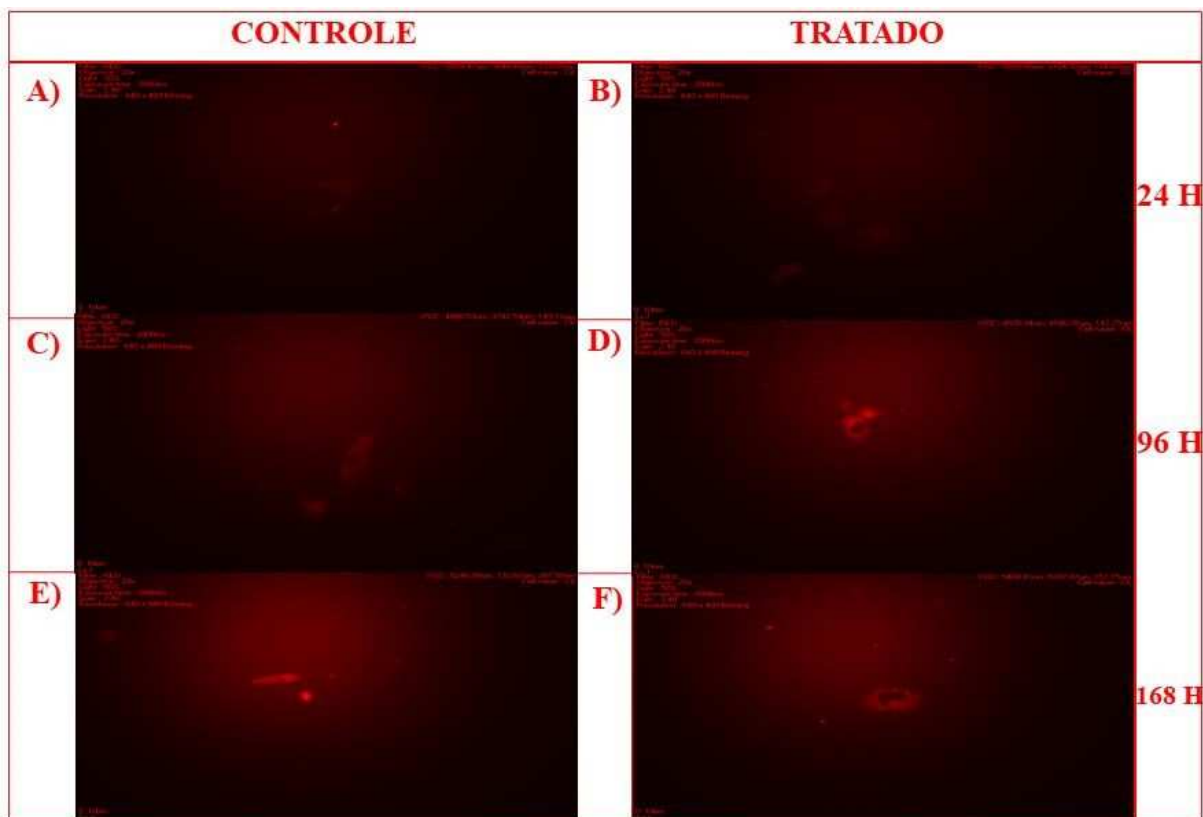
Células da linhagem B16F10 foram tratadas com o inibidor de endocitose Genisteína na concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$ e com a nanopartícula Doxo-VLDP na concentração de 1 μM . As células foram visualizadas em microscópio de fluorescência em tempos distintos: A) Grupo controle (sem genisteína), 24h; B) Grupo tratado, 24h; C) Grupo controle (sem genisteína), 96h; D) Grupo tratado, 96h; E) Grupo controle (sem genisteína), 168h; F) Grupo tratado, 168h. Imagens obtidas nos comprimentos de onda $\text{ex}=545\text{ nm}$ e $\text{em}=620\text{ nm}$; aumento de 20x.

Figura 30 - Determinação da endocitose de Doxo-VLDP em células B16F10 tratadas com Genisteína.



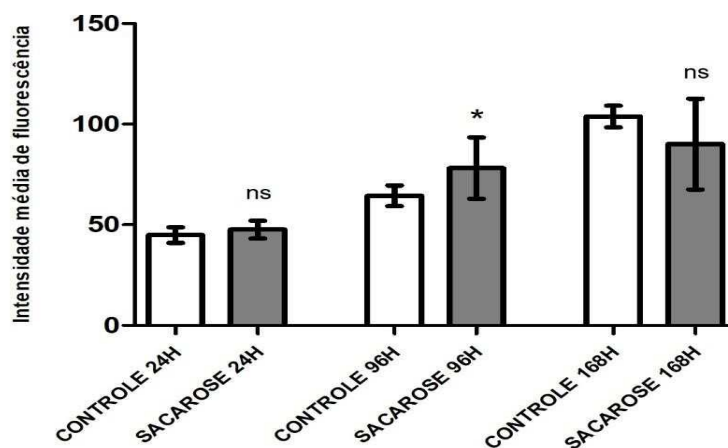
Células da linhagem B16F10 foram tratadas com o inibidor de endocitose Genisteína na concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$ e com a nanopartícula Doxo-VLDP na concentração de 1 μM . A quantificação da fluorescência foi feita através de análise densitométrica. As imagens foram obtidas em microscópio de fluorescência e analisadas no software ImageJ. Barras representam o desvio padrão de nove repetições. Asteriscos representam diferença estatística entre o grupo controle e o grupo tratado (* p -valor <0,05, ** p -valor <0,01, *** p -valor <0,001; ns-não significativo; Teste-T Student).

Figura 31 - Visualização de doxorrubicina intracelular em células C6 tratadas com Doxo-VLDP e Sacarose.



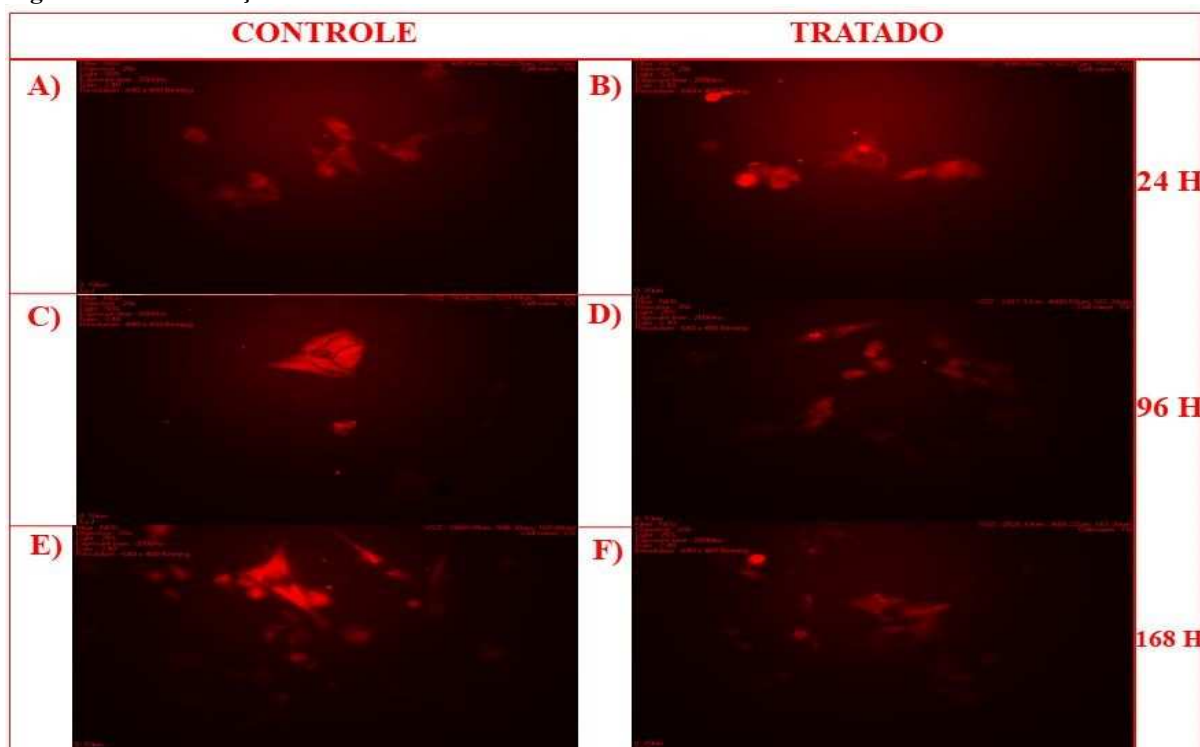
Células da linhagem C6 foram tratadas com o inibidor de endocitose Sacarose na concentração de 0,4M e com a nanopartícula Doxo-VLDP na concentração de 1 μ M. As células foram visualizadas em microscópio de fluorescência em tempos distintos: A) Grupo controle (sem sacarose), 24h; B) Grupo tratado, 24h; C) Grupo controle (sem sacarose), 96h; D) Grupo tratado, 96h; E) Grupo controle (sem sacarose), 168h; F) Grupo tratado, 168h. Imagens obtidas nos comprimentos de onda $\text{ex}=545$ nm e $\text{em}=620$ nm; aumento de 20x.

Figura 32 - Determinação da endocitose de Doxo-VLDP em células C6 tratadas com Sacarose.



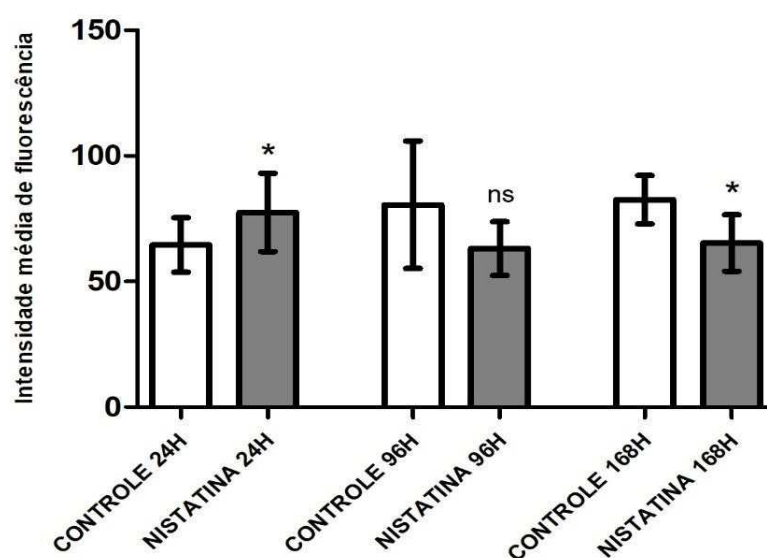
Células da linhagem C6 foram tratadas com o inibidor de endocitose Sacarose na concentração de 0,4M e com a nanopartícula Doxo-VLDP na concentração de 1 μ M. A quantificação da fluorescência foi feita através de análise densitométrica. As imagens foram obtidas em microscópio de fluorescência e analisadas no software ImageJ. Barras representam o desvio padrão de nove repetições. Asteriscos representam diferença estatística entre o grupo controle e o grupo tratado (* p -valor <0,05, ** p -valor <0,01, *** p -valor <0,001; ns-não significativo; Teste-T Student).

Figura 33 - Visualização de doxorubicina intracelular em células C6 tratadas com Doxo-VLDP e Nistatina.



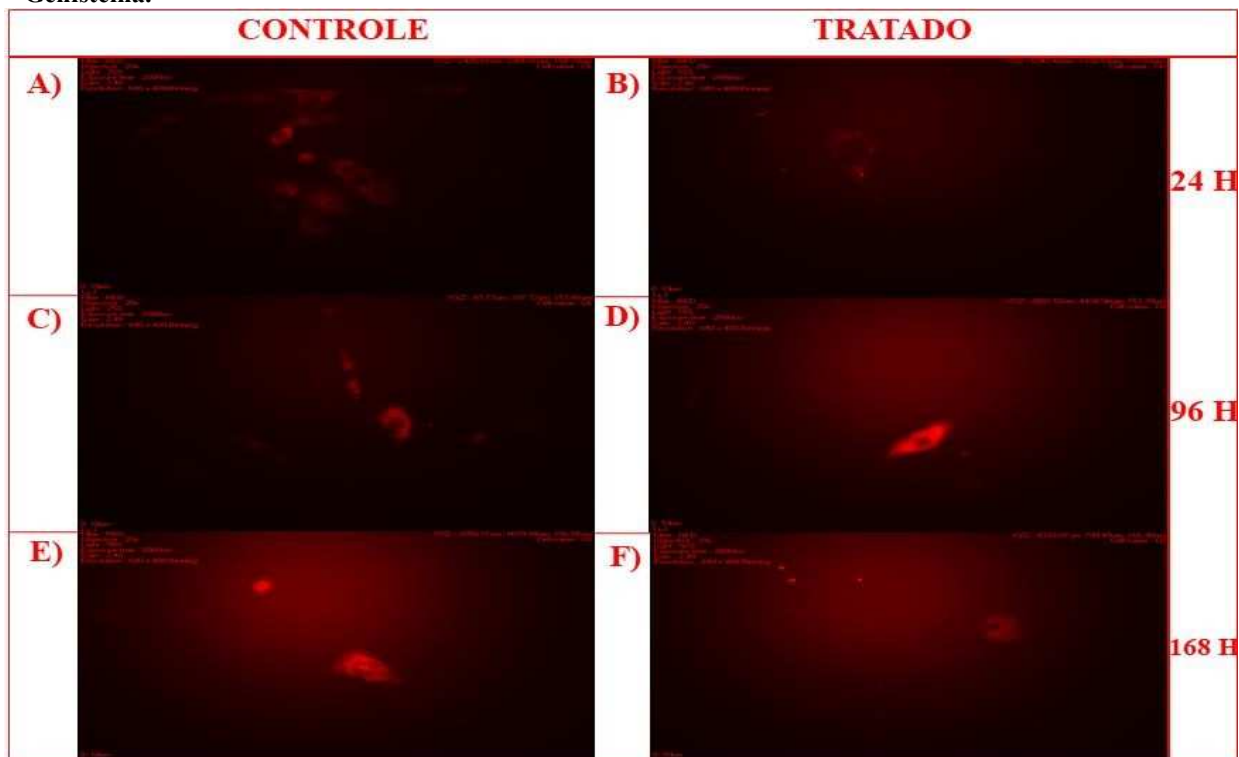
Células da linhagem C6 foram tratadas com o inibidor de endocitose Nistatina na concentração de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e com a nanopartícula Doxo-VLDP na concentração de 1 μM . As células foram visualizadas em microscópio de fluorescência em tempos distintos: A) Grupo controle (sem nistatina), 24h; B) Grupo tratado, 24h; C) Grupo controle (sem nistatina), 96h; D) Grupo tratado, 96h; E) Grupo controle (sem nistatina), 168h; F) Grupo tratado, 168h. Imagens obtidas nos comprimentos de onda $\text{ex}=545\text{ nm}$ e $\text{em}=620\text{ nm}$; aumento de 20x.

Figura 34 - Determinação da endocitose de Doxo-VLDP em células C6 tratadas com Nistatina.



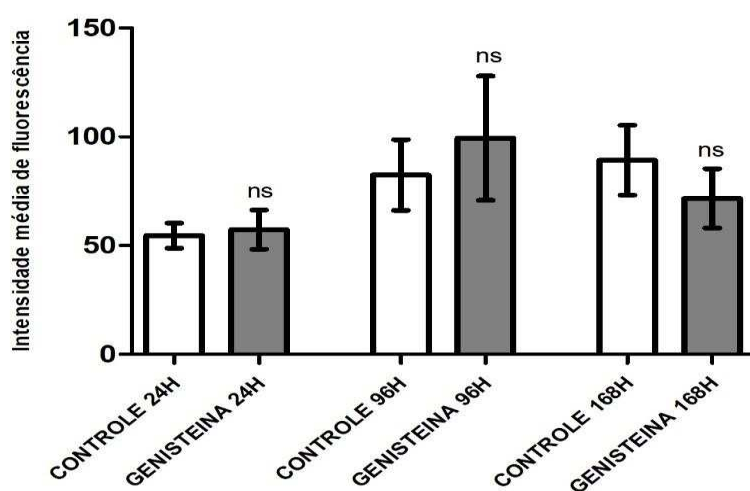
Células da linhagem C6 foram tratadas com o inibidor de endocitose Nistatina na concentração de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e com a nanopartícula Doxo-VLDP na concentração de 1 μM . A quantificação da fluorescência foi feita através de análise densitométrica. As imagens foram obtidas em microscópio de fluorescência e analisadas no software ImageJ. Barras representam o desvio padrão de nove repetições. Asteriscos representam diferença estatística entre o grupo controle e o grupo tratado (* p -valor < 0,05, ** p -valor < 0,01, *** p -valor < 0,001; ns-não significativo; Teste-T Student).

Figura 35 - Visualização de doxorubicina intracelular em células C6 tratadas com Doxo-VLDP e Genisteína.



Células da linhagem C6 foram tratadas com o inibidor de endocitose Genisteína na concentração de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e com a nanopartícula Doxo-VLDP na concentração de 1 μM . As células foram visualizadas em microscópio de fluorescência em tempos distintos: A) Grupo controle (sem genisteína), 24h; B) Grupo tratado, 24h; C) Grupo controle (sem genisteína), 96h; D) Grupo tratado, 96h; E) Grupo controle (sem genisteína), 168h; F) Grupo tratado, 168h. Imagens obtidas nos comprimentos de onda $\text{ex}=545 \text{ nm}$ e $\text{em}=620 \text{ nm}$; aumento de 20x.

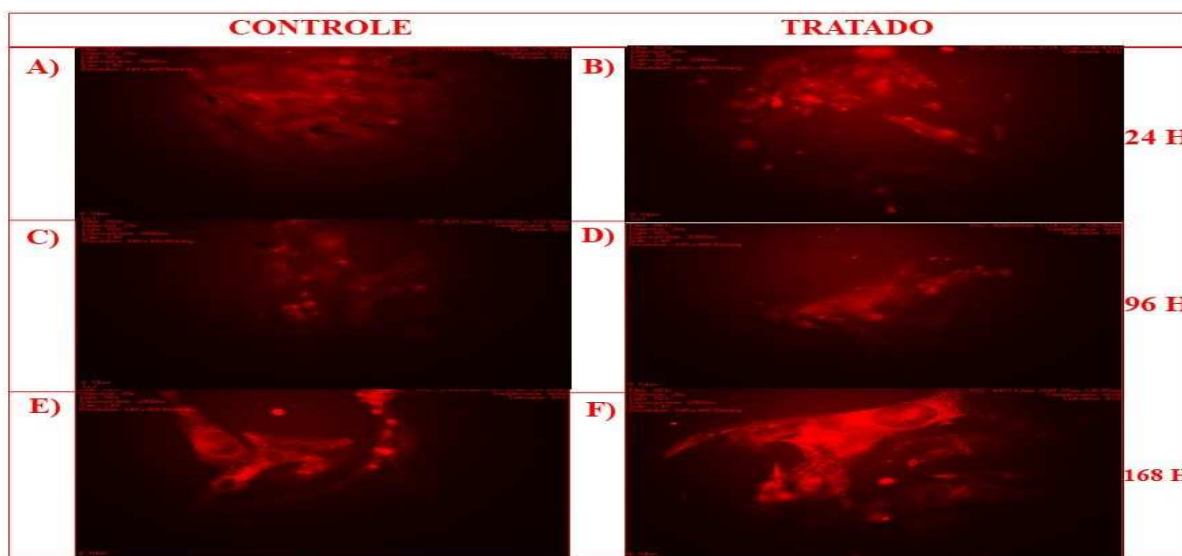
Figura 36 - Determinação da endocitose de Doxo-VLDP em células C6 tratadas com Genisteína.



Células da linhagem C6 foram tratadas com o inibidor de endocitose Genisteína na concentração de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e com a nanopartícula Doxo-VLDP na concentração de 1 μM . A quantificação da fluorescência foi feita através de análise densitométrica. As imagens foram obtidas em microscópio de fluorescência e analisadas no software ImageJ. Barras representam o desvio padrão de nove repetições. Asteriscos representam diferença estatística entre o grupo controle e o grupo tratado (* p -valor $<0,05$, ** p -valor $<0,01$, *** p -valor $<0,001$; ns-não significativo; Teste-T Student).

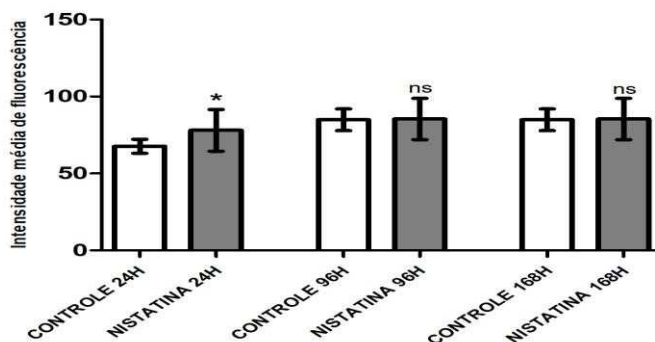
Curiosamente, como mostram as figuras 37 a 40, a inibição dos mecanismos de endocitose independente de clatrina também apresentaram efeitos de diminuição da capacidade de entrada de Doxo pura nas células, o que sugere que Doxorubicina livre possa não utilizar apenas mecanismos passivos de transporte para ser interiorizada pelas células. Já a inibição da endocitose dependente de clatrina não diminuiu a capacidade de entrada de Doxo livre nas células, como demonstrado nas figuras 41 e 42.

Figura 37 - Visualização de doxorubicina intracelular em células B16F10 tratadas com Doxo pura e Nistatina.



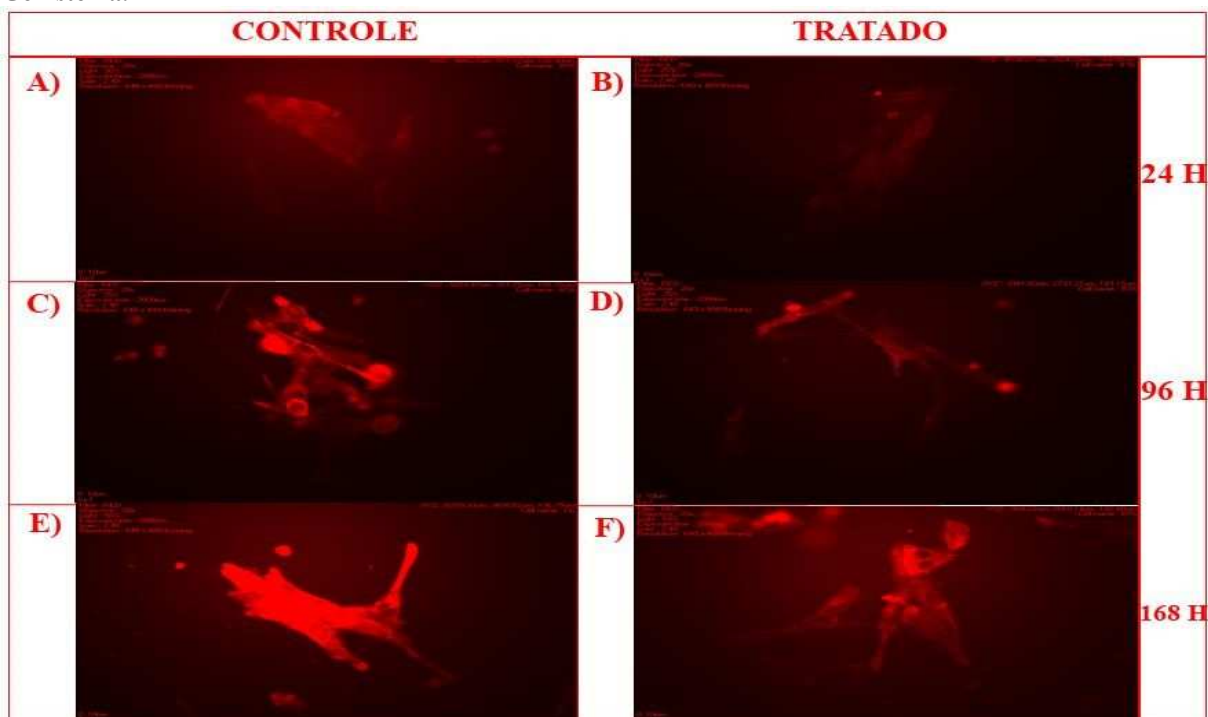
Células da linhagem B16F10 foram tratadas com o inibidor de endocitose Nistatina na concentração de 50 ug/mL e com Doxo pura na concentração de 1 uM. As células foram visualizadas em microscópio de fluorescência em tempos distintos: A) Grupo controle (sem nistatina), 24h; B) Grupo tratado, 24h; C) Grupo controle (sem nistatina), 96h; D) Grupo tratado, 96h; E) Grupo controle (sem nistatina), 168h; F) Grupo tratado, 168. Imagens obtidas nos comprimentos de onda $\lambda_{ex}=545$ nm e $\lambda_{em}=620$ nm; aumento de 20x.

Figura 38 - Determinação da endocitose de Doxo pura em células B16F10 tratadas com Nistatina.



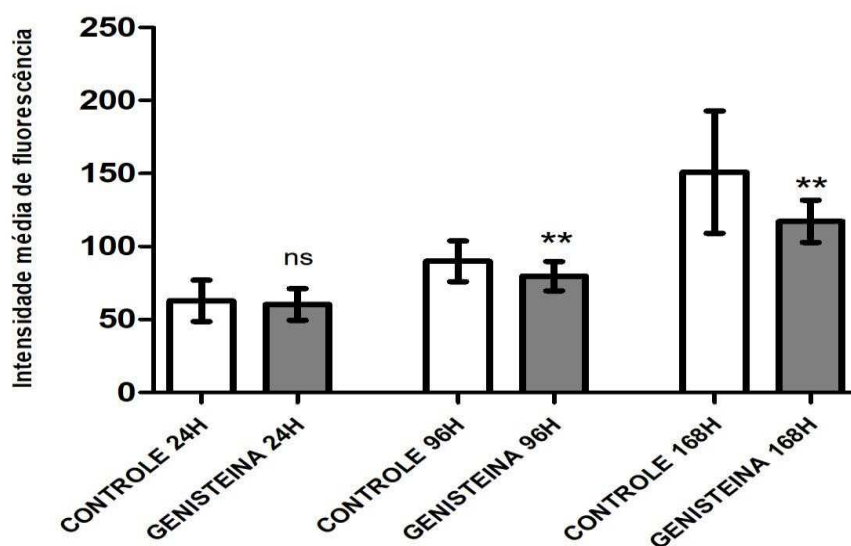
Células da linhagem B16F10 foram tratadas com o inibidor de endocitose Nistatina na concentração de 50 ug/mL e com Doxo pura na concentração de 1 uM. A quantificação da fluorescência foi feita através de análise densitométrica. As imagens foram obtidas em microscópio de fluorescência e analisadas no software ImageJ. Barras representam o desvio padrão de nove repetições. Asteriscos representam diferença estatística entre o grupo controle e o grupo tratado (* p -valor <0,05, ** p -valor <0,01, *** p -valor <0,001; ns-não significativo; Teste-T Student).

Figura 39 - Visualização de doxorubicina intracelular em células B16F10 tratadas com Doxo pura e Genisteína.



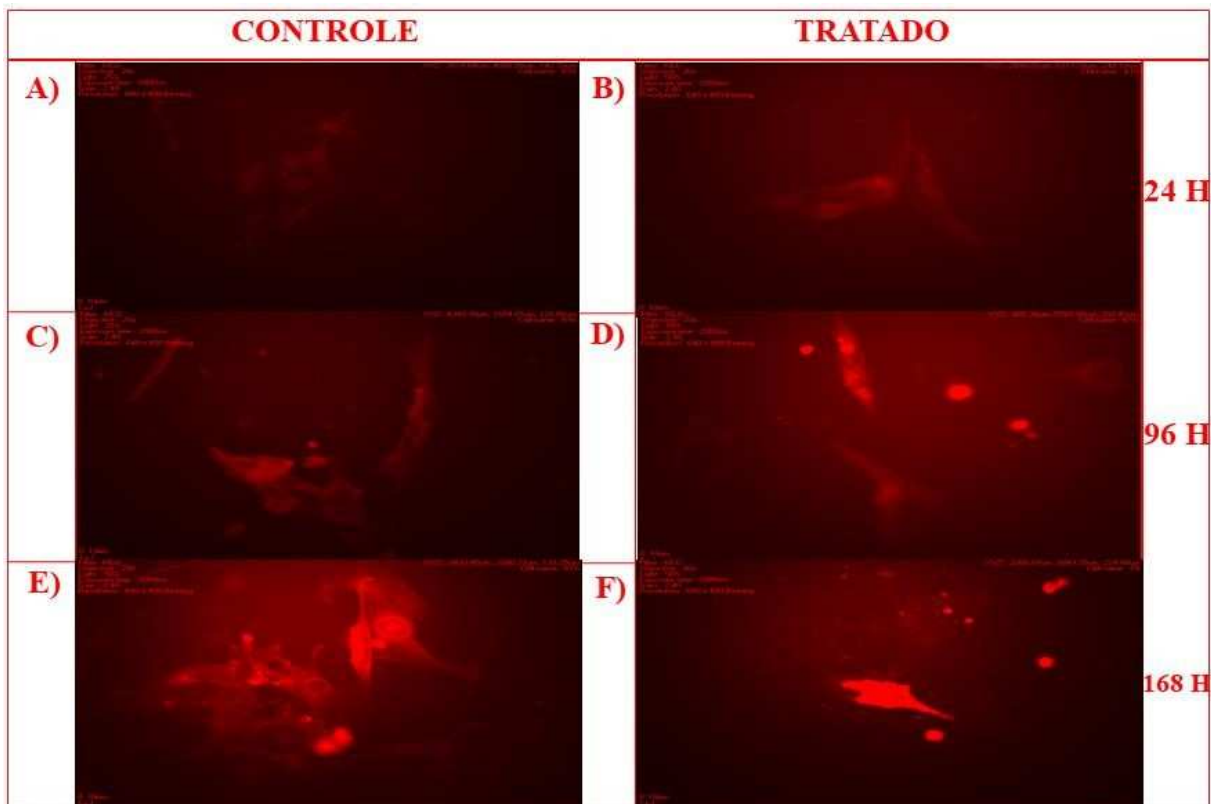
Células da linhagem B16F10 foram tratadas com o inibidor de endocitose Genisteína na concentração de 100 ug/mL e com Doxo pura na concentração de 1 μ M. As células foram visualizadas em microscópio de fluorescência em tempos distintos: A) Grupo controle (sem genisteína), 24h; B) Grupo tratado, 24h; C) Grupo controle (sem genisteína), 96h; D) Grupo tratado, 96h; E) Grupo controle (sem genisteína), 168h; F) Grupo tratado, 168h. Imagens obtidas nos comprimentos de onda λ_{ex} =545 nm e λ_{em} =620 nm; aumento de 20x.

Figura 40 - Determinação da endocitose de Doxo pura em células B16F10 tratadas com Genisteína.



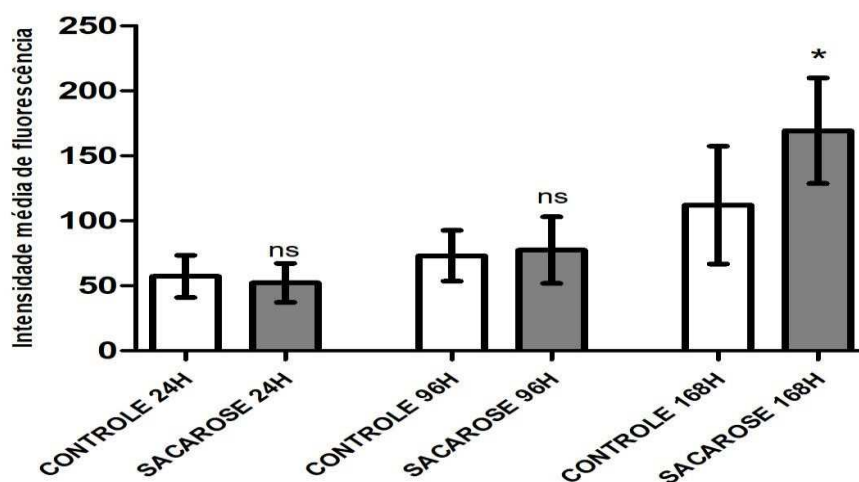
Células da linhagem B16F10 foram tratadas com o inibidor de endocitose Genisteína na concentração de 100 ug/mL e com Doxo pura na concentração de 1 μ M. A quantificação da fluorescência foi feita através de análise densitométrica. As imagens foram obtidas em microscópio de fluorescência e analisadas no software ImageJ. Barras representam o desvio padrão de nove repetições. Asteriscos representam diferença estatística entre o grupo controle e o grupo tratado (**p*-valor <0,05, ***p*-valor <0,01, ****p*-valor <0,001; ns-não significativo; Teste-T Student).

Figura 41 - Visualização de doxorubicina intracelular em células B16F10 tratadas com Doxo pura e Sacarose.



Células da linhagem B16F10 foram tratadas com o inibidor de endocitose Sacarose na concentração de 0,4M e com Doxo pura na concentração de 1 uM. As células foram visualizadas em microscópio de fluorescência em tempos distintos: A) Grupo controle (sem sacarose), 24h; B) Grupo tratado, 24h; C) Grupo controle (sem sacarose), 96h; D) Grupo tratado, 96h; E) Grupo controle (sem sacarose), 168h; F) Grupo tratado, 168h. Imagens obtidas nos comprimentos de onda $\lambda_{ex}=545$ nm e $\lambda_{em}=620$ nm; aumento de 20x.

Figura 42 - Determinação da endocitose de Doxo pura em células B16F10 tratadas com Sacarose.



Células da linhagem B16F10 foram tratadas com o inibidor de endocitose Sacarose na concentração de 0,4M e com Doxo pura na concentração de 1 uM. A quantificação da fluorescência foi feita através de análise densitométrica. As imagens foram obtidas em microscópio de fluorescência e analisadas no software ImageJ. Barras representam o desvio padrão de nove repetições. Asteriscos representam diferença estatística entre o grupo controle e o grupo tratado (**p*-valor <0,05, ***p*-valor <0,01, ****p*-valor <0,001; ns-não significativo; Teste-T Student)

6. DISCUSSÃO

A nanopartícula Doxo-VLDP é um carreador de doxorubicina composto por uma molécula de DNA encapsulada por um polímero sintético que mimetiza o envelope proteico do vírus mosaico do tabaco (*tobacco mosaic virus* - TMV). Como demonstrado na figura 6, o polímero utilizado no revestimento de Doxo-VLDP, a proteína C₄S₁₀K₁₂, é capaz de realizar a automontagem de um envelope ao redor de uma molécula de DNA dupla fita, formando uma nanopartícula cilíndrica (tipo bastonete) com cerca de 400 nm de comprimento e 2,5 nm de diâmetro.

Conhecer a composição, tamanho e formato de uma nanopartícula é essencial, uma vez que esses parâmetros podem fornecer valiosas informações sobre a mesma, tais como: estabilidade, biocompatibilidade, toxicidade e formas de internalização (SAMANTA & MEDINTZ., 2016; CHARIOU *et al.*, 2017).

A literatura já mostra que o componente carreador de Doxo-VLDP, a molécula de DNA, tem sido amplamente utilizado na composição de nanocarreadores. O amplo conhecimento disponível sobre suas características físico-químicas e complementaridade de bases permite a construção de bionanomateriais das mais variadas formas (KUMAR *et al.*, 2016). Além disso, a molécula de DNA pode ser facilmente associada a biopolímeros (SAMANTA & MEDINTZ., 2016), característica essencial no desenvolvimento deste trabalho.

Nanopartículas biopoliméricas geralmente apresentam características desejáveis na construção de plataformas de entrega de fármacos (*drug-delivery*), tais como ausência de toxicidade, biodegradabilidade, permeabilidade aumentada em tumores e liberação controlada de seu conteúdo (SAMANTA & MEDINTZ., 2016). De fato, neste trabalho foi demonstrado que os componentes isolados da construção Doxo-VLDP não causaram danos celulares: a citotoxicidade da construção foi causada exclusivamente pela droga carregada (figuras 13 e 14)

A estabilidade de Doxo-VLDP é outra característica importante que deve ser citada, considerando a importância desse parâmetro em plataformas tipo *drug-delivery*. Doxo-VLDP manteve-se estável por várias horas em condições fisiológicas, além de suportar a ação de endonucleases específicas (figuras 10 a 12). Tal fenômeno pode ser explicado também pela composição da nanopartícula. A composição do revestimento é de natureza proteica, a proteína C₄S₁₀K₁₂, que teve sua sequência de bases nucleotídicas desenhada por técnicas de biologia molecular, de forma que, quando expressa, o produto gênico seja um polímero aminoacídico que mimetiza as proteínas do envelope do Vírus Mosaico do Tabaco.

Já é sabido, no entanto, que modelos de nanocarreadores baseados em proteínas virais têm sido muito utilizados justamente pelo fato de uma das principais funções do envelope viral ser a proteção de seu conteúdo interno (SAMANTA & MEDINTZ., 2016).

Além da composição, o formato cilíndrico de Doxo-VLDP é um dos mais adequados para um sistema *drug-delivery*. Diversos estudos já demonstraram que nanopartículas com altas razões comprimento/largura têm sua interiorização celular, marginação (migração nos vasos sanguíneos) e direcionamento aumentados. As nanopartículas cilíndricas, por sua vez, possuem maior razão comprimento/largura em comparação a nanopartículas esféricas (CHARIOU *et al.*, 2017). Somados a estes resultados, estudos com membranas celulares artificiais já demonstraram que é possível prever a forma de internalização de uma nanopartícula apenas com base em seu tamanho e formato, sendo que a entrada daquelas de formato cilíndrico é sempre mais eficiente e termodinamicamente favorável em relação às esféricas (HUANG *et al.*, 2013).

Com posse dessas informações, os próximos passos deste estudo foram avaliar se as características físico-químicas de Doxo-VLDP supracitadas contribuiriam, de alguma forma, no aumento da eficiência do tratamento antitumoral *in vitro*.

Como demonstrado no item Resultados, a viabilidade celular das células cancerígenas tratadas com Doxo-VLDP foi menor do que aquelas tratadas com Doxo pura nas mesmas concentrações (Resultados, figuras 16 a 18) e o IC₅₀ para as linhagens C6 e B16F10, foi de 0,007 µg/mL e 0,65 µg/mL, respectivamente. Segundo o American National Center Institute, extratos com atividade antineoplásica devem apresentar valores de IC₅₀ inferiores a 30 µg/mL (OLIVEIRA *et al.*, 2015).

Estes autores ainda propõem que o índice de seletividade (IS) ideal no tratamento do câncer seja maior ou igual a 2,0. A linhagem C6 apresentou um valor de seletividade interessante (IS = 8,15) mas, na linhagem B16F10, este valor (IS = 0,89) foi menor que o desejado. De fato, os índices de seletividade de Doxo na linhagem B16F10 encontrados na literatura estão em torno de zero, e até mesmo tratamentos alternativos dificilmente ultrapassam um IS = 2,0 nesta linhagem (OLIVEIRA *et al.*, 2015).

Muitos trabalhos disponíveis relatam que doxorubicina, apesar da sua eficácia no tratamento de tumores, apresenta alta citotoxicidade para células não-tumorais, principalmente células cardíacas (PEREIRA *et al.*, 2011). Este fato pode justificar a baixa seletividade do tratamento com Doxo-VLDP obtido para melanócitos neste trabalho, considerando que a nanopartícula carrega Doxo, mas não possui nenhum componente de direcionamento específico

a células tumorais. Contudo, é importante salientar que, mesmo na ausência de componentes de direcionamento na nanopartícula, a seletividade do tratamento com Doxo-VLDP foi 3,27 vezes maior na linhagem C6 e 3,17 vezes maior na linhagem B16F10, quando comparado ao tratamento com Doxo pura. Outro fato a ser salientado é o de que na preparação da nanopartícula carreadora de droga há uma perda de aproximadamente 15% das moléculas de droga que não intercalam com a molécula de DNA e são perdidos no processo de gelfiltração, (RAMOS-JUNIOR, não publicado). Assim pode-se estimar um incremento na seletividade em torno de 3,7 vezes na linhagem B16F10 e de 3,65 para o glioma.

Em tumores sólidos existe um fenômeno denominado Efeito de Permeabilidade Aumentada (EPR) que prevê o acesso preferencial de nanopartículas ao interior de tumores devido aos vasos sanguíneos fenestrados e a drenagem linfática deficiente que estes apresentam. Essas características levam ao acúmulo e retenção de nanopartículas no interior de tumores sólidos, uma vez que sua permeabilidade é aumentada com a fragilidade dos vasos sanguíneos e sua retenção é possível devido ao retardo na atividade linfática (SHI *et al.*, 2017). Esse fenômeno justifica o aumento de seletividade de compostos carreados em nanopartículas nos tratamentos *in vivo*. No entanto, este fenômeno não é observado *in vitro*, e por isso foram realizados experimentos para investigar o motivo deste aumento de seletividade em Doxo-VLDP.

Primeiramente, buscou-se saber se o tipo de morte celular causado por Doxo-VLDP era semelhante ao causado por Doxo pura. Segundo a literatura, doxorubicina induz apoptose celular pela via intrínseca, pela inibição da enzima topoisomerase II, ativação da proteína p53 e liberação de citocromo C nas mitocôndrias (CHILDS *et al.*, 2002 e MINOTTI, 2014). Por citometria de fluxo, foi confirmado que as células tratadas com Doxo pura, após 24 h de tratamento, entravam em apoptose e, pela mesma metodologia, confirmou-se que as células tratadas com Doxo-VLDP também apresentavam o mesmo tipo de morte celular (figura 19).

A morte por apoptose é a desejada em um tratamento clínico, uma vez que os processos de morte celular não programados, como a necrose, tem como característica principal o rompimento de membrana e extravasamento de conteúdo intracelular que é reconhecido pelo sistema imune como um sinal de perigo (DING, BUCKWALTER & MARTIN, 2017), que estimulam a produção de citocinas e outras moléculas pró-inflamatórias, ativam o sistema imune e causam processos inflamatórios indesejados (ROCK & KONO, 2008).

Dada a semelhança do tipo de morte induzido pelo tratamento com Doxo pura e Doxo-VLDP, buscou-se saber se algum outro mecanismo poderia explicar a diferença de

citotoxicidade e seletividade apresentada entre os tratamentos. Para isso, foram feitos experimentos para identificar a presença de vesículas autofágicas nas células. Células da linhagem B16F10 tratadas com Doxo-VLDP por 24 h apresentaram um maior número de vesículas autofágicas que aquelas tratadas pelo mesmo período com Doxo pura (figuras 19 e 20).

A autofagia pode ser definida como um processo no qual as células digerem o seu próprio conteúdo intracelular a fim de fornecer substrato para biossíntese de macromoléculas e produção de energia em situações de estresse (SIL, WONG & MARTINEZ, 2018). Embora a autofagia seja conhecida como um mecanismo pró-sobrevivência, em células cancerígenas o seu papel ainda não está bem estabelecido, devido à existência de um fenômeno que pesquisadores denominam como “paradoxo da autofagia”: se por um lado, a reciclagem do conteúdo intracelular pode fornecer matéria prima para a produção de moléculas importantes para o desenvolvimento, por outro a digestão desse mesmo conteúdo pode ser interpretada pela célula como um sinal para entrar em apoptose (CHEN *et al.*, 2018).

A literatura nos mostra que o papel da autofagia no tratamento do câncer é controverso. Alguns estudos demonstraram que o uso de inibidores de autofagia aumentou a eficiência de um tratamento em linhagens de câncer de mama (LAHA *et al.*, 2014) mas, no tratamento de células de câncer de boca a indução da autofagia era essencial para que as células tumorais entrassem em apoptose (KIM *et al.*, 2012).

No caso do melanoma, em geral, a autofagia promove a proliferação do tumor e alguns pesquisadores apontam que o uso de inibidores autofágicos pode ser uma alternativa terapêutica (FLEMMING, 2011). De fato, uma pesquisa recente demonstrou que um composto a base de capsaicina induz células de melanoma humano a realizar autofagia e entrar em apoptose. No entanto, a eficiência do tratamento aumentou com o uso combinado de inibidor de autofagia (CHU, LI & WANG, 2019).

Os resultados obtidos neste trabalho com a linhagem B16F10 divergem dos encontrados na literatura no que diz respeito ao câncer do tipo melanoma. Uma possível explicação para isso é que o aumento da autofagia pode ser um mecanismo desenvolvido pelas células para tentar contornar o “stress” causado pelo tratamento quimioterápico. Esse fenômeno já foi observado com a utilização de doxorubicina no tratamento de outros tipos de câncer (CHEN *et al.*, 2018).

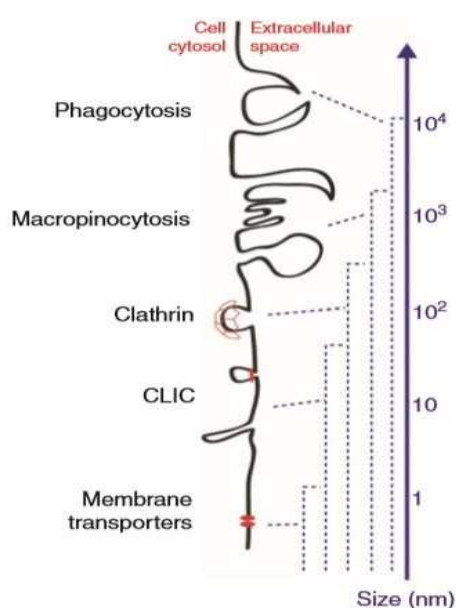
Por último, buscou-se saber se os mecanismos de endocitose em Doxo-VLDP eram semelhantes aos observados em Doxo pura e se isto poderia, de alguma forma, explicar a

diferença de eficiência entre os tratamentos. O sucesso de um tratamento depende da capacidade de um determinado princípio ativo chegar ao alvo desejado. Por isso é importante elucidar se um composto é capaz de entrar numa célula e por quais mecanismos tal evento ocorre (AKINC & BATTAGLIA, 2013).

No caso da Doxo pura, a literatura relata que esta molécula entra nas células de forma passiva (FREZARD & GARNIER-SUILLERO, 1990; SPEELMAN *et al.*, 1994; SPEELMAN *et al.*, 1996), mas no caso de Doxo-VLDP, embora já tivesse sido observado que o tratamento com esta construção causa morte celular por apoptose e autofagia, não havia comprovação da entrada da nanopartícula nas células. Tal resultado foi comprovado por microscopia de luz confocal (figura 21). Contudo, foi observado atraso na entrada de doxorubicina carregada por VLDP (figura 22) o que levou a hipótese de que a entrada de Doxo-VLDP ocorria de forma diferente da observada em Doxo pura.

Duas evidências sustentam essa hipótese: 1) VLDP foi encontrada dentro da célula após 1h de tratamento, mas nesse período de tempo não era possível a observação de fluorescência emitida pela doxorubicina intracelular, o que sugere que a nanopartícula necessita ser processada antes de liberar o seu conteúdo no interior da célula; 2) O tamanho de uma molécula influencia o tipo de transporte utilizado pelas células, como mostra a figura 43, assim, como Doxo-VLDP possui cerca de 245 nm de comprimento, sua entrada deve ocorrer, pelo menos preferencialmente, por meio de transporte vesicular.

Figura 43 - Relação entre mecanismo de endocitose e tamanho da carga transportada.



De fato, o uso de inibidores de endocitose dependente e independente de clatrina culminou na diminuição da quantidade de doxorrubicina intracelular quando as células da linhagem B16F10 foram tratadas com Doxo-VLDP (figuras 25 a 30). Isto sugere que, diferente da Doxo pura, que é internalizada pelas células por difusão passiva através da membrana plasmática, Doxo-VLDP utiliza mecanismos ativos para alcançar o interior das células, como a endocitose mediada por clatrina, caveolina e balsas lipídicas.

Como já citado, isso pode ser consequência do tamanho da nanopartícula e de outros fatores, como formato e composição. Inclusive, nanopartículas de alta razão comprimento/largura derivadas do envelope do Vírus Mosaico do Tabaco tendem a interiorizar as células por transporte em vesículas (CHARIOU *et al.*, 2017).

Entretanto, na linhagem celular C6, o uso de inibidores de endocitose apresentou pouco ou nenhum efeito na internalização de doxorrubicina (figuras 31 a 36), o que indica que a maneira como Doxo-VLDP entra nas células não é universal e varia entre diferentes tipos celulares. Esta variação entre linhagens na forma de entrada de nanopartículas já é observada na literatura, e pode ser explicada pelas características distintas de cada tipo celular no que diz respeito a composição de lipídios de membrana e de proteínas transportadoras (LIU *et al.*, 2016).

Por fim, buscou-se determinar se, após endocitada, Doxo-VLDP era processada pelas organelas digestivas da célula: endossomos e lisossomos. A realização deste último ensaio foi motivada pelo conhecimento prévio de que as vesículas de endocitose são direcionadas aos endossomos primários e, posteriormente, o seu conteúdo é encaminhado para degradação nos lisossomos, ou para endossomos de reciclagem, que retornam à membrana plasmática (JOHNSON *et al.*, 2017). Este suposto processamento lisossomal poderia explicar o atraso no aparecimento de doxorrubicina intracelular nas células tratadas com Doxo-VLDP.

Por meio de microscopia confocal, foi observado que os endossomos primários se localizam preferencialmente na região próxima à membrana plasmática das células B16F10 (figura 24), e nessa mesma região, após 1h de tratamento, são encontradas as nanopartículas Doxo-VLDP, que ainda não liberaram seu conteúdo no interior das células (figura 23). Esta colocalização pode indicar que Doxo-VLDP necessita ser processada em organelas de degradação para liberar a droga carregada em seu interior.

Alguns autores sugerem que em nanocarreadores endereçados aos lisossomos, a droga transportada só se torna ativa após o processamento na organela, o que contribui para uma ação direcionada, aumento de seletividade e diminuição de efeitos colaterais de um tratamento

(AKINC & BATTAGLIA, 2013). De fato, estudos demonstraram que nanopartículas virais carreando doxorubicina internalizam células tumorais em cultura em um processo endocítico dependente de clatrina - via canônica na qual vesículas são direcionadas a endossomos primários e posteriormente aos lisossomos ou endossomos de reciclagem - e que a liberação da doxorubicina é maior quando o pH é reduzido (TIAN *et al.*, 2016).

Todos os mecanismos estudados neste trabalho - construção de nanomateriais, citotoxicidade celular, autofagia, endocitose e morte celular - colaboraram para o desenvolvimento de uma construção inédita, bem como a avaliação dos seus efeitos em cultura de células. O conjunto de resultados obtidos nesta dissertação aponta a nanopartícula Doxo-VLDP como uma alternativa altamente efetiva no tratamento clínico de tumores.

7. CONCLUSÕES

Os dados e resultados apresentados neste trabalho mostram que a nanopartícula Doxo-VLDP foi capaz de ser interiorizada pelas células tumorais das linhagens B16F10 e C6 em cultura, promovendo citotoxicidade aumentada e discreta seletividade em relação à melanócitos em ambas as linhagens testadas. As células tratadas com esta construção apresentaram níveis aumentados de autofagia e morreram por mecanismos apoptóticos, o que é desejável em tratamentos quimioterápicos. Doxo-VLDP entra nas células de melanoma por mecanismos de endocitose, tanto por mecanismos dependentes de clatrina quanto por mecanismos independentes e são direcionadas aos lisossomos, onde possivelmente, são processadas. A composição, o formato e o tamanho da nanopartícula desenvolvida podem ser os responsáveis pela internalização e citotoxicidade diferenciais da construção em relação à Doxo pura. Todas essas características em conjunto mostram o potencial do uso Doxo-VLDP em tratamentos nanoquimioterápicos e abre novas perspectivas de estudo, como o desenvolvimento de metodologias e componentes de direcionamento celular que permitam que os tratamentos e drogas atuem exclusivamente em microambientes tumorais, bem como a necessidade de futura avaliação do seu efeito *in vivo* para posterior utilização de tal tecnologia na clínica médica.

REFERÊNCIAS

- AKINC, A.; BATTAGLIA, G. Exploiting endocytosis for nanomedicines. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 5, n. 11, 2013.
- ARAÚJO, R. F. et al. Avaliação do Registro de Medicamentos **Nanotecnológicos Assessment on Nanotechnology Medicines Registered**. n. D, p. 46–51, 2014.
- BHASKAR, S.; LIM, S. Engineering protein nanocages as carriers for biomedical applications. **NPG Asia Materials**, v. 9, n. 4, p. e371-18, 2017.
- BIABANIKHANKAHDANI, R. et al. PH-responsive virus-like nanoparticles with enhanced tumour-targeting ligands for cancer drug delivery. **Scientific Reports**, v. 6, n. November, 2016.
- CHEN, C. et al. Autophagy and doxorubicin resistance in cancer. **Anti Cancer Drugs**, p. 1–9, 2018.
- CHU, H.; LI, M.; WANG, X. Capsaicin induces apoptosis and autophagy in human melanoma cells. **Oncology Letters**, p. 4827–4834, 2019.
- CHILDS, A. C. et al. Doxorubicin Treatment in Vivo Causes Cytochrome c Release and Cardiomyocyte Apoptosis , As Well As Increased Mitochondrial Efficiency , Superoxide Dismutase Activity , and Bcl-2 : Bax Ratio. **Cancer research**, v. 62, p. 4592– 4598, 2002.
- CRUNKHORN, S. Targeting cancer cell metabolism in glioblastoma. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 346, p. 41573, 2019.
- DIKIC, I.; ELAZAR, Z. Mechanism and medical implications of mammalian autophagy. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 19, p. 349-364, 2018.
- DING, L.; BUCKWALTER, J. A.; MARTIN, J. A. DAMPs Synergize with Cytokines or Fibronectin Fragment on Inducing Chondrolysis but Lose Effect When Acting Alone. Mediators of Inflammation, **Mediators of Inflammation**, v. 2017, 2017.
- DURBIN, K. R.; PHIPPS, C.; LIAO, X. Mechanistic Modeling of Antibody-Drug Conjugate Internalization at the Cellular Level Reveals Inefficient Processing Steps. **Molecular cancer therapeutics**, v. 48, n. 3, p. 434–452, 2018.
- EL-AGAMY, S. et al. Chemotherapy and cognition : comprehensive review on doxorubicin - induced chemobrain. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, n. 0123456789, 2019.
- EMANUELE, S. et al. Routes to cell death in animal and plant kingdoms: from classic apoptosis to alternative ways to die—a review. **Rendiconti Lincei**, n. 0123456789, p. 1–13, 2018.
- FLEMMING, A. Autophagy presents Achilles heel in melanoma. **Nature Reviews Drug Discovery**. v. 10, n. July, p. 2011, 2011.
- FREZARD, F.; GARNIER-SUILLERO, A. Comparison of the membrane transport of anthracycline derivatives in drug-resistant and drug-sensitive K562 cells. **European Journal**

of **Biochemistry**, v. 491, p. 483–491, 1991.

HAASE, A.; LYNCH, I. Quality in nanosafety — Towards reliable nanomaterial safety assessment. **NanoImpact**, v. 11, n. February, p. 67–68, 2018.

HE, Z. et al. Cold Atmospheric Plasma Induces ATP-Dependent Endocytosis of Nanoparticles and Synergistic U373MG Cancer Cell Death. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–11, 2018.

HERNANDEZ-GARCIA, A. et al. Design and self-assembly of simple coat proteins for artificial viruses. **Nature Nanotechnology**, v. 9, n. 9, p. 698–702, 2014.

HUANG, C. et al. Role of Nanoparticle Geometry in Endocytosis: Laying Down to Stand Up. **Nano Letters**. 2013.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (Brasil). **Tratamento do Câncer**. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/tratamento>>. Acesso em 03 de julho de 2019. Brasil, 2019.

JOHNSON, A. et al. **Biologia Molecular da Célula**. [s.l: s.n.]. v. 6^o edição

KIM, J. et al. Curcumin-induced autophagy contributes to the decreased survival of oral cancer cells. **Archives of Oral Biology**, v. 57, n. 8, p. 1018–1025, 2012.

KUMAR, V. et al. DNA nanotechnology for cancer therapy. **Theranostics**, v. 6, n. 5, p. 710–725, 2016.

LAHA, D. et al. Biochimica et Biophysica Acta Interplay between autophagy and apoptosis mediated by copper oxide nanoparticles in human breast cancer cells MCF7. **BBA - General Subjects**, v. 1840, n. 1, p. 1–9, 2014.

LIU, X. et al. Size Dependent Cellular Uptake of Rod-like Bionanoparticles with Different Aspect Ratios. **Nature Publishing Group**, n. April, p. 2–11, 2016.

MARTINS, W. et al. Cardiomiopatia por Doxorrubicina em Pacientes com Câncer de Mama – A Propósito de Dois Casos. **Revista Brasileira de Cardiologia**, v. 24, n. 3, p. 196–198, 2011.

MIKKILÄ, J. et al. Virus-encapsulated DNA origami nanostructures for cellular delivery. **Nano Letters**, v. 14, n. 4, p. 2196–2200, 2014.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (BRASIL). **Incidência de Câncer no Brasil**. 2018 [s.l: s.n.].

MINOTTI, G. Anthracyclines: Molecular Advances and Pharmacologic Developments in Antitumor Activity and Cardiotoxicity. **Pharmacological Reviews**, v. 56, n. 2, p. 185–229, 2004.

MOSMANN, T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, p. 55–63, 1983.

OLIVEIRA, P. et al. Cytotoxicity screening of essential oils in cancer cell lines. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 25, n. 2, p. 183–188, 2015.

OPAS BRASIL. **Folha informativa – Câncer**. Disponível em <https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=5588:folha-informativa-cancer&Itemid=1094>. Acesso em 03 de julho de 2019. Brasil, 2018.

PARHI P., MOHANTY, C., SAHOO, S. Nanotechnology-based combinational drug delivery: an emerging approach for cancer therapy. **Drug Discovery Today**. v 17. p 10441052. 2012;

PENG, M.; YIN, N.; ZHANG, W. Endocytosis of Fc α R is clathrin and dynamin dependent, but its cytoplasmic domain is not required. **Cell Research**, v. 20, n. 2, p. 223–237, 2010.

PEREIRA, G., SILVA, A., DIOGO, C., CARVALHO, F., MONTEIRO, P., OLIVEIRA, P. Drug-induced cardiac mitochondrial toxicity and protection: from doxorubicin to carvedilol. **Current Pharmaceutical Design**. v 17. p 113-2129. 2011;

PRADOS, J. et al. Doxorubicin-Loaded Nanoparticles: New Advances in Breast Cancer Therapy. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**, v. 12, n. 9, p. 1058–1070, 2012.

RATHORE, M. et al. Cancer cell-derived long pentraxin 3 (PTX3) promotes melanoma migration through a toll-like receptor 4 (TLR4)/ NF- κ B signaling pathway. **Oncogene**, v. 3, 2016.

ROCK, K. L.; KONO, H. The inflammatory response to cell death. **Annual Rev Pathol**, v. 3, p. 99–126, 2008.

SAMANTA, A.; MEDINTZ, I. L. Nanoscale Nanoparticles and DNA – a powerful and growing. **Nanoscale**, v. 8, p. 9037–9095, 2016.

SHI, J. et al. Cancer nanomedicine: Progress, challenges and opportunities. **Nature Reviews Cancer**, v. 17, n. 1, p. 20–37, 2017.

SIL, P.; WONG, S.; MARTINEZ, J. More Than Skin Deep : Autophagy Is Vital for Skin Barrier Function. **Frontiers in Immunology**. v. 9, n. June, 2018.

SILVA, E. F. **Análise de complexos DNA-ligantes com aplicações na construção de carreadores de fármacos**. 2018. Tese (Doutorado em Física) – Departamento de Física, Universidade Federal de Viçosa, MG. 2018.

SPEELMANS, G. et al. Transport Studies of Doxorubicin in Model Membranes Indicate a Difference in Passive Diffusion across and Binding at the Outer and Inner Leaflets of the Plasma Membrane. **American Chemical Society**, p. 13761–13768, 1994.

TIAN, Y. et al. Tobacco Mosaic Virus-Based 1D Nanorod-Drug Carrier via the Integrin-Mediated Endocytosis Pathway. **ACS Applied Materials and Interfaces**, v. 8, n. 17, p. 10800–10807, 2016.

WANG, A. Z.; LANGER, R.; FAROKHZAD, O. C. Nanoparticle Delivery of Cancer Drugs. **Annual Review of Medicine**, v. 63, n. 1, p. 185–198, 2012.