

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES Autarquia Associada à Universidade de São Paulo

Modelo tridimensional *in vitro* de adenocarcinoma prostático humano produzido por levitação magnética

PRISCILA DE QUEIROZ SOUZA PASSOS

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do Grau de Mestre em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear - Aplicações

Orientador: Prof. Dr. Daniel Perez Vieira

São Paulo 2020

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES Autarquia Associada à Universidade de São Paulo

Modelo tridimensional *in vitro* de adenocarcinoma prostático humano produzido por levitação magnética

Versão Corrigida

Versão Original disponível no IPEN

PRISCILA DE QUEIROZ SOUZA PASSOS

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do Grau de Mestre em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear - Aplicações

Orientador: Prof. Dr. Daniel Perez Vieira

São Paulo 2020 Fonte de Financiamento: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte

Como citar:

PASSOS, P. d. Q. S. *Modelo tridimensional in vitro de adenocarcinoma prostático humano produzido por levitação magnética*. 2020. 93 p. Dissertação (Mestrado em Ciências), Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, IPEN-CNEN/SP, São Paulo. Disponível em: (data de consulta no formato: dd/mm/aaaa)

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de geração automática da Biblioteca IPEN/USP, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Passos, Priscila de Queiroz Souza Modelo tridimensional in vitro de adenocarcinoma prostático humano produzido por levitação magnética / Priscila de Queiroz Souza Passos; orientador Daniel Perez Vieira. -- São Paulo, 2020. 93 p. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Nuclear (Aplicações) -- Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo, 2020. 1. Cultura tridimensional de células. 2. Levitação magnética. 3. Esferoides tumorais. 4. Nanopartículas de óxido de ferro. 5. Ensaios pré-clinicos. I. Vieira, Daniel Perez, orient. II. Título.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Autor: Priscila de Queiroz Souza Passos

Título: Modelo tridimensional *in vitro* de adenocarcinoma prostático humano produzido por levitação magnética.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Nuclear da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Data: 13/10/2020

Banca examinadora

Prof. Dr.: Daniel Perez Vieira

Instituição: IPEN

Prof. Dr.: Andrea Cecilia Dorion Rodas

Instituição: UFABC

Prof. Dr.: Karina de Oliveira Gonçalves

Instituição: UNIFESP

Julgamento: Aprovado

Julgamento: Aprovado

Julgamento: Aprovado

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, que me ensinaram a importância da dedicação e sempre me apoiaram nas minhas escolhas.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Daniel Perez Vieira, pela oportunidade que me deu em realizar esse trabalho. Obrigada pelas discussões enriquecedoras, pela presença, paciência e confiança.

À Prof^a Dra Solange Sakata e ao Centro de Radiofarmácia, pela colaboração durante a execução desse trabalho.

Aos amigos, Luma Ramirez de Carvalho, Letícia Bonfim e Kleicy Cavalcante, que me receberam tão bem no grupo, Ana Cristina Gomes Nascimento, Mayelle Paz, Fúlvio Corazza, Ana Lígia Albiero e Karina Oliveira Gonçalves por todo apoio, colaboração, parceria e dedicação. Obrigada pela amizade e por fazerem do nosso grupo de pesquisa um grupo unido que me orgulha ter participado.

Á minha grande amiga, Thais Caramori Feitosa, que me acompanha desde o início dessa jornada, parceira em todos os momentos, obrigada pela amizade, paciência, dedicação, por estar sempre presente e disposta a ajudar e por fazer parte de mais esse capítulo da minha vida!

Aos demais amigos do Centro de Biotecnologia, Alissandra Gomes, Thais Sevilhano, Felipe Douglas, Renan, Wanessa, Eliana, Ênio e Gustavo pelas experiências e bons momentos compartilhados.

Aos demais orientadores e colaboradores do Centro de Biotecnologia pelo apoio.

Aos meus pais e ao meu irmão por serem sempre presentes.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES, pelo apoio financeiro.

Muito obrigada!

"A verdadeira viagem de descobrimento não consiste em procurar novas paisagens, mas em ter novos olhos". (Marcel Proust)

RESUMO

PASSOS, Priscila de Q. S. **Modelo tridimensional in vitro de adenocarcinoma prostático humano produzido por levitação magnética.** 2020. 93 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN-CNEN/SP. São Paulo.

Culturas celulares tradicionais em monocamada nem sempre são suficientes guando aplicadas a ensaios toxicológicos pré-clínicos in vitro, pois podem frequentemente perder as características e funções quando não integradas em um tecido ou órgão. A utilização de PIONs funcionalizadas para a construção de esferoides por levitação magnética é uma ferramenta de baixo custo, de fácil manipulação e biocompatível, permitindo sua associação a linhagens celulares. Neste trabalho, as propriedades biofuncionais de esferoides celulares construídos a partir de células tumorais e nanopartículas magnéticas de óxido de ferro (PIONs) biofuncionalizadas foram estudadas, cujas nanopartículas de óxido de ferro foram sintetizadas por coprecipitação, funcionalizadas com os aminoácidos glicina e poli-L-lisina e então submetidas a caracterização físico-química por MET, DRX, DLS, potencial zeta e FTIR. A partir dessas análises foi possível identificar nanopartículas de magnetita com tamanho ideal e carga eletrostática positiva estável para adsorção às células. Essas nanopartículas também foram submetidas a uma avaliação biológica quanto a adsorção à membrana de células tumorais de próstata (LNCaP), citotoxicidade e formação de esferoides. Foi observada boa adsorção dos PIONs, sem desprendimento das células durante o cultivo celular, não foi observada citotoxicidade das nanopartículas e houve resposta magnética suficiente a fim de permitir a formação dos esferoides quando na presença de um campo magnético. Os esferoides tumorais obtidos a partir da adsorção das nanopartículas foram avaliados estruturalmente por microscopia de fluorescência e analise histológica com resultados satisfatórios para uma estrutura tumoral. Foram também utilizados como sistema-teste na avaliação do potencial tóxico de substâncias farmacológicas e não-farmacológicas de ação conhecida com resultados reprodutíveis. Portanto, o produto final deste trabalho pode ser utilizado em testes posteriores de eficácia de fármacos que visem tratar os tumores prostáticos humanos.

Palavras-chave: Cultura tridimensional de células; Levitação magnética; Esferoides tumorais; Nanopartículas de óxido de ferro; Ensaios pré-clinicos;

ABSTRACT

PASSOS, Priscila de Q. S. *In vitro three-dimensional model of human prostatic adenocarcinoma produced by magnetic levitation.* 2020. 93 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN-CNEN/SP. São Paulo.

Traditional monolayer cell cultures are not always sufficient when applied to pre-clinical toxicological tests in vitro, as they can often lose their characteristics and functions when not integrated into a tissue or organ. The use of functionalized PIONs for the construction of spheroids by magnetic levitation is a low-cost tool, easy to handle and biocompatible, allowing its association with cell lines. In this work, the biofunctional properties of cellular spheroids constructed from tumor cells and biofunctionalized iron oxide nanoparticles (PIONs) were studied, whose iron oxide nanoparticles were synthesized by co-precipitation, functionalized with the amino acids glycine and poly-L-lysine and then subjected to physical-chemical characterization by MET, DRX, DLS, zeta potential and FTIR. From these analyzes it was possible to identify nanoparticles of magnetite with ideal size and stable positive electrostatic charge for adsorption to cells. These nanoparticles were also subjected to a biological evaluation regarding the adsorption to the membrane of prostate tumor cells (LNCaP), cytotoxicity and spheroid formation. Good adsorption of the PIONs was observed, without detaching the cells during cell culture, no cytotoxicity of the nanoparticles was observed and there was sufficient magnetic response to allow the formation of the spheroids when in the presence of a magnetic field. The tumor spheroids obtained from the adsorption of the nanoparticles were structurally evaluated by fluorescence microscopy and histological analysis with satisfactory results for a tumor structure. They were also used as a test system in the evaluation of the toxic potential of pharmacological and nonpharmacological substances of known action with reproducible results. Therefore, the final product of this work can be used in further tests of efficacy of drugs aimed at treating human prostate tumors.

Keywords: Three-dimensional cell culture; Magnetic levitation; Tumor spheroids; Iron oxide nanoparticles; Pre-clinical trials;

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Vantagens (+) e desvantagens (-) entre os sistemas de cultura 2D e 3D 29
Tabela 2 - Molaridades testadas de PSMA 617 e PSMA 1153
Tabela 3 - Valores obtidos para o potencial zeta e tamanho hidrodinâmico das nanopartículas em água e em meio de cultura63
Tabela 4 - Quantidade de ferro (M) adsorvido às células após adição das nanopartículas 65

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação esquemática do crescimento em 2D e em 3D de células. A largura e o comprimento são indicados por X e Y, respectivamente, e a altura representada por Z. O achatamento celular (*) pode ser observado, assim como as interações celulares restritas a periferia no cultivo em 2D (linha pontilhada)
Figura 2 - Representação esquemática dos componentes básicos de um tumor e de um esferoide tumoral
Figura 3 - Imagem ilustrativa da construção do esferoide por levitação magnética
Figura 4 - Representação do comportamento magnético de um material paramagnético na ausência e na presença de um campo magnético externo <i>(H)</i>
Figura 5 - Estrutura molecular da Glicina
Figura 6 - Estrutura molecular da Poli-L-Lisina
Figura 7 - Estrutura química das moléculas de PSMA-617 (a) e PSMA-11 (b)42
Figura 8 - Esquema representativo de obtenção da curva padrão para quantificação de ferro nas nanopartículas
Figura 9 - Esquema representativo da quantificação de ferro nas nanopartículas
Figura 10 - Imagens da preparação dos esferoides de LNCaP em gotas de agarose 1% em PBS para realização dos cortes histológicos
Figura 11 - Representação esquemática de uma nanopartícula de óxido de ferro funcionalizada com uma molécula de glicina (azul) e um resíduo de lisina presente na Poli-L-lisina (rosa)
Figura 12 - Imagem das nanopartículas em água ultrapura atraídas por imã58
Figura 13 - Fotomicrografias obtidas por microscopia eletrônica de transmissão das nanopartículas de óxido de ferro. (A) Nanopartículas não funcionalizadas, barra: 50 nm. (B e C) Nanopartículas funcionalizadas com glicina e poli-L-Lisina, barras: 100 e 50 nm, respectivamente
Figura 14 - Espectro de Difração de Raio-X das nanopartículas de óxido de ferro sintetizadas com (Gly(+)) e sem (Gly(-)) glicina como surfactante
Figura 15 - Tamanho médio dos cristalitos produzidos na ausência (Gly (-)) ou presença de glicina (Gly (+))
Figura 16 - Espectros da medição do potencial zeta das nanopartículas de óxido de ferro não funcionalizadas (PION), funcionalizadas apenas com glicina (Gly(+)) e funcionalizadas com glicina e poli-L-Lisina (poli-L-Lisina) e suspensas em água ultrapura

Figura 18 - Análise de FT-IR das nanopartículas de óxido de ferro funcionalizadas. 64

Figura 24 - Área dos esferoides (µm²) cultivados por 3 dias para cada densidade celular...70

Figura 29 - Gráfico obtido da avaliação do efeito citotóxico da ciclofosfamida nos esferoides de LNCaP. VC: Viabilidade Celular. (***) p< 0,001; (****) p < 0,0001......75

Figura 30 - Gráfico apresentando curva de toxicidade da Ciclofosfamida em cultivo tridimensional de LNCaP com reagente MTS/PMS (Valor de IC₅₀ indicado)......76

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- **µg –** micrograma(s)
- µL microlitro(s)
- **µM –** micro molar
- µm micrometro(s)
- 2D bidimensional
- 3D tridimensional
- A ampere
- ANVISA Agência Nacional de Vigilância Sanitária
- ATCC American Type Culture Collection
- **C** Carbono
- CC Controle de Células
- cm centímetro
- **CN** Controle Negativo
- CO₂ Dióxido de Carbono
- COD Crystallography Open Database
- **CONCEA –** Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
- **CP** Controle Positivo
- DL₅₀ dose letal que provoca a morte de 50% da população em estudo
- DLS Dynamic Light Scathering
- DMSO Dimetilsulfóxido
- DNA Deoxyribonucleic Acid
- DRX Difração de Raio-X
- ECVAM European Centre for the Validation of Alternative Methods
- EDTA Ethylene Diamine Tetracetic Acid
- FDA Food and Drug Administration
- Fe Ferro
- Fe₂O₃ maguemita
- Fe₃O₄ magnetita
- FTIR Fourier Transform Infrared Spectroscopy
- **g** grama(s)
- HCA High Content Analysis
- HCI Ácido Clorídrico
- HCS High Content Screening

- HT High Throughput
- IC50 concentração que inibe 50% das células desafiadas
- INCA Instituto Nacional do Câncer
- **IP** lodeto de Propídio
- ISO International Organization for Standardization
- **kV –** kilovolt
- **kW –** kilowatts
- L Litro(s)
- M Molar
- mA miliampere
- MCTI Ministério da Ciência Tecnologia e Inovação
- MEC Matriz Extracelular
- MET Microscopia Eletrônica de Transmissão
- **mm –** milimetros
- **MTS** (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2Htetrazolium)
- MTT 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide
- mV milivolts
- N₂ Nitrogênio
- NaCI Cloreto de Sódio
- NaOH Hidróxido de Sódio
- nm nanômetro(s)
- **O –** Oxigênio
- OECD Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico
- PBS Phosphate Buffer Saline
- PET Positron Emission Tomography
- pH potencial Hidrogeniônico
- PIONs Paramagnetic Iron Oxide Nanoparticles
- pmol picomol
- PMS Phenazine Methosulfate
- PSMA Prostate Specific Membrane Antigen
- q.s.p. quantidade suficiente para
- RNA Ribonucleic Acid
- RPMI-1640 Roswell Park Memorial Institute medium 1640
- SDS Sodium Dodecyl Sulfate

v/v - volume de soluto (mL) / volume da solução (mL)

VC - Viabilidade Celular

W - Watts

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
2	OBJETIVOS	23
2.1	Objetivo geral	23
2.2	Objetivos específicos	23
3	REVISÃO DE LITERATURA	24
3.1	Métodos Alternativos ao uso de animais	24
3.2	Cultura de Células em monocamada (2D)	25
3.3	Cultura tridimensional de células (3D)	27
3.4	Nanopartículas paramagnéticas de óxido de ferro (PIONs)	33
3.5	Funcionalização das nanopartículas com aminoácidos	35
3.6	Caracterização físico-química de nanopartículas magnéticas	37
3.6.1	Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)	37
3.6.2	Difração de Raios-X (DRX)	38
3.6.3	Potencial zeta	39
3.6.4	Dispersão dinâmica da luz	39
3.6.5	Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier	40
3.7	Adenocarcinoma Prostático Humano	41
3.8	Avaliação da citotoxicidade	42
4	MATERIAL E MÉTODOS	44
4.1	Síntese das nanopartículas	44
4.2	Caracterização das nanopartículas	45
4.2.1	Difração de Raio-X	45
4.2.2	Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FT-IR)	46
4.2.3	Potencial Zeta e Dynamic Light Scattering (DLS)	46
4.2.4	Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)	46
4.3	Cultivo das células	46
4.4	Quantificação do ferro nas nanopartículas em células LNCaP	47
4.5	Ensaio de Citotoxicidade das nanopartículas em cultivo em monocamada	49
4.6	Avaliação da adsorção das nanopartículas às células	50
4.7	Determinação da quantidade de células e tempo para coesão dos esferoides	51
4.7.1	Avaliação das áreas dos esferoides	51
4.8	Construção dos esferoides	52
4.9	Avaliação da viabilidade dos esferoides	52
4.10	Teste com PSMA em esferoides	53
4.11	Teste de Controles Positivos em esferoides	53

4.12	Teste com ciclofosfamida	54
4.13	Análise histológica	55
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	57
6	CONCLUSÃO	80
REFEF	RÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	82

1 INTRODUÇÃO

As inovações científicas e tecnológicas contribuem intimamente para a pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos, envolvendo um processo longo e complexo e que inclui testes laboratoriais das potenciais formulações, testes em animais e testes clínicos, até a inserção do produto no mercado (GUIDO *et al.*, 2010). No processo de desenvolvimento de fármacos com atividade antitumoral existem muitas dificuldades como por exemplo formulações impróprias, toxicidade excessiva, fatores de resistência, dentre outras que prejudicam sua aprovação. Desta forma, após a descoberta de um novo fármaco é obrigatória a realização de ensaios toxicológicos pré-clínicos para garantir sua segurança e proteger os consumidores de efeitos secundários indesejados ou mesmo de danos graves para a saúde (SILVA *et al.*, 2018).

Os ensaios toxicológicos pré-clínicos são conduzidos por meio de testes *in vitro* e *in vivo*. Com a adoção de sistemas *in vitro*, como a cultura de células, é possível reduzir o número de animais necessários por ensaio, refinar os procedimentos a fim de proporcionar menor sofrimento animal ou substituir o uso dos animais, conforme o princípio dos 3R's estabelecidos por Russel e Burch, em 1953 (MCTI, 2019).

Contudo, em se tratando de testes de fármacos, sistemas-teste baseados em culturas celulares tradicionais nem sempre são suficientes. As linhagens celulares podem frequentemente perder suas características e funções quando não integradas em um tecido ou órgão. Desta forma, os modelos *in vitro* de tecidos com estrutura tridimensional proporcionam aglomerados celulares com características mais próximas às condições naturais *in vivo*, permitindo níveis qualitativa e quantitativamente diferentes de interação entre as células, com a matriz extracelular (MEC) e com seu microambiente (GODUGU *et al*, 2013; EDMONDSON *et al*, 2014).

Com relação ao processo de desenvolvimento de novos fármacos com atividade antitumoral, é observado um baixo percentual de sucesso de muitas moléculas, que embora apresentem significativa atividade antitumoral em ensaios préclínicos *in vitro*, quando os ensaios clínicos são realizados, estes resultados não se reproduzem (HUTCHINSON & KIRK, 2011). Um dos principais obstáculos para compreensão dos eventos biológicos envolvidos no câncer e em medicamentos antitumorais é a falta de modelos adequados e relevantes para o estudo *in vitro*, em especial para o câncer. Isso ocorre devido aos ensaios *in vitro* bidimensionais não serem capazes de mimetizar adequadamente a fisiologia tumoral, como hipóxia e penetração de medicamentos (HICKMAN *et al*, 2014; ZANONI *et al*, 2016).

Enquanto as culturas bidimensionais tradicionais permitem o crescimento celular em monocamada, as culturas tridimensionais permitem o crescimento celular em agregados ou esferoides. Essa disposição de crescimento das células permite controlar a modelagem espacial do agregado celular ou criar estruturas em várias camadas, isso ocorre devido a interação das células umas com as outras pelos desmossomos ou junções dérmicas localizadas na membrana celular e pela adequada produção de matriz (EDMONDSON *et al*, 2014; ZANONI *et al*, 2016; DU *et al*, 2017).

Os esferoides apresentam uma estrutura mais organizada por apresentarem uma heterogeneidade celular semelhante aos tecidos *in vivo*. Essas estruturas, conforme as caraterísticas da linhagem celular utilizada, possuem células em vários estágios do ciclo celular. As camadas mais externas de um esferoide são expostas ao meio, desta forma são principalmente constituídas por células viáveis e proliferantes. Já as células centrais recebem menos oxigênio e nutrientes do meio e tendem a estar em estado quiescente ou hipóxico no caso de modelos tumorais (GODUGU *et al*, 2013; EDMONDSON *et al*, 2014; ZANONI *et al*, 2016; MOSAAD *et al*, 2018).

Nos modelos bidimensionais tradicionais, a maioria das linhagens tendem a aderir à superfície do plástico dos materiais de cultura, devido a moléculas de adesão presentes na membrana das células e às interações eletrostáticas com os materiais utilizados no cultivo. Com relação as células tumorais um dos fatores que afetam seu desenvolvimento é o estresse celular proporcionado pela superfície rígida do plástico utilizado para cultivo das células em monocamada. Esse estresse afeta a proliferação celular e consequentemente a sensibilidade das células à resposta a medicamentos antitumorais, cuja ação é sobre células em proliferação (EDMONDSON *et al*, 2014; MOSAAD *et al*, 2018).

Ao criar uma estrutura celular em 3D é necessário obter uma organização espacial adequada das células para produção da matriz extracelular e manutenção da estrutura, com essa finalidade também são utilizados métodos que auxiliam na formação desse modelo. Esses métodos têm sido favorecidos pela utilização da nanotecnologia (HO *et al*, 2013; EDMONDSON *et al*, 2014; CESARZ & TAMAMA, 2016; DU *et al*, 2017; MOSAAD *et al*, 2018).

A nanotecnologia é um campo científico multidisciplinar de grande importância na sociedade atual por sua aplicabilidade em diversos setores tecnológicos e de pesquisa, desenvolvimento e inovação. É uma área que vêm se desenvolvendo rápido nas últimas décadas pelo uso de nanopartículas que proporcionam um menor uso de matéria prima, e os recentes avanços da área têm também proporcionado desenvolvimento significativo na área da engenharia de tecidos (OLIVEIRA *et al*, 2015; GOMES, 2008).

Os trabalhos na área de materiais nanoestruturados para aplicações na engenharia de tecidos se baseiam no princípio de que essas nanoestruturas podem ser sintetizadas e utilizadas em dimensões semelhantes às dos constituintes dos próprios tecidos (GOMES, 2008). A utilização de forças magnéticas é um meio para obtenção de uma estrutura celular tridimensional mais organizada livre de suporte e ocorre pela internalização de nanopartículas magnéticas ou adsorção das nanopartículas à superfície celular (SENSENIG *et al*, 2012; JEONG *et al*, 2016; DU *et al*, 2017).

As nanopartículas paramagnéticas de óxido de ferro (*PIONs*, do inglês *Paramagnetic Iron Oxid Nanoparticles*) possuem propriedades magnéticas únicas e tamanho da ordem de dezenas de nanômetros, portanto menores ou comparáveis ao tamanho de uma célula, de um vírus, de uma proteína ou de um gene. Apresentam baixa toxicidade e aplicação generalizada, principalmente na área biomédica (diagnóstico e terapia clínica, hipertermia fluido magnética, bioseparação magnética e detecção de componentes biológicos) e farmacêutica (liberação controlada de fármacos) (WU *et al*, 2008; SARGENTELLI & FERREIRA, 2010; SOARES *et al*, 2015; ALZAIDE *et al*, 2016).

Essas nanopartículas necessitam ser associadas com outros materiais, como biopolímeros, moléculas orgânicas ou inorgânicas, sílica, metais, carboidratos ou até mesmo lipídeos. Tais materiais proporcionam às partículas propriedades funcionais, como adsorção às membranas celulares e retenção de outras moléculas para carreamento, uma vez que sozinhas apresentam poucas propriedades de superfície (WU *et al*, 2008). Devido a essas características os nanomateriais paramagnéticos, quando funcionalizados adequadamente, podem ser utilizados para construção de esferoides celulares com aplicabilidade na área da Toxicologia *in vitro*. Além disso, o investimento nesses estudos pode resultar em melhoria da eficiência dos cultivos celulares, com possibilidade de redução de custos devido a utilização de reagentes

de baixo custo e equipamentos acessíveis (HUTCHINSON & KIRK, 2011; GODUGU et al, 2013).

Com o cultivo celular tridimensional é possível mimetizar a fisiopatologia de tumores utilizando linhagens celulares específicas. De maneira geral os tumores se formam espontaneamente, multiplicam-se de forma descontrolada e as células cancerosas são menos especializadas nas suas funções do que as normais (INCA, 2020a). O câncer de próstata, por exemplo, é o segundo mais comum no Brasil em homens, de acordo com o Instituto Nacional do Câncer (INCA) (INCA, 2020b). Dentre as linhagens celulares de câncer de próstata está a LNCaP, uma linhagem estabelecida e de fácil manipulação, muito utilizada como modelo representativo de tumor prostático humano para ensaios pré-clinicos (SPANS *et al*, 2014).

Nesse cenário, verifica-se a importância da utilização de um modelo biológico tridimensional *in vitro* construído a partir de células de câncer de próstata, para testes de fármacos com atividade antitumoral, incluindo a utilização de um produto de menor complexidade e de baixo custo, com potencial para geração de inovação tecnológica. O estudo das nanopartículas e da viabilidade biofuncional do modelo tridimensional, não só contribui para a necessidade de modelos celulares reprodutíveis *in vitro* para testes de fármacos, como também com o desenvolvimento científico e tecnológico no Brasil.

2 **OBJETIVOS**

2.1 Objetivo geral

Este trabalho tem como objetivo estudar as propriedades biofuncionais de esferoides celulares construídos a partir de células tumorais com nanopartículas magnéticas de óxido de ferro biofuncionalizadas, para aplicação em tecnologias *in vitro* alternativas e avaliação da eficácia e segurança de candidatos a fármacos.

2.2 Objetivos específicos

- Padronização do protocolo de síntese de nanopartículas magnéticas de óxido de ferro em suspensão.
- Caracterização das nanopartículas magnéticas de óxido de ferro.
- Construção dos esferoides a partir das nanopartículas de óxido de ferro.
- Estudo da estrutura celular do esferoide.
- Avaliação histológica dos modelos tridimensionais.
- Teste de citotoxicidade, avaliando potencial tóxico de substâncias farmacológicas de ação conhecida.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Métodos Alternativos ao uso de animais

Há muito tempo os modelos animais são utilizados na avaliação toxicológica de fármacos e substâncias e a preocupação com o bem-estar dos animais utilizados nesses testes tornou-se cada vez mais proeminente. Em 08 de outubro de 2008, em homenagem ao médico sanitarista e político brasileiro Antônio Sérgio da Silva Arouca, foi promulgada a Lei 11.794/08, conhecida como Lei Arouca (MORETTO & STEPHANO, 2019).

Na área regulamentadora essa lei foi um marco no trabalho com animais em pesquisa. Após a promulgação dessa lei, foi criado no Brasil o Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), ligado ao Ministério da Ciência Tecnologia e Inovações (MCTI), responsável por estabelecer regras para o uso humanitário de animais com finalidade de ensino e pesquisa científica, assim como o credenciamento de instituições que desenvolvem atividades nessa área. A partir deste Brasil acompanha mundial da marco 0 0 progresso área de bioterismo/experimentação animal, a legislação brasileira equiparou-se à de outras nações que já haviam desenvolvido normativas a respeito, a exemplo do ECVAM (Centro Europeu de Validação de Métodos Alternativos, do inglês European Centre for the Validation of Alternative Methods) criado em 1991 em virtude da proteção dos animais utilizados para fins experimentais e outros fins científicos, com o objetivo de apoiar o desenvolvimento, a validação e a aceitação de métodos que possam reduzir, aperfeiçoar ou substituir a utilização de animais de laboratório (MARAFANTE & BALLS, 1994; MCTI, 2016; MORETTO & STEPHANO, 2019). No Brasil a validação de métodos alternativos é baseada nos guias da OECD (Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico, do inglês Organization for Economic Cooperation and Development), onde o Brasil está envolvido pelo desenvolvimento e utilização de métodos alternativos in vitro para produtos químicos (OECD, 2018).

Atualmente, o interesse no desenvolvimento de métodos alternativos ao uso de animais vem crescendo. Tais aprimoramentos vêm sendo amplamente discutidos por diversas esferas científicas e governamentais. Nesse contexto, com a demanda cada vez mais urgente da sociedade em relação ao uso de animais em pesquisa e em função da variabilidade genética apresentada pelas espécies de animais experimentais em relação à espécie humana, vários métodos de ensaio *in vivo* estão sendo substituídos por metodologias alternativas *in vitro* (MORETTO & STEPHANO, 2019). Dentre as metodologias alternativas *in vitro* a cultura de células é o principal modelo. Essa técnica, comparada a experimentação animal, é de menor custo. Estima-se que, em média, o custo dos métodos alternativos seja cerca de 30% do valor da pesquisa em animais, além da economia de espaço, uma vez que para testes em animais é necessária toda uma estrutura de biotério, como estantes, caixas, alimentação, controle de ambiente etc. O cultivo de células também permite maior controle do microambiente, como pH, temperatura, osmolaridade e concentração de nutrientes, são fáceis de preservar congelados em temperaturas ultrabaixas e de reprodução relativamente fácil, possibilitando que o número de replicatas possa ser aumentado substancialmente e o tempo de condução dos testes reduzido (CERQUEIRA, 2008).

3.2 Cultura de Células em monocamada (2D)

Cultivos celulares extracorpóreos são utilizados há décadas com o intuito de se criar um microambiente que de alguma forma mimetize funções celulares vitais. Os primeiros estudos voltados para o desenvolvimento de monocamadas para o cultivo de tecidos têm início em 1800 e tem como foco o estudo da morfologia celular. Alguns anos mais tarde, em 1878, Claude Bernard estudou a regulação das atividades teciduais, dando mais importância ao ambiente interno dos tecidos vivos. Em 1885, foi conduzido por Wilhelm Roux o primeiro experimento com cultivo de tecidos, em que foi transferida a placa neural de um embrião de galinha para uma solução salina aquecida. Esse experimento provou que o fechamento do tubo neural é uma função primária de seu constituinte celular e não um efeito mecânico direto por pressão exercida pelas estruturas adjacentes, como se supunha anteriormente. Desde então, diversos pesquisadores estudaram o comportamento celular in vitro. Em 1907, Ross G. Harrison, demonstrou a origem da fibra de tecido nervoso, ao transplantar os fragmentos de medula espinhal de girino para outros locais do corpo do embrião, mostrando que na parede da fibra sempre se desenvolvia tecido vivo e organizado. Com este trabalho, Harrison foi reconhecido como o pioneiro na cultura de células.

Em continuidade a essas pesquisas iniciou-se os estudos por técnicas assépticas de cultivo onde foi possível manter células em cultura por mais tempo (ASSIS, 2002; FRESHNEY, 2010). Desde então diversos pesquisadores aprimoraram as técnicas de cultivo de células.

Atualmente, células em cultura são uma importante ferramenta no processo de descoberta de novas drogas, pesquisas com células tronco e engenharia de tecidos. Em ensaios pré-clinicos são utilizadas principalmente na triagem de compostos candidatos a fármacos e na avaliação de eficácia e segurança de drogas antes de entrarem no mercado (SOUZA, 2010; PHUNG, 2011; BRESLIN *et al*, 2013). Ensaios baseados em cultura de células estão em constante desenvolvimento, e podem ser utilizados em uma diversidade de ensaios devido à variedade de células de tecidos animais que se encontram criopreservados e disponíveis para uso (ASSIS, 2002; FRESHNEY, 2010).

O cultivo de células mais tradicional utilizado em muitos testes padronizados e validados pela OECD, *Food and Drug Administration* (FDA) e pela Farmacopeia é o cultivo de células em monocamada. A cultura de células em monocamada ou em 2D é conduzida pelo crescimento celular em uma superfície plana, geralmente de poliestireno, que promovem sustentação mecânica na qual as células crescem aderidas a superfície. Desta forma, as células crescem lado a lado e ficam expostas de maneira uniforme aos nutrientes e fatores de crescimento presentes no meio de cultivo a qual são submetidas. Isso permite que as células apresentem crescimento e proliferação homogêneos o que torna o sistema simples e eficiente (DUVAL, 2017; BRESLIN *et al*, 2013).

No contexto toxicológico, a triagem da toxicidade de drogas desempenha um papel importante no processo de desenvolvimento de medicamentos, pois é etapa anterior às etapas que envolvem experimentos em animais (GALLO, 2001; MCELVANY, 2009). Essa triagem atualmente é conduzida por meio de testes de citotoxicidade, onde se avalia a toxicidade de compostos para as células, permitindo uma avaliação das substâncias antes dos testes em animais, ou nos testes de genotoxicidade, onde se avalia a toxicidade de substâncias ao material genético celular, ou seja, danos ao DNA, dentre outras metodologias, padronizadas em guias e normas de órgãos regulamentadores. No entanto, por razões que começaram a ser avaliadas na primeira década do Século XXI, sua condução não é perfeita, e cerca de 80% dos compostos que comprovam certa ação *in vitro* falham em reproduzir os

mesmos efeitos em testes clínicos. No caso de drogas antitumorais, esta proporção é aumentada para 95% (HUTCHINSON & KIRK, 2011).

Desta forma, o uso do modelo 2D de cultivo de células se torna menos viável e muitos pesquisadores tem se dedicado a cultivar células sob diferentes condições e técnicas a fim de se aproximar ainda mais das condições *in vivo.*

3.3 Cultura tridimensional de células (3D)

O cultivo de células em monocamada (2D) foi usada por mais de um século como modelo in vitro para estudar respostas celulares a diversos estímulos positivos ou deletérios. Contudo, por mais que essas abordagens sejam bem aceitas e tenham avançado significativamente quanto ao entendimento do comportamento celular, evidências crescentes mostram que, em algumas circunstâncias, os sistemas 2D podem resultar em bioatividades celulares que divergem sensivelmente da resposta in vivo (DUVAL, 2017). Um dos primeiros pontos a ser avaliado quanto a cultura bidimensional de células e que afeta diretamente suas respostas aos estímulos é sua forma e geometria, que são alteradas quando as células crescem em substratos planos. O crescimento celular nessas condições resulta no crescimento das células lado a lado e em uma adaptação das células ao ambiente a que estão submetidas. Desta forma, ocorre um remodelamento e um achatamento do citoesqueleto celular (KNIGHT & PRZYBORSKI, 2015). Apesar das células terem a capacidade de se adaptar as condições a que são submetidas quando expostas a ambientes favoráveis, esse achatamento proporcionado pelo cultivo em superfícies planas afeta, consequentemente, a forma nuclear da célula e proporciona alterações na expressão gênica. Essas alterações, além da tensão do plástico sobre a membrana das células, promovem aumento das taxas de proliferação, diminuição das taxas de diferenciação celular e alterações na produção de matriz extracelular (KNIGHT & PRZYBORSKI, 2015; MOSAAD et al, 2018).

Quando se trata do cultivo de células tumorais, fatores importantes nas alterações celulares podem ser considerados. Características importantes das células cancerígenas não podem ser modeladas adequadamente em culturas 2D - respostas celulares a determinados estímulos não mimetizam o ambiente *in vivo*, e resultados de estudos indicam que as células quando cultivadas em 2D tendem a ser mais

sensíveis a determinadas drogas devido a uma maior exposição a substância (MOSAAD *et al*, 2018). Para superar essa limitação, novas plataformas de cultura de células 3D estão sendo criadas para mimetizar as condições *in vivo*, permitindo um ambiente de crescimento celular mais adequado para melhorar a acurácia na avaliação da segurança no processo de descoberta de drogas e no entendimento na morfogênese de tecidos (KNIGHT & PRZYBORSKI, 2015).

O cultivo de células em 3D vem se desenvolvendo ao longo dos anos. Consiste em fornecer um microambiente adequado para o crescimento, diferenciação e função celular ideais e a capacidade de criar construções semelhantes aos tecidos. Na Tabela 1 estão apresentadas as vantagens e desvantagens de cada sistema, sendo o cultivo em 3D o que proporciona mais benefícios, permitindo que as células cresçam com outros tipos de interferência do substrato, e mantenham sua forma, estrutura e função 3D normais com suporte e interferência exógena mínimos (Figura 1), além de promover a formação de interações mais complexas entre as células, melhorando a inter-relação entre elas (KNIGHT & PRZYBORSKI, 2015).

Outros trabalhos também demonstram a importância da matriz extracelular na organização das células e seus núcleos, portanto atuando na expressão gênica (LELIEVRE *et al*, 2017). O aumento da dimensionalidade da matriz extracelular em torno das células de 2D para 3D também impacta significativamente na proliferação, diferenciação, respostas mecânicas e na sobrevivência celular, fatores relevantes no cultivo das células em 3D e essenciais quando o assunto é o estudo de tumores e agentes carcinogênicos (DUVAL, 2017).

Cultura em 2D		Cultura em 3D	
+	Protocolos mais simples	Protocolos mais complexos	-
+	Alta reprodutibilidade	Risco de baixa reprodutibilidade	-
+	Requer uso básico de microscopia	Técnicas de imagem otimizadas	-
-	Menor interação célula-célula	Maior interação célula-célula	+
-	Baixa densidade celular	Densidade celular semelhante ao in vivo	+
-	Limitação no crescimento	Possibilidade de crescimento	+
-	Requer contato com o plástico	Contato mínimo com o plástico	+
-	Meio estático	Possibilidade de meio fluido	+
-	Constante suprimento de oxigênio e outros nutrientes	Gradiente de oxigênio e outros nutrientes	+
-	Menor funcionalidade comparado ao <i>in vivo</i>	Maior funcionalidade semelhante ao <i>in vivo</i>	+
-	Oportunidade limitada de co- cultura	Sistemas de co-cultura mais viáveis	+

Tabela 1 - Vantagens (+) e desvantagens (-) entre os sistemas de cultura 2D e 3D

Fonte: Adaptado de ESKES et al, 2017

Figura 1 - Representação esquemática do crescimento em 2D e em 3D de células. A largura e o comprimento são indicados por X e Y, respectivamente, e a altura representada por Z. O achatamento celular (*) pode ser observado, assim como as interações celulares restritas a periferia no cultivo em 2D (linha pontilhada).



Fonte: Adaptado de KNIGHT & PRZYBORSKI, 2015

Algumas drogas antitumorais usadas no tratamento do câncer atuam no processo de divisão celular, diminuindo a proliferação das células e reorganizando importantes funções para diferenciação celular. Desta forma, quanto mais sua fisiologia e organização celular se aproxima da verificada *in vivo*, mais sensíveis serão em tese as respostas celulares. Os testes clínicos feitos com agentes quimioterápicos têm como principal objetivo a avaliação do limiar de toxicidade dessas drogas, desta forma é de extrema importância a obtenção de dados fidedignos dos testes préclinicos *in vitro* (SILVA *et al*, 2018). Estudos demonstraram que testes *in vitro* com drogas antitumorais quando conduzidos em células cultivadas em 2D e 3D apresentaram resultados diferentes. Nestes estudos, concentrações menores de drogas foram necessárias para diminuir a viabilidade de células cultivadas em 3D nos mesmos níveis de viabilidade celular (MOSAAD *et al*, 2018).

Os esferoides tumorais estão em um patamar intermediário entre a cultura de células em monocamada e estruturas tumorais *in vivo* por proporcionar características semelhantes ao tumor (PHUNG *et al*, 2011). O microambiente tumoral possui diversas características específicas, como hipóxia, interação célula-célula, estrutura e composição da matriz extracelular dentre outras características que limitam a internalização de drogas antitumorais ao centro do tumor, mais distante dos vasos sanguíneos. Conforme demonstrado por Phung et al, 2011 (Figura 2), os esferoides apresentam um centro necrótico devido a diminuição da concentração de oxigênio e nutrientes no centro da estrutura, mais distante da superfície em contato com o meio de cultura. Desta forma a resposta a drogas também é semelhante aos tumores *in vivo*, pois a concentração da droga no interior da estrutura diminui.



Figura 2 - Representação esquemática dos componentes básicos de um tumor e de um esferoide tumoral.

Fonte: Adaptado de PHUNG et al, 2011.

Diversas são as técnicas usadas atualmente para o cultivo de células em 3D. Basicamente essas técnicas são mediadas por *scaffolds*, que servem de sustentação para as células, ou estruturas livres de *scaffolds*, em que as células crescem livres no meio de cultivo a que são submetidas. As técnicas baseadas em *scaffolds* são conduzidas por meio do cultivo das células em superfícies que simulem a matriz extracelular que dá suporte as células. As substâncias comumente utilizadas são os hidrogéis, substâncias naturais ou sintéticas, insolúveis em água, com microporos em sua estrutura que permitem o transporte de gases, nutrientes e fatores de crescimento, além do colágeno, fibrina e alginato. Essas substâncias são biocompatíveis e biodegradáveis. Contudo essa última característica pode ser uma dificuldade para o cultivo celular por ser uma variável difícil de controlar, além do sistema não proporcionar o microambiente ideal da matriz extracelular (KNIGHT & PRZYBORSKI, 2015; NATH & DEVI, 2017; TURKER, 2018).

As técnicas livres de scaffolds são as mais estudadas atualmente. Elas permitem a formação de esferoides celulares, estruturas em que as células crescem sustentadas pela própria matriz extracelular e sofrem menos interferências do meio externo (KNIGHT & PRZYBORSKI, 2015; ZANONI, 2016; TURKER, 2018). As técnicas livres de scaffolds estudadas para construção dos esferoides incluem gota suspensa, bioimpressão, reatores com agitação constante, levitação magnética, dentre outras (FERREIRA, 2018). A levitação magnética é uma das técnicas mais empregadas, por ser prática, mais simples de obter e permitir fácil manipulação dos esferoides. Ela consiste na utilização de nanopartículas magnéticas adsorvidas a membrana celular ou internalizadas pelas células, que permitem agregação das células na presença de um campo magnético, uma vez que as células não estão aderidas a superfícies das placas de cultura. As células são mantidas na presença do campo magnético até a adequada produção de matriz extracelular (Figura 3), condição variável para cada tipo celular. O campo magnético, produzido por um imã, permite que os esferoides sejam carregados pelo imã, facilitando a manipulação dessas microestruturas, incluindo troca de meio de cultivo e exposição a substâncias (HAISLER et al, 2013).



Figura 3 - Imagem ilustrativa da construção do esferoide por levitação magnética.

As células cultivadas podem ser levitadas para a interface ar-líquido, nessa condição, as células interagem e se agregam em estruturas maiores enquanto sintetizam proteínas da matriz extracelular, como colágeno, fibronectina e laminina. No geral, essa técnica pode ser usada para criar culturas de células 3D com matriz

Fonte: Adaptado de SOUZA, 2010.

extracelular fisiologicamente relevante. Além disso, os componentes específicos deste método não apresentam toxicidade, não afetam a proliferação e não induzem uma resposta inflamatória pelas células cultivadas (HAISLER *et al*, 2013).

Em comparação com outros métodos, a aplicação biológica de forças magnéticas apresenta baixo custo, uma vez que não exige a fabricação de suportes complexos, é possível obter os esferoides em baixo tempo de cultivo e o meio de cultura utilizado é o mesmo requerido no cultivo em 2D (SOUZA, 2010; HAISLER *et al*, 2013). As nanopartículas utilizadas no processo não são difíceis de obter, são compostas por materiais que conferem característica magnética, geralmente ferro associados ou não com outros componentes, como o ouro e a prata, e com aminoácidos ou polímeros que auxiliam na funcionalidade da nanopartícula em carrear as células por adsorção das nanopartículas por forças eletrostáticas (SOUZA, 2015; TSENG, 2018; BONFIM *et al*, 2019).

3.4 Nanopartículas paramagnéticas de óxido de ferro (PIONs)

Atualmente, a nanotecnologia é umas das mais promissoras tecnologias por contribuir de forma muito positiva em diversas áreas da ciência, tais como farmacêutica, biomédica e biotecnológica, por meio da aplicação de nanopartículas. As nanopartículas são idealmente estruturas com menos de 100 nm (1 nm = 10^{-9} m) e podem ser produzidas a partir de diferentes materiais em diferentes formas, como esferas, hastes, fios e tubos (LIU, 2006; BAYDA, 2019). Podem ser classificadas, com base no tipo de material em nanopartículas metálicas, semicondutoras e poliméricas (LIU, 2006).

As nanopartículas magnéticas estão inseridas na classificação das nanopartículas metálicas e apresentam muito potencial em várias aplicações devido às propriedades únicas do material (LIU, 2006; SRINIVASAN, 2018). As propriedades físico-químicas, como a alta área de superfície em relação ao volume e a viabilidade da funcionalização da superfície, tornaram as nanopartículas magnéticas uma ferramenta atraente em aplicações biomédicas. É possível controlar com precisão o comportamento do material com a aplicação de um campo magnético externo, característica que permite a produção de biossensores, distribuição direcionada de fármacos, hipertermia ou engenharia de tecidos (SRINIVASAN, 2018).

Os óxidos ferroso e férrico (compostos por ferro divalente e trivalente, respectivamente) são os principais constituintes das nanopartículas magnéticas, embora também sejam empregados metais como ouro, cobalto, níquel e manganês (BERRY, 2009; SARGENTELLI & FERREIRA, 2010). Na sua forma mais básica, as nanopartículas magnéticas aplicáveis na área biomédica, compreendem um núcleo inorgânico e um revestimento de superfície biocompatível que fornece estabilidade em condições fisiológicas. Uma grande variedade de substâncias pode ser usada como material de revestimento, elas incluem polímeros sintéticos ou naturais (por exemplo, dextran, proteínas ou aminoácidos) e moléculas anfifílicas, como ácidos graxos ou fosfolipídios (BERRY, 2009). Entre os diferentes nanomateriais magnéticos, a magnetita (Fe_3O_4) e a maguemita (Fe_2O_3) são amplamente estudadas por apresentar baixíssima toxicidade e por serem biocompatíveis, sendo inclusive, um tipo de nanopartículas magnéticas utilizadas para aplicação em exames de imagem e aprovadas para uso clínico pelo FDA (LAURENT et al, 2011; ARAMI et al, 2015; BONFIM et al, 2019). As nanopartículas de óxido de ferro pertencem a classe de materiais paramagnéticos, por possuírem íons cujos momentos magnéticos se alinham na presença de um campo magnético, mas não há uma interação forte entre esses momentos (Figura 4). Desta forma, nanopartículas paramagnéticas de óxido de ferro respondem a um campo magnético, mas não apresentam magnetismo próprio (ZHANG, 2007; CALISTER et al, 2007; DADFAR et al, 2019).

Figura 4 - Representação do comportamento magnético de um material paramagnético na ausência e na presença de um campo magnético externo *(H).*

 $H = 0 \qquad \qquad H \\ \hline H = 0 \qquad \qquad H = 0 \qquad \qquad H \\ \hline H = 0 \qquad \qquad H \\ \hline H = 0 \qquad \qquad H = 0 \qquad \qquad H \\ \hline H = 0 \qquad$



Os *PIONs* podem ser sintetizados por várias técnicas, sendo a escolha do método uma maneira de garantir controle sobre a forma, tamanho, distribuição de

tamanhos e cristalinidade das partículas. Abordagens químicas são empregadas na maioria dos casos. Dentre elas está a co-precipitação, uma síntese simples e eficiente, baseada na precipitação simultânea de soluções salinas aquosas de Fe²⁺ e Fe³⁺ por meio da adição de uma base fraca ou forte em temperatura ambiente ou elevada. A maioria dos *PIONs* disponíveis comercialmente são sintetizados por esse método (FRANCISQUINI *et al*, 2014; DADFAR *et al*, 2019). O tamanho, a forma e a composição das nanopartículas dependem do tipo de sais utilizados (como, cloretos, sulfatos, nitratos), da temperatura, do valor do pH e da força iônica dos meios (FRANCISQUINI *et al*, 2014). A exemplo da reação química de formação da Fe₃O₄ pode ser escrita como na equação abaixo:

 $Fe^{2+} + 2Fe^{3+} + 8OH^{-} \longrightarrow Fe_3O_4 + 4H_2O$

3.5 Funcionalização das nanopartículas com aminoácidos

A adsorção de moléculas orgânicas e biomoléculas na interface sólido / líquido de superfícies inorgânicas é um fenômeno comum na natureza. As nanopartículas de óxido de ferro são inertes e apresentam superfície de contato favorável para a ligação de outras moléculas. A ligação de moléculas orgânicas à superfície de nanopartículas não afeta o estado químico e as propriedades físicas do adsorvente, sendo esse um bom recurso para aplicações industriais, e esse processo pode ser aplicado no tratamento de águas residuais, mineração, produção de alimentos e purificação de produtos farmacêuticos (SCHWAMINGER, 2013).

Embora o tamanho dos cristais de óxido de ferro determine as propriedades magnéticas das nanopartículas, as moléculas adicionais em sua superfície atuam como a principal interface entre os *PIONs* e o meio de interação (ARAMI *et al*, 2015). Grupos funcionais como amino, metil, carboxi, citrato e guanidina são usados para funcionalizar nanopartículas a fim de conferir propriedades funcionais especiais. Os aminoácidos por si só oferecem um grupamento amino e um terminal carboxi para a conjugação de biomoléculas importantes. Eles também fornecem maior biocompatibilidade e são projetados para superar alguns dos desafios associados ao tamanho, biodistribuição e interação com células (CHAKRABORTY, 2017).

A Glicina é um dos aminoácidos utilizados de diferentes formas na funcionalização de nanopartículas, principalmente associada a outras moléculas.

Consiste em uma molécula curta com um grupo carboxila (COOH), facilmente adsorvida na superfície do óxido de ferro, e grupos amina (NH₂) na superfície que poderiam interagir com o meio a que estão inseridos (Figura 5). O potencial das nanopartículas magnéticas funcionalizadas com amina já é evidenciado, principalmente na remoção magnética de contaminantes orgânicos (ARRIORTUA *et al*, 2018; CHAKRABORTY, 2019).

Na área farmacêutica a glicina pode ser usada como excipiente em medicamentos, é vantajosa em termos de custo, disponibilidade, baixa higroscopicidade, apresenta excelente estabilidade física e solubilidade em água. Devido a essas características a glicina quando aplicada à funcionalização de nanopartículas atua como quelante, mantendo a síntese das nanoestruturas mais estável (ARRIORTUA *et al*, 2018; CHAKRABORTY, 2019).

Figura 5 - Estrutura molecular da Glicina.

H₂N

Fonte: Sigma-Aldrich®, 2020a

Outro grupo de moléculas utilizadas na funcionalização de nanopartículas de óxido de ferro é a Poli-L-lisina. O grupo de poli aminoácidos, ao qual a Poli-L-lisina está inserida, tem como uma das funções facilitar a ligação de células e proteínas a superfícies sólidas em aplicações biológicas. Isso ocorre devido a melhora na interação eletrostática entre os íons com carga negativa da membrana celular e os íons de superfície com carga positiva dos fatores de fixação. Quando adsorvidos na superfície de estruturas, aumentam o número de locais carregados positivamente disponíveis para a ligação celular (SIGMA-ALDRICH[®], 2020b).

A Poli-L-lisina é um polímero de aminoácidos composta pela ligação de várias outras moléculas de lisina (Figura 6) e apresenta carga positiva devido a presença de aminas na superfície. Para cada resíduo de lisina da molécula existe aproximadamente um resíduo HBr, que permite que a poli-L-lisina seja um sólido cristalino e solúvel em água (SIGMA-ALDRICH[®], 2020b; SIGMA-ALDRICH[®], 2020c).
Figura 6 - Estrutura molecular da Poli-L-Lisina.



Fonte: Sigma-Aldrich[®], 2020b

Devido a molécula ser longa, ela apresenta uma grande quantidade de aminas livres nas extremidades, o que confere uma grande quantidade de cargas positivas disponíveis em pH fisiológico. Essa característica é bastante favorável quando se trata da funcionalização de nanopartículas para aplicação em cultivos celulares em 3D, uma vez que as nanopartículas adsorvem na membrana das células devido a diferença de carga (TSENG, 2018).

3.6 Caracterização físico-química de nanopartículas magnéticas

Os métodos físico-químicos são amplamente utilizados na indústria farmacêutica para caracterização de substâncias sólidas. Algumas propriedades físico-químicas influenciam no comportamento de biomoléculas em seu estado sólido. Dentre essas propriedades estão, tipo e tamanho de cristalito, área de superfície e propriedades térmicas, muito importantes na pesquisa e desenvolvimento (TRIVEDI *et al*, 2017).

3.6.1 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

A microscopia eletrônica é uma das mais versáteis técnicas disponíveis para a observação e análise de propriedades morfológicas de materiais em escalas micro e nanométricas (FRANCISQUINI *et al*, 2014). A microscopia eletrônica de transmissão é uma das ferramentas mais efetivas no estudo das superfícies de estruturas e pode

definir o tamanho das nanopartículas de forma precisa. Essa técnica usa feixes de elétrons para obtenção das imagens, fornecendo maior resolução e mais detalhes, como informações sobre a estrutura cristalina e a granularidade de uma partícula. As imagens são formadas por elétrons transmitidos através da amostra e focados por uma lente objetiva, que é detectada por uma câmera e exibida em uma tela (GALLETI, 2003; MANAIA ET AL, 2017; JOSEPH & SINGHVI, 2019). Essas técnicas oferecem poder de alta resolução permitindo o alcance de valores da ordem de dois a cinco nanômetros. Outra característica importante é a aparência tridimensional da imagem das amostras, resultado direto da grande profundidade de campo (FRANCISQUINI *et al*, 2014).

3.6.2 Difração de Raios-X (DRX)

Por outro lado, a principal técnica de caracterização estrutural de materiais cristalinos é a Difração de Raios-X, que é uma técnica de caracterização de materiais a partir do arranjo e distribuição dos átomos nas estruturas cristalinas. Foi desenvolvida em 1912 pelo físico Max von Laue e sua principal função é na identificação e refinamento de estruturas cristalográficas dos materiais em estudo, sejam eles orgânicos ou inorgânicos (FONSECA FILHO & LOPES, 2013; FRANCISQUINI *et al*, 2014; NARDINO, 2018).

A técnica consiste na emissão de um feixe de raio-x monocromático a um determinado ângulo sobre a superfície de uma substância cristalina. Uma parte da onda da radiação emitida, após atingir a amostra, é refletida e uma parte da energia transportada pela onda é absorvida. A onda é então reemitida em várias direções como uma radiação secundária. Esse espalhamento da onda proporcionado pela interação eletrostática entre o feixe de raio-x e a superfície cristalina é denominado difração (FONSECA FILHO & LOPES, 2013; NARDINO, 2018).

Cada substância cristalina apresenta uma distribuição de planos de átomos característico, orientados de forma distinta sob distâncias interplanares diferentes, na presença de um feixe de raio-x essa distribuição atômica que apresenta um padrão de obstáculos gera um padrão de interferências e intensidades entre o material cristalino e as ondas emitidas sobre ele. Esse padrão de interferências característico é detectado por uma chapa fotográfica e então é possível deduzir a estrutura cristalina através do padrão de difração (FONSECA FILHO & LOPES, 2013; ANVISA, 2019).

A análise de difratogramas obtidos a partir da técnica de DRX permite distinguir os diferentes arranjos dos átomos nas substâncias sólidas. É possível determinar a estrutura de moléculas dentro da rede cristalina, fornecendo informações essenciais sobre a modificação cristalina (MARTINS, 2010). O tamanho do nanocristal pode ser determinado pela equação de *Scherrer*, uma relação entre o comprimento de onda da radiação emitida, o ângulo de reflexão de Bragg, largura e uma constante "K", que depende de vários fatores como a geometria do cristalito (JOSEPH & SINGHVI, 2019).

3.6.3 Potencial zeta

Além das características intrínsecas da estrutura cristalina, as nanopartículas funcionalizadas apresentam uma carga eletrostática de superfície. A carga da superfície e o potencial zeta das nanopartículas dependem da estrutura molecular do material de recobrimento. Por exemplo, espera-se uma carga positiva para *PIONs* com um número maior de grupos amina, enquanto os grupos hidroxil, sulfato e carboxil geralmente contribuem para uma carga negativa (ARAMI *et al*, 2015). O potencial zeta é uma técnica de caracterização significante usada como parâmetro para estimar a carga superficial das nanopartículas e a estabilidade física da suspensão. No entanto, é importante observar que esse parâmetro é calculado a partir da velocidade das nanopartículas. As diferentes densidades de carga na superfície dos *PIONs* podem alterar suas interações eletrostáticas com as proteínas circundantes e membranas celulares (ARAMI *et al*, 2015; JOSEPH & SINGHVI, 2019).

O parâmetro para avaliação do potencial zeta é -30 mV a +30 mV. Nanopartículas com medições dentro desse limite apresentam maior instabilidade em soluções aquosas e resultam em agregação devido as forças de van der Waals que agem sobre elas. Valores abaixo de -30 mV ou acima de +30mV indicam boa estabilidade física devido a repulsão eletrostática das partículas (JOSEPH & SINGHVI, 2019).

3.6.4 Dispersão dinâmica da luz

Em conjunto com a avaliação do potencial zeta é possível determinar o tamanho hidrodinâmico das partículas. Tais análises quase sempre podem ser

conduzidas juntas, pois o tamanho hidrodinâmico da partícula é dependente das moléculas adicionadas na funcionalização, as quais são responsáveis pela carga de superfície atribuída as nanoestruturas. O tamanho hidrodinâmico é um dos parâmetros basais para a caracterização de nanopartículas de óxido de ferro e a determinação do diâmetro das partículas. Consiste na soma do tamanho do cristal e do tamanho das moléculas adicionadas para recobrimento, ele é determinado pela dispersão dinâmica da luz, do inglês *Dynamic Light Scattering (DLS)* que pode ser afetada pela concentração da suspensão ou do solvente utilizado (YANG, 2014).

3.6.5 Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier

Com a funcionalização das nanopartículas é possível avaliar a composição das estruturas usadas para recobrimento. A Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier do inglês *Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR)* é uma ferramenta de grande utilidade para a identificação das moléculas presentes na estrutura. As técnicas espectrofotométricas são fundamentadas na absorção da energia eletromagnética por moléculas, o que depende tanto da concentração quanto de suas estruturas químicas, possibilitam a identificação e a quantificação das substâncias em análise em um nível aceitável de certeza (AMORIM *et al*, 2013; ANVISA, 2019).

Os espectrofotômetros de infravermelho mais avançados utilizam um procedimento baseado na interferometria para produzir o espectro, técnica conhecida com Espectroscopia de Infravermelho com Transformações de Fourier. Nestes instrumentos, a radiação proveniente de uma fonte de infravermelho é dividida, de forma que o feixe reflita simultaneamente a partir de um espelho em movimento e de um espelho fixo, levando à interferência. Depois que os feixes se recombinam, eles passam através da amostra para o detector e são gravados na forma de um gráfico de tempo pela intensidade do sinal, chamado de interferograma. A superposição de comprimentos de onda e as intensidades de suas respectivas absorções são convertidas para um espectro aplicando-se uma operação matemática chamada de transformada de Fourier (AMORIM *et al*, 2013). As técnicas espectroscópicas de absorção no infravermelho exploram os modos vibracionais das moléculas. Bandas de absorção ou espalhamento da radiação na região do infravermelho podem ser

atribuídas a grupos funcionais e à conformação molecular, sendo, portanto, úteis na caracterização estrutural de formas cristalinas (MARTINS, 2010).

3.7 Adenocarcinoma Prostático Humano

No Brasil, o câncer de próstata é o segundo tipo mais comum de câncer entre os homens. Em valores absolutos e considerando ambos os sexos, é o segundo tipo mais comum. A taxa de incidência é maior nos países desenvolvidos em comparação aos países em desenvolvimento (INCA, 2020b). Apresenta crescimento lento e é considerado um câncer da terceira idade, por ser raro antes dos 50 anos de idade e por 75% dos casos no mundo ocorrerem a partir dos 65 anos. O aumento observado nas taxas de incidência no Brasil pode ser parcialmente justificado pela evolução dos métodos diagnósticos, pela melhoria na qualidade dos sistemas de informação do país e pelo aumento na expectativa de vida (AMORIM *et al*, 2013; INCA, 2020b).

De acordo com os dados mais recentes do INCA, em 2017 o número de mortes foi de 15.391 e a estimativa de novos casos para cada ano do triênio 2020/2022 sejam de 65.840 novos casos de câncer de próstata no Brasil. Esse valor corresponde a um risco estimado de 62,95 casos novos a cada 100 mil homens (INCA, 2020b).

Verificou-se que existia um padrão de proteína expressa, o PSMA (do inglês *Prostate Specific Membrane* Antigen), que foi detectada pela primeira vez na linhagem celular de carcinoma de próstata humana LNCaP. O PSMA é uma glicoproteína de membrana integral do tipo II que é expressa não somente em células LNCaP, mas também em quase todas as formações neoplásicas da próstata (LÜTJE, 2015; CARVALHO & VIEIRA, 2020). Nos últimos anos foram desenvolvidos vários agentes utilizados em imagem nuclear direcionados ao PSMA, dentre eles o PSMA-11 adequado para a coordenação do Gálio-68, um radioligante utilizado com sucesso em clínicas para imagens PET (Tomografia por emissão de pósitrons, do inglês *Positron Emission Tomography*) do câncer de próstata e o PSMA-617, um ligante estruturalmente modificado que permite a coordenação de radionuclídeos diagnósticos e terapêuticos (Figura 7). Os estudos clínicos realizados até o momento demonstraram o potencial promissor do PSMA-617 marcado com Gálio-68 e Lutécio-177 para ser usado no tratamento do câncer de próstata (UMBRICHT *et al, 2017;* CARVALHO & VIEIRA, 2020).



Figura 7 - Estrutura química das moléculas de PSMA-617 (a) e PSMA-11 (b)

Fonte: Adaptado de Umbricht et al, 2017

Essas substâncias foram desenvolvidas com aplicação direta a diagnóstico e terapia, desta forma podem apresentar toxicidade intrínseca. Como já mencionado, essas características exigem que essas substâncias sejam testadas antes do uso em pacientes a fim de garantir sua segurança, assim como substâncias carcinogênicas.

Dentre as substâncias que são utilizadas como agentes anticâncer está a Ciclofosfamida, um dos agentes anticâncer de maior sucesso já sintetizados, é amplamente utilizada como quimioterápico e nos esquemas de mobilização e condicionamento para transplante de sangue e medula óssea. Os ensaios clínicos iniciais da ciclofosfamida para o tratamento do câncer foram realizados em 1958 e, em 1959, tornou-se o oitavo agente anticâncer citotóxico aprovado pelo FDA (EMADI *et al*, 2009). É uma substância utilizada no tratamento do câncer que atua impedindo a multiplicação de células malignas no organismo e é um candidato a quimioterápico no tratamento do câncer de próstata.

3.8 Avaliação da citotoxicidade

Partindo do pressuposto que toda substância pode apresentar características tóxicas às células, é necessário entender os efeitos que uma substância pode causar. A citotoxicidade corresponde aos efeitos adversos provenientes da proliferação e função celular. Esses efeitos podem estar relacionados a integridade da membrana e

do citoesqueleto; alterações no metabolismo, na síntese e na degradação de constituintes celulares ou produtos, regulação de íons e na divisão celular (OECD/GD 129, 2010).

A avaliação da citotoxicidade está diretamente relacionada a alterações causadas a exposição a substâncias agressivas. O potencial regenerador das células é avaliado pelo crescimento celular e medido por meio de ensaios que avaliem a atividade metabólica e viabilidade celular. A sobrevivência celular após exposição a substâncias nocivas pode ser determinada pelo uso de corantes estabelecidos como o MTT, em que o resultado é obtido por meio da conversão enzimática do corante vital Tetrazólio MTT em sal azul de formazan (FRESHNEY, 2010).

Dentre outros corantes tetrazólicos está o MTS, um corante utilizado em conjunto com um acoplador de elétrons (PMS) que quando na presença de células viáveis é reduzido em um composto solúvel (formazan). Esta reação ocorre graças às enzimas que a mitocôndria produz durante seu processo de respiração. O corante é incorporado pelas células viáveis e convertido a formazan pela enzima desidrogenase. O formazan produzido pode ser mensurado por espectrofotômetro pela medição da absorbância a 490 nm (PROMEGA, 2012). O corante MTS é reduzido da mesma forma que o MTT, pela enzima desidrogenase presente na mitocôndria, que resulta na formação de cristais de formazan. A diferença e a vantagem da utilização do MTS é que os cristais formados a partir dele são solúveis em água e, portanto, o uso de solventes orgânicos não é necessário. Os solventes orgânicos são necessários quando o MTT é utilizado devido os cristais de formazan formazon formados a partir dele serem insolúveis, o que exige a utilização de solventes orgânicos, como o DMSO (BARLTROP *et al*, 1991; CORY *et al*, 1991; BUNGER, 2002).

Diversos testes de citotoxicidade já são conduzidos atualmente com o corante MTS, para testes de fármacos, biomateriais e dispositivos médicos, matérias-primas ou produto final, dentre outras substâncias aplicáveis, sendo esses testes conduzidos em cultura de células em monocamada (OCAMPO *et al*, 2016; ESTEVES-PEDRO *et al*, 2018). Normas regulamentadoras preconizam o uso de sais tetrazólicos, como a ISO 10993-5, parte de um conjunto de normas que padronizam a avaliação da biocompatibilidade de biomateriais e dispositivos médicos para gerenciar riscos biológicos (INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION, 2009). Esses documentos fazem parte da harmonização internacional da avaliação de uso seguro de dispositivos médicos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Síntese das nanopartículas

As nanopartículas foram sintetizadas utilizando a técnica de co-precipitação assistida por microondas, utilizando 3,25 mM de sulfato de ferro II heptahidratado (Fe₂SO₄.7H₂O, Sigma-Aldrich) como fonte de ferro divalente e 6,5 µM de Glicina (C₂H₅NO₂, Sigma-Aldrich) como quelante. Ambos foram dissolvidos em 90 mL de água ultrapura desoxigenada pela adição de nitrogênio gasoso (N₂) por 15 minutos anteriormente à adição dos reagentes. Sob agitação, foi adicionada vagarosamente uma solução de NaOH 2M (Alphatec) até a obtenção de pH 12. Em uma proveta o volume da solução foi ajustado para 100 mL, a mesma transferida para um frasco de vidro e mantida em micro-ondas (potência máxima: 930 W) por 2 minutos e 30 segundos. Nesse processo ocorreu a oxidação de parte do Fe²⁺ disponível em solução para Fe³⁺, sob ação da energia do micro-ondas, e posterior co-precipitação dos dois hidróxidos de ferro (divalente e trivalente) formados em pH alcalino, cristalizando-os em nanopartículas magnéticas (PARSONS *et al*, 2009).

Após aquecimento as nanopartículas foram lavadas com água ultrapura com o auxílio de um imã até obtenção de pH próximo a 7 (aproximadamente 4 lavagens) e para retirada de possíveis cristais de sulfato de sódio formados na reação. Após lavagens foram adicionados aproximadamente 15 mL de ácido acético (Merck) e a solução mantida em banho ultrassônico por 5 minutos para dispersão e protonação das aminas livres da glicina.

Após esse período a solução foi separada das nanopartículas com o auxílio de um imã e uma solução de bromidrato de poli-L-lisina a 0,02 µg/mL em água ultrapura a pH 7,0 foi adicionada vagarosamente às nanopartículas sob agitação em banho ultrassônico. Após esse processo, em fluxo laminar, a solução foi retirada com o auxílio de um imã e 2 mL de água ultrapura estéril adicionada para armazenagem em geladeira.

Para determinar a quantidade média de nanopartículas sintetizadas, foram realizadas três sínteses e cada uma mantida em estufa de secagem a aproximadamente 45°C em tubos de massa conhecida por aproximadamente 48

horas. Após secagem os tubos foram pesados e a massa de material por síntese foi obtida pela diferença de massa entre o tubo com as nanopartículas e o tubo vazio.

4.2 Caracterização das nanopartículas

4.2.1 Difração de Raio-X

Uma alíquota da suspensão de nanopartículas foi transferida para um frasco de vidro, a água retirada com o auxílio de um imã e 500 µL de álcool etílico (Alphatec) adicionado. Em seguida o álcool foi retirado e o frasco com as nanopartículas mantido aberto em estufa de secagem *overnight* a aproximadamente 45°C. Após secagem as nanopartículas de óxido de ferro funcionalizadas com glicina e poli-L-lisina foram avaliadas no Difratômetro Orion, modelo RKS-400SV-R (Capacidade de 0,40 / 0,49 kW, Corrente de 10,0 / 10,5 A) no Centro Multiusuário do Centro de Química e Meio Ambiente (CQMA) do IPEN / CNEN-SP. Os gráficos foram obtidos pelo software GraphPad Prism[®]. Os espectros foram analisados usando o software Qualx2 (ALTOMARE *et al*, 2015).

As amostras de nanopartículas de óxido de ferro não funcionalizadas também foram analisadas por DRX a fim de avaliar o efeito da funcionalização sobre o tamanho da nanopartícula. Essa análise foi realizada no Difratômetro D8 avançado de 3 kW (tubo de radiação Cu, goniômetro de 250 mm, 40 kV, 30 mA) do Centro Multiusuários do Centro de Combustível Nuclear (CCN) do IPEN / CNEN-SP.

Os padrões de pico obtidos foram comparados ao banco de dados COD (Crystallography Open Database) usando o software QualX2.0. O tamanho do cristalito foi calculado usando a equação de Debye-Scherrer, D = 0.9λ / β cos θ , onde D é o tamanho do cristal em nm e λ é o comprimento de onda do raio X, β é a meia largura do pico em rad e θ é o ângulo de difração correspondente (DOWNS & HALL-WALLACE, 2003; GRAŽULIS et al, 2009; GRAŽULIS et al, 2012; GRAŽULIS et al, 2015, MERKYS et al, 2016; QUIRÓS et al, 2018).

4.2.2 Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FT-IR)

Uma alíquota da suspensão de nanopartículas foi transferida para uma lâmina de microscópio e mantida em estufa de secagem *overnight* a aproximadamente 45°C. Após secagem o filme formado na lâmina foi raspado e o material foi processado em pastilha de KBr e analisado por transmissão no equipamento Shimadzu Prestige-21 (Shimadzu Corp., Kyoto, JP), com uma resolução de 2 cm na faixa de 4000 cm⁻¹ a 400 cm⁻¹, no Centro de Instrumentação para Pesquisa e Ensino da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP-Campus Diadema).

4.2.3 Potencial Zeta e Dynamic Light Scattering (DLS)

As amostras foram analisadas em solução, diluindo 15 µL da suspensão de nanopartículas em 1 mL de água ultrapura. Os resultados foram obtidos pelo Analisador de Partículas Litesizer 500 da Anton Paar, equipamento multiusuário do Centro de Tecnologia das Radiações do IPEN / CNEN-SP.

4.2.4 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

Para MET as amostras foram analisadas também em solução, diluindo 15 µL da suspensão de nanopartículas preparada em 1 mL de álcool isopropílico (Ecibra). Em seguida as amostras foram transferidas para uma grade de cobre revestida de carbono e analisadas pelo equipamento JEM 2100 (JEOL) no Laboratório de Microscopia a Microanálises do Centro de Ciência e Tecnologia dos Materiais, IPEN / CNEN-SP.

4.3 Cultivo das células

A linhagem celular utilizada nesse trabalho foi a LNCaP clone FGC (ATCC[®] CRL-1740[™]), células de adenocarcinoma de próstata humana, mantida rotineiramente no laboratório de Radiobiologia do Centro de Biotecnologia (CEBIO) do IPEN. Para cultivo dessa linhagem foi utilizado meio de cultura RPMI-1640

suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) (Gibco) e 1% de penicilina (10000 u) e estreptomicina (10 mg) em 0,9% de NaCl (Sigma-Aldrich).

As células foram cultivadas em condições assépticas, incubadas a 37°C e 5% de CO₂ sob atmosfera úmida e em garrafas de cultura (25 e 75 cm²) até as células atingirem a subconfluência de 80%. Para manutenção do cultivo celular e condução dos experimentos, as células foram descoladas do plástico pela ação da solução de tripsina-EDTA 0,25% (Sigma-Aldrich) por 5 minutos. Todos os experimentos foram conduzidos com células até a passagem 30 em meio RPMI-1640 (OCAMPO *et al*, 2016; BONFIM *et al*, 2019).

4.4 Quantificação do ferro nas nanopartículas em células LNCaP

Para determinar a quantidade de ferro presente nas nanopartículas utilizadas para construir os esferoides, foi realizado um ensaio colorimétrico quantitativo com 2,2'-bipyridil (C₁₀H₈N₂, Sigma-Aldrich), um ligante de íons metálicos, como ligante cromogênico (DEDA et al, 2017). A quantificação de ferro foi obtida a partir da construção de uma curva padrão (Figura 8) em que foram transferidas 2 x 10⁵ células LNCaP para microtubos. As células foram submetidas a um processo de lise com Triton X-100 0,01% (Sigma-Aldrich) e digestão com ácido cítrico 1M (Baker Analyzed). As amostras foram mantidas em banho-seco (Greiner bio-One) a 70°C overnight para completa digestão. Em seguida, foram adicionados ácido ascórbico 0,6 M (Merck), para redução do ferro, e NaOH 10M, para ajuste do pH. Foram transferidos 180 µL por poço dessa solução para uma placa de 96 poços e 10 µL por poço de sulfato ferroso (II) heptahidratado nas seguintes diluições: 10×10^{-3} M, 6×10^{-3} M, 4×10^{-3} M, 1,6 × 10⁻³ M, 0,64 × 10⁻³ M e 0,26 × 10⁻³ M. Amostras de células sem sulfato ferroso foram utilizadas como controle. O ensaio foi conduzido em sextuplicata para cada condição. Após essa etapa foi adicionado em cada poço 10 µL da solução de 2,2'-bipyridil, foi preparada uma solução estoque 1M em etanol e a solução de uso 0,06 M preparada em água ultrapura. Passados 20 minutos de incubação à temperatura ambiente foi feita leitura da placa a 520 nm por espectrofotometria no equipamento Multiskan (Thermo) do Centro de Biotecnologia (CEBIO) do IPEN.





Fonte: Adaptado de DEDA et al, 2017

Para análise da quantidade de ferro utilizada para construção dos esferoides foram semeadas células LNCaP em 2D com diferentes volumes de nanopartículas: 10, 5 e 2,5 μ L. Cada um desses volumes foi adicionado a 1 x 10⁶ células e dessas células 2 x10⁵ foram semeadas em uma placa de 24 poços em triplicata, ou seja, 3 poços para cada condição de nanopartículas com as células. A placa com as células foi incubada a 37°C e 5% de CO₂ por aproximadamente 24 horas. Após incubação os poços foram lavados com PBS sem EDTA e as células com as nanopartículas foram submetidas ao mesmo protocolo utilizado para a curva padrão, com a diferença de que as amostras foram mantidas por mais tempo em banho-seco para digestão completa das nanopartículas, para isso o conteúdo de cada poço da placa de 24 poços foi transferido para um microtubo. Para leitura da placa foi adicionado 190 μ L por poço, sendo que cada microtubo gerou dois poços na placa de 96 poços. Em seguida 10 μ L da solução de uso de 2,2'-bipyridil foi adicionada em cada poço e após 20 minutos de incubação foi realizada a leitura da placa por espectrofotometria (Figura 9).



Figura 9 - Esquema representativo da quantificação de ferro nas nanopartículas

Fonte: Adaptado de DEDA et al, 2017

4.5 Ensaio de Citotoxicidade das nanopartículas em cultivo em monocamada

As células foram tripsinizadas e semeadas em placas de 96 poços convencionais de cultura de células. Foram cultivadas 10⁵ células/mL em 100 µL por poço. A placa com as células foi incubada por aproximadamente 24 horas a 37°C e 5% de CO₂. Após incubação foram adicionadas as amostras de nanopartículas nas seguintes quantidades: 16, 8, 4, 2 e 1 µL da suspensão final de nanopartícula diluídos em quantidade suficiente para (q.s.p) 1mL de meio de cultura. Quantidades essas escolhidas a partir de testes preliminares. Uma amostra controle, composta apenas por nanopartículas, sem células, também foi adicionado para retirar qualquer interferência das nanopartículas na leitura da placa.

Como substância de referência foram utilizadas solução de cloreto de sódio (NaCl 0,9%) filtrada em membrana de 0,22 µm 1:5 em meio de cultura como controle negativo e extrato de Látex natural (obtidas de luvas de látex e esterilizadas em luz ultravioleta) a 0,2 g/mL como controle positivo. A concentração foi determinada conforme estabelecido pela *ISO 10993-12:2012 - Biological evaluation of medical devices — Part 12: Sample preparation and reference materials.* O controle positivo foi preparado pela incubação do látex natural em meio RPMI 1640 por aproximadamente 24 horas. Após incubação o extrato de látex foi filtrado em filtro de seringa 0,22 µm. Para controle do ensaio foi utilizado um controle de células. Foi adicionado a cada poço 100 µL de cada amostra, assim como das substâncias de referência. Em seguida a placa foi incubada por aproximadamente 24 horas a 37°C e 5% de CO₂.

Após incubação o meio de cultura foi removido das placas, os poços lavados com PBS sem EDTA e foi adicionado 20 µL de solução com MTS (CellTiter 96[®] AQueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay, Promega) a 2 mg/mL em DPBS e PMS (phenazine methosulfate, Sigma-Aldrich) a 0,92 mg/mL em DPBS, na proporção 20:1 em RPMI-1640, conforme protocolo do fabricante (PROMEGA, 2012).

Após 2 horas de incubação, a leitura da absorvância foi realizada por espectrofotometria no equipamento Multiskan (Thermo) no comprimento de onda de 490 nm. Para análise dos dados para determinação da viabilidade celular foi considerada a viabilidade relativa (porcentagem do controle), calculada pela média da absorbância de cada amostra dividida pela média da absorbância do controle de células e multiplicado por 100. O gráfico com as informações da viabilidade celular foi obtido por meio do programa estatístico GraphPad Prism[®] assim como a análise estatística, realizada por 2way-ANOVA seguida pelo teste de comparações múltiplas de Bonferroni.

As amostras foram consideradas com potencial citotóxico se a redução da viabilidade celular for maior que 30%, de acordo com a *ISO 10993-5:2009 - Biological evaluation of medical devices — Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity.*

4.6 Avaliação da adsorção das nanopartículas às células

Para avaliar a adsorção das nanopartículas, as células foram mantidas overnight em cultura com as nanopartículas a 37°C e 5% de CO₂. Foi incubada a proporção de 15 µL da suspensão de nanopartículas em aproximadamente 2 x 10⁶ células. Para isso as células foram mantidas em cultura até atingirem a subconfluência de 80% da garrafa, em seguida foram tripsinizadas e as nanopartículas adicionadas a suspensão celular. A suspensão com nanopartículas foi homogeneizada para garantir uma melhor adsorção das nanopartículas à membrana das células e em seguida transferida para uma garrafa de cultura de 25 cm². Após incubação as células foram fotografadas em microscópio óptico Nikon Eclipse Ts100 localizado no Centro de Biotecnologia (CEBIO) no IPEN.

As células com nanopartículas também foram submetidas a uma solução de Tri-hidrato de hexacianoferrato de potássio (II) 2% (K₄Fe(CN)₆.3H₂O; Sigma-Aldrich) e HCI 6% (Alphatec), na proporção 1:1. Essa solução na presença de Fe³⁺ forma ferrocianeto férrico, que apresenta coloração azul, conhecida como Azul da Prússia. Para isso as células foram fixadas com metanol (Aphatec) puro por aproximadamente 20 minutos e, em seguida, a solução de hexacianoferrato de potássio 2% e cloreto de sódio (HCI) 6% adicionada e incubada a temperatura ambiente por aproximadamente 30 min (BOUTRY *et al*, 2009). Após incubação as células foram fotografadas em microscópio óptico Nikon Eclipse Ts100.

4.7 Determinação da quantidade de células e tempo para coesão dos esferoides

Após incubação, as células com as nanopartículas foram tripsinizadas e semeadas em placas de 96 poços com repelência (Greiner Bio-One, Alemanha). Durante o plaqueamento das células, uma placa com 96 imãs foi mantida sob a placa de cultivo de 96 poços. Foram semeadas diferentes densidades celulares (1000, 5000, 10000, 20000 e 30000 células) a fim de determinar a quantidade inicial ideal de células por esferoide. Foi avaliado também o tempo necessário para que o esferoide permanecesse coeso na ausência do imã.

Desta forma as células cultivadas foram avaliadas diariamente por três dias consecutivos. O imã foi mantido em contato com os esferoides entre o primeiro e o segundo dia e retirado entre o segundo e o terceiro dia com o objetivo de visualizar a coesão do esferoide pela formação de matriz extracelular. Durante os três dias, os esferoides foram fotografados em campo claro com aumento de 10X por microscópio óptico Nikon Eclipse Ts100.

4.7.1 Avaliação das áreas dos esferoides

A partir da obtenção das imagens dos esferoides por microscopia óptica foi avaliada a área dos esferoides nos três dias consecutivos, para isso, as imagens foram analisadas com o software de edição ImageJ versão 1.53e. Para calibração das distâncias das imagens, foi utilizado o parâmetro de 0,483 µm/pixel, fornecido pela Nikon e específico para a combinação objetiva/câmera utilizada. Para correção da luminosidade, cada imagem foi submetida ao comando *"Background Correction"*, com raio de amostragem *("rolling ball radius")* de 50 pixels, sem suavização *("smoothing")* e especificando que o fundo é mais claro que a área de teste *("light background")*. Após correção, as imagens foram convertidas para o formato 8-bit em escala de cinza

e limiarizadas (*"Threshold"*) para destacar apenas a área em que as células se encontravam, descartando-se as áreas de fundo. As imagens foram então binarizadas e submetidas à análise das áreas delimitadas (*"analyze particles"*).

4.8 Construção dos esferoides

Foram semeadas 5 x 10^3 células em 100 µL de meio de cultura por poço em placas de 96 poços com repelência (Greiner Bio-One, Alemanha). Durante o plaqueamento das células, uma placa com 96 imãs foi mantida sob a placa de cultivo de 96 poços. A placa foi incubada a 37°C e 5% de CO₂.

Para avaliação do crescimento das estruturas, os esferoides foram corados com iodeto de propídio (IP) (Sigma-Aldrich) e Hoechst 33342 (Sigma-Aldrich) (50 e 5 µg/mL, respectivamente) diluídos em PBS, com incubação de 20 minutos a 37°C e 5% de CO₂. Os esferoides foram fotografados diariamente por até 10 dias para avaliação do seu crescimento. Para obtenção das imagens dos esferoides foi utilizado microscópio óptico de fluorescência Nikon Eclipse Ts100.

4.9 Avaliação da viabilidade dos esferoides

Após 8 dias de cultivo os esferoides foram corados com laranja de acridina (Sigma-Aldrich) ou corante Hoechst 33342 (Sigma-Aldrich) (50 e 5 μg/mL, respectivamente) e brometo de etídio (Sigma-Aldrich) ou iodeto de propídio (Sigma-Aldrich) (50 μg/mL) diluídos em PBS, com incubação de 20 minutos a 37°C e 5% de CO₂. Após incubação, os esferoides foram lavados com PBS e com o auxílio de uma micropipeta, transferidos para uma microplaca de 96 poços com superfície repelente às células e com laterais escuras (Greiner Bio-One, Alemanha). As imagens foram obtidas por microscopia de fluorescência *widefield* num equipamento *ImageXpress Micro Confocal High-Content Screening (HCS) Imaging System* (Molecular Devices) localizado no CENTD - *Centre Of Excellence In New Target Discovery* – Instituto Butantan, por microscopia de fluorescência *widefield* (High Content Imaging InCell Analyzer 2200, GE Lifesciences) do Centro de Facilidades para a Pesquisa (CEFAP) do Instituto de Ciências Biomédicas (ICB/USP) e por microscopia óptica de fluorescência Nikon Eclipse Ts100.

4.10 Teste com PSMA em esferoides

Foi considerado como base para o cálculo das concentrações do PSMA 617 a quantidade padrão de administração, que é 100 µg por pessoa (HOFMAN *et al*, 2018). Considerando o volume de sangue de um indivíduo adulto ser de aproximadamente 5,2 L conclui-se que a quantidade de PSMA 617 é de 18,44 pmol. Para o PSMA 11 foi utilizada como referência a quantidade utilizada pelo Centro de Radiofarmácia do IPEN/USP nos testes de marcação, que é de 20 µg, que por sua vez é muito próxima do utilizada em testes clínicos. Considerando este valor por pessoa, é obtida a molaridade de 4,07 pmol (KURASH *et al*, 2020). A partir desses valores, as quantidades de PSMA 617 foram extrapolados para mais e para menos, a fim de avaliar o efeito da molécula sobre os microtecidos. Na tabela 2 é possível observar todas as concentrações testadas. Os esferoides utilizados foram obtidos após 4 dias de cultivo, construídos conforme item 4.8 e a avaliação da viabilidade celular por MTS/PMS foi conduzida conforme item 4.5 assim como a análise estatística dos resultados. O ensaio foi conduzido em quadruplicata.

	PSMA 617 (pmol)	PSMA 11 (pmol)
100X	1843,81	406,15
50X	921,91	203,07
20X	368,77	81,22
10X	184,38	40,61
5X	92,19	20,31
2X	36,87	8,12
1X	18,44	4,07
0,5X	9,22	2,03
0,2X	3,69	0,81
0,1X	1.84	0.40

4.11 Teste de Controles Positivos em esferoides

Com o objetivo de avaliar substâncias candidatas a controle positivo nos esferoides foram testados Dodecil Sulfato de Sódio (SDS do inglês *Sodium Dodecyl*

Sulfate) e Dimetilsulfóxido (DMSO) em diferentes quantidades. As quantidades testadas foram baseadas em testes preliminares.

Molaridades de SDS (µM) – 10000; 5000; 2500; 1250; 625 e 312,5 Porcentagens de DMSO (%) – 40; 20; 10; 5; 2,5; 1,25 e 0,625

Foi conduzido um ensaio de viabilidade com esferoides a partir de 4 dias de cultivo. No quarto dia de cultivo o meio de cultura foi removido e foram adicionadas as soluções de SDS e DMSO preparadas em meio de cultura. O ensaio foi conduzido em triplicata e a placa incubada sem o imã a 37°C e 5% de CO₂ por aproximadamente 24 horas. Após incubação foi adicionado MTS/PMS e a leitura feita por espectrofotometria conforme exposto no item 4.5 assim como a análise estatística dos resultados.

4.12 Teste com ciclofosfamida

O ensaio em 2D foi conduzido conforme preconizado no item 4.5. As amostras de ciclofosfamida (*Cyclophosphamide monohydrate*, $C_7H_{15}Cl_2N_2O_2P.H_2O$, Sigma-Aldrich) para o ensaio foram preparadas a partir da quantidade máxima solúvel de 153,2 µM em meio de cultura (SIGMA-ALDRICH, 2020d). Para dissolução completa foi necessário manter a solução em banho ultrassônico por aproximadamente 5 minutos. Em ensaios anteriores foi verificada citotoxicidade próxima a zero da ciclofosfamida na concentração de 38,3 µM, desta forma foi conduzido o ensaio de citotoxicidade com as seguintes molaridades: 38,3; 34,5; 30,6; 26,8; 23,0; 19,2 e 15,3 µM. Foram conduzidos dois ensaios independentes em quadruplicata. O potencial citotóxico da ciclofosfamida foi determinado pela redução da viabilidade celular em 10% (OCAMPO *et al*, 2016).

O ensaio em esferoides (3D) foi conduzido a partir do quarto dia de cultivo. As mesmas concentrações de ciclofosfamida do ensaio em 2D foram testadas em 3D. Em esferoides foi avaliada a viabilidade celular com MTS/PMS e com o reagente CellTiter-Glo[®] 3D (Promega), um reagente com capacidade lítica que permite determinar, por luminescência, a viabilidade celular pela quantificação de ATP. Nesse processo, após incubação da placa com ciclofosfamida e remoção da substância, foi

adicionado 100 µL do reagente CellTiter-Glo[®] 3D em cada poço da placa de 96 poços com os esferoides. A solução foi homogeneizada no poço por aproximadamente 5 minutos para induzir a lise celular. Após esse processo a placa foi mantida coberta por aproximadamente 25 minutos à temperatura ambiente para estabilizar o sinal luminescente e a medição da luminescência realizada. Os valores de IC₅₀ apresentados foram obtidos por meio do software GraphPad Prism[®].

4.13 Análise histológica

Os esferoides foram cultivados conforme preconizado no item 4.8 e no quarto dia de cultivo foram expostos ao NaCl 5%, DMSO 40% e a Ciclofosfamida na molaridade relativa à IC₅₀ (concentração inibitória de 50% das células em cultura). Após 24 horas de exposição na ausência do imã as amostras foram retiradas dos poços e formaldeído 4% adicionado sobre os esferoides. O formaldeído 4% foi mantido na placa de esferoides *overnight* em geladeira. Após esse período os esferoides foram adicionados a gotas de 50 µL de agarose de baixo ponto de fusão (1% em PBS) e mantidos em geladeira por aproximadamente 30 minutos para polimerização (Figura 10). Em seguida os esferoides em agarose foram transferidos para cassetes apropriados e submergidos em etanol 70% até processamento e microtomia.

Figura 10 - Imagens da preparação dos esferoides de LNCaP em gotas de agarose 1% em PBS para realização dos cortes histológicos



Fonte: autor da dissertação

Os cortes dos esferoides foram submetidos a coloração em Hematoxilinaeosina conforme protocolo conduzido pelo Setor de Técnicas Histológicas do Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento do Instituto de Ciências Biomédicas da USP. O material foi avaliado e fotografado em microscópio óptico Nikon Eclipse Ts100.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As nanopartículas de óxido de ferro foram sintetizadas pela técnica de coprecipitação assistida por micro-ondas. A utilização de micro-ondas permitiu a obtenção de nanopartículas de tamanho pequeno, em curto espaço de tempo, sendo o tamanho das nanopartículas mais homogêneo na suspensão e com alto grau de pureza. Essa vantagem pode ser atribuída a rápida nucleação permitida pelas microondas (PARSONS *et al*, 2009; LIAO *et al*, 2001).

As nanopartículas de óxido de ferro foram funcionalizadas com os aminoácidos glicina e poli-L-lisina (Figura 11), um fator inespecífico para as células, útil na promoção da adsorção celular a substratos sólidos. A poli-L-lisina foi adicionada para proporcionar carga global positiva na superfície das partículas, consequente adsorção à membrana celular (que apresenta carga negativa) e melhorar a estabilidade e a biocompatibilidade das nanopartículas (BONFIM *et al*, 2019).





Após a síntese, as nanopartículas foram submetidas a secagem e pesagem, após esse processo foi obtida a massa média de 63 mg \pm 1 mg entre as três amostras de nanopartículas sintetizadas. A massa média obtida de nanopartículas por síntese foi considerada satisfatória, uma vez que permitiu a condução de vários testes a partir de uma única síntese. Considerando que cada síntese é armazenada em uma suspensão de 2 mL de água ultrapura, estabeleceu-se o rendimento médio de 31,5 mg/mL de nanopartículas de óxido de ferro, facilmente atraídas por campo magnético, comprovando suas propriedades paramagnéticas (Figura 12).



Figura 12 - Imagem das nanopartículas em água ultrapura atraídas por imã

As imagens obtidas por MET das nanopartículas sintetizadas mostraram nanopartículas *quasi*- cúbicas, com dimensões médias aproximadas de até 50 nm, com relativa diversidade de tamanhos. Não foram observadas diferenças nas formas entre as nanopartículas obtidas apenas com óxido de ferro e as nanopartículas funcionalizadas com glicina e poli-L-lisina. Contudo, pode-se observar nas imagens de MET que as nanopartículas funcionalizadas com glicina e poli-L-lisina apresentaram menor agregação comparada as outras nanopartículas testadas (Figura 13).

Figura 13 - Fotomicrografias obtidas por microscopia eletrônica de transmissão das nanopartículas de óxido de ferro. (A) Nanopartículas não funcionalizadas, barra: 50 nm. (B e C) Nanopartículas funcionalizadas com glicina e poli-L-Lisina, barras: 100 e 50 nm, respectivamente.



Após a busca por compostos na análise por DRX, principalmente de Fe e O, o software atribuiu picos distintos, que podem ser encontrados como características de uma estrutura compatível com magnetita (Fe₃O₄). As análises foram realizadas em amostras sintetizadas sem glicina e em amostras sintetizadas com glicina e poli-L-lisina, cada uma em difratômetros diferentes e foi possível obter o espectro de difração relativa a magnetita para as amostras analisadas nos dois equipamentos, demonstrando a reprodutibilidade da síntese. Os picos e planos de difração dos espectros encontrados são mostrados nas Figuras 14.

Tanto as partículas sintetizadas sem glicina (COD 00-210-7249) ou com glicina e poli-L-lisina (COD 00-151-3301) formaram cristais de magnetita. De acordo com a equação de *Scherrer* os cristalitos produzidos sem glicina apresentaram a média de $47,2 \pm 12,97$ nm, enquanto as nanopartículas com glicina apresentaram a média de $41,7 \pm 13,53$ nm. A presença de glicina na síntese reduziu significativamente (p=0,0047) o tamanho médio dos cristalitos produzidos (Figura 15).

Moléculas que exibem grupos carboxílicos livres são utilizadas como surfactantes na produção de nanopartículas metálicas (BABIČ *et al.*, 2008; CHERAGHIPOUR et al., 2012; SHRESTHA *et al.*, 2015; SOARES *et al.*, 2015) pela sua capacidade de ligação dos carboxilatos com íons metálicos (SAHOO *et al.*, 2005). Esta interação reduz o crescimento das nanopartículas inibindo sua nucleação (BEE *et al.*, 1995), reduzindo o tamanho final das partículas obtidas, em efeito observado neste trabalho e em outro de nosso grupo (BONFIM *et al.*, 2019).









As nanopartículas sintetizadas se apresentaram estáveis após funcionalização apesar da tendência à formação de aglomerados característico de estruturas com tamanho reduzido. As nanopartículas tendem a se agregar espontaneamente até a formação de partículas maiores, conhecidas como *bulk*. É possível estabilizar a partícula e evitar aglomeração pela adição de moléculas na superfície que promovem estabilidade eletrostática pela presença de íons adsorvidos na superfície da partícula que levam a repulsão Coulombiana (MATOS, 2016). Para este fim, foi adicionada a Glicina na superfície das nanopartículas, que possui aminas na sua extremidade, e quando protonadas pelo ácido acético permitiram a ligação da poli-L-lisina. A poli-Llisina apresenta em sua molécula uma maior quantidade de aminas livres e consequentemente há um aumento da carga eletrostática na superfície da partícula. Isso pode ser observado na Figura 16, na análise do Potencial Zeta, em que houve um aumento considerável das medições das nanopartículas funcionalizadas com glicina e poli-L-lisina em relação as nanopartículas funcionalizadas apenas com Figura 16 - Espectros da medição do potencial zeta das nanopartículas de óxido de ferro não funcionalizadas (*PION*), funcionalizadas apenas com glicina (Gly(+)) e funcionalizadas com glicina e poli-L-Lisina (poli-L-Lisina) e suspensas em água ultrapura.



As medições do potencial zeta obtidas para nanopartículas de óxido de ferro não funcionalizadas (PION) foi de - 15,9 ± 0,98 mV, para nanopartículas funcionalizadas apenas com glicina (Gly(+)) foi de + 21,84 ± 0,84 mV e para nanopartículas funcionalizadas com glicina e poli-L-lisina (Poli-L-Lisina) os valores obtidos foram de + 42,93 ± 1,90 mV. A estabilidade física de nanoestruturas é indicada por um alto valor positivo ou negativo do potencial zeta, que representa repulsão eletrostática entre as partículas. Valores de potencial zeta menores que -30 mV e maiores que +30 mV são consideradas estruturas com força repulsiva suficiente para atingir uma boa estabilidade física. Valores diferentes resultam em instabilidade física (JOSEPH & SINGHVI, 2019). Desta forma, de acordo com os espectros apresentados na Figura 16, entende-se que a suspensão de nanopartículas não funcionalizadas (PION), assim como as funcionalizadas apenas com glicina (Gly(+)) são instáveis e tendem a formar agregados de partículas, enquanto que a suspensão de nanopartículas funcionalizadas com glicina e poli-L-lisina apresentou maior estabilidade com tendência a menor agregação. Essa característica pode ser observada nas fotomicrografias obtidas por MET, na imagem das nanopartículas funcionalizadas com glicina e poli-L-lisina (Figura 13C) é possível visualizar melhora na dispersão das partículas, comparada as outras sínteses (Figuras 13A e 13B), devido a adição dos aminoácidos, atestando os resultados obtidos na análise do potencial zeta.

Na Figura 17 pode-se observar os resultados de potencial zeta (mV) e tamanho hidrodinâmico (nm), obtidos a partir da análise da água e do meio de cultura RPMI suplementado com SFB 10% e penicilina e estreptomicina 1%, utilizado no cultivo das células, com e sem as nanopartículas. Essa análise foi realizada em amostras filtradas em filtro de seringa a 0,22 µm e não filtradas e foi considerada para avaliar a estabilidade das nanopartículas nos diferentes veículos em que são mantidas, uma vez que as nanopartículas são armazenadas em água e adsorvidas pelas células em meio de cultura.

Figura 17 - Espectros da medição do potencial zeta e tamanho hidrodinâmico das nanopartículas de óxido de ferro funcionalizadas em água e em meio RPMI e os espectros dos veículos sem nanopartículas, ambas com e sem filtragem. (A) Espectros do potencial zeta. (B) Espetros do tamanho hidrodinâmico das nanopartículas.



	H ₂ O	H ₂ O - filtrado	Meio	Meio - filtrado
Potencial zeta (mV)	+ 19,11 ± 1,10	- 0,07 ± 0,05	- 5,82 ± 0,15	$-0,66 \pm 0,08$
Raio hidrodinâmico (nm)	1127,70 ± 203,35	96,87 ± 3,51	1684,20 ± 144,92	49,37 ± 7,15

Tabela 3 - Valores obtidos para o potencial zeta e tamanho hidrodinâmico das nanopartículas em água e em meio de cultura

A suspensão de nanopartículas em água sem filtração (H₂O) apresentou potencial zeta positivo e raio hidrodinâmico próximo a 1000 nm, o que indica que em água as nanopartículas tendem a aglomerar-se e que variações nos valores de potencial zeta podem estar relacionados ao tempo de armazenamento da suspensão de nanopartículas. Pode-se observar que a filtração a 0,22 μ m (H₂O – filtrado) favoreceu alguns tamanhos, mas as nanopartículas permaneceram aglomeradas. As análises para a suspensão de nanopartículas em meio de cultura demonstraram que também há aglomeração das nanopartículas, evidenciado pelo diâmetro apresentado na Figura 17B e na Tabela 3, que deve ocorrer interação das proteínas do meio de cultura com algumas nanopartículas, o chamado Efeito Corona. Esse efeito ocorre quando as nanopartículas são dispersas em meio contendo proteínas, presentes no soro do meio de cultura, podendo ocorrer o processo de adsorção das mesmas pela superfície metálica, e a consequente alteração no diâmetro (BATISTA-GALLEP et al, 2018). Essa aglomeração pode interferir nos valores de potencial zeta, as nanopartículas maiores podem deslocar o potencial zeta para valores negativos. Quando a suspensão em meio de cultura é filtrada, possivelmente algumas partículas maiores são eliminadas, privilegiando tamanhos distintos, que ficam evidentes na Figura 17B (linha vermelha pontilhada). Sendo assim, entende-se que ocorra aglomeração das nanopartículas umas com as outras ou com as proteínas do meio de cultura, porém uma distribuição de tamanhos adequada à aplicação em células é mantida. O processo de filtração elimina partículas maiores, e desta forma elimina também parte da interferência no potencial zeta proporcionada por elas.

Considerando esses resultados entende-se que apesar da aglomeração ou das interferências nos valores de potencial zeta o objetivo das nanopartículas em adsorver às membranas das células é alcançado. Os espectros de FT-IR foram analisados para nanopartículas de óxido de ferro funcionalizadas com glicina e poli-L-lisina. Na Figura 18, pode-se observar as principais ligações químicas encontradas nas amostras de nanopartículas de óxido de ferro. As análises por FT-IR indicaram a presença do grupo funcional NH₂ livre nos *PIONs* sintetizados, pela presença das moléculas de glicina e poli-L-lisina. Quanto as ligações Fe-O é possível identificar que existe interação entre o ferro presente na nanopartícula e o oxigênio do grupo funcional carboxila (COO⁻) da glicina. Assim como, as ligações C-H que indicam interação entre a poli-L-lisina e a glicina. Esses fatores indicam a funcionalização adequada da nanopartícula, conforme proposto.



Figura 18 - Análise de FT-IR das nanopartículas de óxido de ferro funcionalizadas.

Conforme os resultados apresentados, o processo de síntese das nanopartículas por micro-ondas assim como a sua funcionalização, foram adequadas para a obtenção de nanopartículas magnéticas de magnetita com tamanho e formato adequados para a construção dos esferoides.

A fim de mesurar a quantidade de ferro presente na suspensão de nanopartículas foi conduzido um teste para quantificação. Na Figura 19 verifica-se a curva padrão, utilizada nessa quantificação, obtida para o sulfato ferroso utilizado na síntese de nanopartículas.





A partir da curva padrão, foi possível calcular a massa molar de ferro presente nas nanopartículas que adsorveram às células de acordo com cada volume de solução de nanopartículas testado (Tabela 4).

Volume de nanopartículas adicionado	Total de ferro adsorvido em 2x10 ⁵ céls	
(μL)	(M)	
10	0,017	
5	0,010	
2,5	0,004	

Tabela 4 - Quantidade de ferro (M) adsorvido às células após adição das nanopartículas.

Na avaliação da citotoxicidade (2D) conduzida com as nanopartículas em células LNCaP, os resultados obtidos demonstraram que as nanopartículas não apresentaram citotoxicidade apreciável, com viabilidade celular acima de 70% (Figura 20) em todas as quantidades avaliadas, o que favorece o uso das nanopartículas para a construção dos esferoides em diversas concentrações. A quantidade de nanopartículas testada foi baseada na quantidade de células, a partir de testes preliminares que demonstraram uma quantidade relativa de nanopartículas que poderiam ser adicionadas as células sem que interferissem na aderência das células ao plástico.

Figura 20 - Ensaio de citotoxicidade em células LNCaP cultivadas em 2D das nanopartículas sintetizadas. CC: Controle de Células; CP: Controle Positivo; VC: Viabilidade Celular. (*): P < 0,0001.



As nanopartículas foram incubadas com as células e foi possível observar que após incubação houve adsorção das nanopartículas às células sem alteração da morfologia celular e mesmo após tripsinização as nanopartículas permaneceram adsorvidas. Na Figura 21B pode-se observar aglomerados de nanopartículas após incubação *overnight*. O mesmo é apresentado na Figura 21C, onde pode-se observar em azul a coloração do Azul da Prússia marcando o ferro presente nas nanopartículas.

Figura 21 - Células LNCaP cultivadas em alta confluência (A), com aglomerados de nanopartículas de óxido de ferro (B) e com aglomerados de nanopartículas de óxido de ferro coradas com azul da Prússia. Aumento: 20x



В

С

Para facilitar a visualização, as células com as nanopartículas foram fotografadas em maior aumento (100X). Na Figura 22 pode-se observar internalização de algumas nanopartículas e aglomerados na superfície celular. Essa aglomeração facilita a levitação magnética, devido ao aumento das forças magnéticas, que se somam.





A carga positiva apresentada pelas nanopartículas funcionalizadas, evidenciada pelos resultados obtidos nas análises de potencial zeta, permitiram também a adsorção das nanoestruturas à membrana das células (que possui carga negativa) como bem observado nas imagens obtidas por microscopia óptica (Figuras 21 e 22). Adicionalmente, os resultados obtidos por FT-IR, indicam a presença das ligações químicas entre os grupos funcionais e evidenciam a interação entre as estruturas. Essa interação das nanopartículas com as células apresentou força suficiente para manter as nanopartículas adsorvidas na membrana, mesmo após o processo de tripsinização das células.

Conforme proposto, para iniciar a construção dos esferoides foi avaliada a quantidade de células inicial ideal para o cultivo. Na Figura 23 é possível visualizar a formação dos esferoides por meio da resposta das nanopartículas ao campo magnético. Devido a presença das nanopartículas aderidas à membrana das células, quando submetidas a um campo magnético as células são coordenadas a crescer

mais próximas até a formação da matriz extracelular que mantem a estrutura coesa mesmo na ausência do imã. O tempo necessário para produção adequada de matriz extracelular varia para cada linhagem celular.

Desta forma foi avaliado também quantos dias seriam necessários para que a estrutura permanece coesa na ausência do imã. Conforme observado na Figura 23 as células no primeiro dia de cultivo apenas apresentam um aglomerado devido interferência do imã, para todas as densidades analisadas. No segundo dia de cultivo as células se concentram mais ao centro, mas ainda aparentam afrouxamento da estrutura. Em virtude de testar o comportamento do esferoide, entre o segundo e o terceiro dia o imã foi retirado e pode-se observar que devido à baixa quantidade de matriz extracelular a estrutura não permanece coesa na ausência do imã. Desta forma os esferoides foram mantidos em cultura pelo menos três dias antes da retirada do imã e para condução dos ensaios.

Quanto a quantidade de células testada, conforme apresentado nas imagens da Figura 23, todas as densidades celulares permitiram a formação de esferoides. Contudo, após a obtenção desse resultado, foi estabelecido que a quantidade de células inicial ideal é de 5000 células por poço, devido ao tamanho relativo dos poços das placas de 96 poços e do consequente crescimento do esferoide. Considerando que cada esferoide é inicialmente constituído de 5 mil células, baseado no ensaio de quantificação de ferro (Tabela 4) pode-se mensurar que cada esferoide é construído com aproximadamente 6 x 10^{-4} M de Fe.



Figura 23 - Fotomicrografias dos esferoides cultivados em diferentes densidades celulares por 3 dias. Imagens obtidas por microscopia óptica em objetiva de 10x.

As áreas em micrometros quadrados (μ m²) dos esferoides também foram analisadas (Figura 24) com base nas imagens apresentadas na Figura 23. Para os esferoides construídos inicialmente com 1000, 5000 e 10000 células houve um aumento da área dos esferoides entre o primeiro e o segundo dia de cultivo, relativo a organização inicial das células. Já para o esferoide construído com 30000 células houve uma diminuição da área, indicando alta contração da estrutura, porém com possível perda inicial de células, uma vez que a quantidade de células inicial é alta. Entre o segundo e o terceiro dia de cultivo pode-se observar variações nas áreas, essas variações podem ser consideradas devido a retirada do imã, com isso, as células, que ainda não estão sob uma estrutura coesa devido a matriz extracelular insuficiente tentem a dispersar, proporcionando aumento da área do esferoide e/ou a estrutura perde a conformação pelo desprendimento de células, proporcionando diminuição da área do esferoide.

Para o cultivo com 20000 células não houve alterações consideráveis na área do esferoide, porém na Figura 23 é possível observar alterações na conformação do esferoide após retirada do imã.



Figura 24 - Área dos esferoides (µm²) cultivados por 3 dias para cada densidade celular

Na figura 25 são apresentados esferoides de aproximadamente 500 µm no 8º dia de cultivo, apresentando células viáveis em verde, devido coloração com laranja de acridina ou núcleos em azul (Hoechst 33342), e células necróticas em vermelho, devido coloração com brometo de etídio (Figuras 25A e 25B) ou iodeto de propídio (Figuras 25C e 25D).

Figura 25 - Fotomicrografia obtida por microscopia de fluorescência *widefield* (Nikon Ts100, A e C; In Cell Analyzer, 2000, GE Lifesciences, B); ImageXpressMicro Confocal High-Content Screening, Molecular Devices, D de esferoides corados com laranja de acridina (verde) ou Hoechst 33342 (azul) indicando células viáveis ou DNA nuclear e com brometo de etídio (C) ou iodeto de propídio (D) (vermelho) indicando células necróticas Barra: 200 µm



Pela coloração dos esferoides com laranja de acridina, Hoechst, brometo de etídio ou iodeto de propídio foi possível determinar a localização das células viáveis e das células em necrose ou apoptose tardia no esferoide. O uso desses reagentes permitiu essa distinção devido a permeabilidade dos corantes. O Hoechst quando associado ao DNA do núcleo das células emite fluorescência azul. O laranja de acridina, quando intercalado ao DNA, resulta na emissão da fluorescência verde e vermelho-alaranjado quando intercalado ao RNA de células vivas e mortas, enquanto o brometo de etídio e o iodeto de propídio penetram em células cuja membrana foi

comprometida, emitindo fluorescência vermelho alaranjada ao intercalar ao DNA. Sendo assim, células vivas apresentam coloração verde, enquanto que células em apoptose tardia ou necróticas apresentam coloração vermelho alaranjada devido a perda da integridade da membrana. Apesar do laranja de acridina resultar na coloração vermelho alaranjada quando intercalado ao RNA de todas as células, quando na presença de células em processo tardio de morte a coloração do brometo de etídio se sobrepõe (KOSMIDER *et al*, 2004; TAKAHASHI *et al*, 2004). Desta forma é possível observar no esferoide células necróticas ao centro e células viáveis na superfície, conforme esperado para uma estrutura tumoral, em que o gradiente de gases e nutrientes é comprometida no centro da estrutura. Este estudo pode mostrar que a observação dos esferoides por microscopia de fluorescência convencional é adequada para a análise da viabilidade de suas camadas celulares, não sendo necessária a utilização de sistemas de alta demanda para a aquisição das imagens.

Na Figura 26 são apresentadas fotomicrografias dos esferoides a partir do segundo dia até o décimo dia de cultivo. Comparando as imagens obtidas nas figuras 23 e 26 é possível observar uma contração da estrutura do esferoide conforme a proliferação celular e o desenvolvimento do microtecido.





O PSMA 11 e o PSMA 617 são substâncias sintetizadas geralmente associadas com outros elementos para testes de diagnóstico e terapia, os testes de viabilidade
celular dessas substâncias (Figura 27) demonstraram que em diferentes molaridades testadas não são tóxicas, uma vez que apenas o controle positivo (CP) apresentou diferença estatística significativa com relação ao controle de células (CC). Outro estudo (CARVALHO & VIEIRA, 2020) realizado pelo grupo não encontrou citotoxicidade apreciável, mas certo grau de genotoxicidade em algumas concentrações não-praticáveis. Os resultados corroboram a noção de baixa/nenhuma toxicidade *in vitro* dos peptídeos testados, mesmo em molaridades excessivas.

Figura 27 - Gráficos do ensaio de viabilidade celular de esferoides de LNCaP expostos a diferentes quantidades de PSMA 11 e PSMA 617. Controle de Células (CC); Controle Negativo (CN); Controle Positivo (CP). (****) p < 0,0001



Com o objetivo de utilizar os esferoides para testes de segurança de drogas, foram testados como candidatos a controle positivo o SDS, um detergente carregado negativamente que causa morte celular pela desnaturação das proteínas, e o DMSO, um solvente orgânico de alta penetrabilidade com afinidade por hidrogênio e que em concentrações mais altas causam desidratação celular (PICOLI *et al*, 2015; ALBERTS *et al*, 2010). Os gráficos obtidos da avaliação da viabilidade celular com SDS e DMSO (Figura 28) mostraram a quantidade / volume ideal de cada solução para sua utilização como controle positivo em um ensaio de toxicidade. Todos as diluições testadas apresentaram diferença estatística com relação ao controle de células, sendo que o SDS apresentou maior resposta citotóxica nos esferoides quando comparado ao DMSO. Devido a facilidade de manipulação e a possibilidade da obtenção de uma curva para a viabilidade celular, entende-se que o DMSO é mais adequado para utilização como controle positivo em relação ao SDS, para células cultivadas em 3D.

Figura 28 - Gráficos obtidos da avaliação do SDS e do DMSO como possíveis candidatos a controle positivo de toxicidade em esferoides de LNCaP. (*): p< 0,05; (**): p< 0,01; (***) p< 0,001; (****) p < 0.0001.



A ciclofosfamida foi testada quanto aos efeitos citotóxicos sobre células cultivadas em monocamada e sobre esferoides. No teste de viabilidade conduzido em esferoides com MTS/PMS o gráfico com as molaridades testadas de ciclofosfamida (Figura 29) mostrou que para molaridades acima de 26,8 µM há diferença estatística significativa na porcentagem de viabilidade celular em relação ao controle de células.





Ciclofosfamida (µM)

Em testes em animais é usual a utilização da DL₅₀ (dose letal para 50% da população) para determinar o nível de toxicidade de um composto. Em testes de citotoxicidade já conduzidos com diversas substâncias é possível correlacionar os resultados preexistentes com a IC₅₀ (concentração inibitória que afeta 50% das células), o que torna o teste de citotoxicidade válido para avaliação *in vitro* da toxicidade de compostos (NATIONAL INSTITUTE OF ENVIRONMENTAL HEALTH SCIENCES, 2001).

Na Figura 30 é apresentada a IC₅₀ para Ciclofosfamida conduzida com o reagente MTS/PMS em esferoides. Foi determinada que a molaridade relativa a concentração inibitória de 50% é de 30,48 ± 1,02 μ M para este fármaco. Comparativamente a esse teste, o teste de viabilidade celular conduzido com o reagente CellTiter Glo 3D nas mesmas condições e molaridades testadas para determinação da IC₅₀ mostrou que o resultado é reprodutível independente do reagente utilizado, com valor de IC₅₀ calculado em 29,81 ± 0,56 μ M, não sendo estatisticamente diferentes (p = 0,2818). Portanto, baseado na sensibilidade e na capacidade de aferir a citotoxicidade de uma droga padrão, foi possível concluir que ambos os reagentes apresentam eficiências similares, sendo adequados aos estudos de citotoxicidade em esferoides (Figura 31).

Figura 30 - Gráfico apresentando curva de toxicidade da Ciclofosfamida em cultivo tridimensional de LNCaP com reagente MTS/PMS (Valor de IC₅₀ indicado).



Figura 31 - Gráfico apresentando curva de toxicidade da Ciclofosfamida em esferoides de LNCaP, aferida por CellTiter Glo 3D (verde) ou MTS (laranja).



Em virtude de comparar os resultados da viabilidade celular da ciclofosfamida testada em células cultivadas em 2D e 3D. O teste foi conduzido nas duas condições

com o reagente MTS/PMS. Nas duas configurações, os valores de IC₅₀ foram estatisticamente semelhantes (p = 0,1482): 29,15 ± 1,42 μ M para cultivos 2D e 30,46 ± 1,24 μ M para 3D (Figura 32).

Figura 32 - Gráfico apresentando IC₅₀ do teste de viabilidade com Ciclofosfamida conduzido com MTS/PMS em células cultivadas em 2D e em 3D.



Além das análises de toxicidade *in vitro* os esferoides foram submetidos a avaliações estruturais, após exposição a substâncias de toxicidade conhecida. Os cortes histológicos dos esferoides apresentados na Figura 33 mostraram para o controle de células (CC) e para o controle negativo (NaCl) uma morfologia com densidade celular e matricial razoáveis, com esparsos pontos vazios e que podem ser atribuídos à fragilidade do material, que é muito mais friável e instável comparado ao tecido *in vivo*. Nestas amostras, as células apresentam um formato homogêneo, fusiforme, com citoplasma levemente alargado na região dos núcleos, os quais se localizam na porção central. A coloração por hematoxilina-eosina mostra um tecido levemente basófilo, com adensamento nos núcleos. Algumas regiões apresentaram-se relativamente espessas devido à dificuldade de corte do material, descrito acima como frágil. Há dispersão de nanopartículas ao longo dos campos observados, mais evidente nas amostras de controles expostos ao NaCl.

A exposição ao DMSO e a ciclofosfamida claramente reduziu a densidade do tecido, levando ao aumento de espaços vazios aparentes a ao afrouxamento do tecido no plano de corte. Ainda fusiformes, as células nestas amostras apresentaram-se menos alargadas, com extremidades finas, e citoplasma com coloração levemente acidificada. O DMSO induziu tal afrouxamento de maneira homogênea nos cortes observados. Sendo um solvente orgânico, é esperada sua difusão por todo (ou quase todo) o tecido, do exterior ao interior, e é possível supor sua distribuição homogênea pelo esferoide após aproximadamente 24 horas de incubação, levando à produção deste efeito em todo o corte.

A ciclofosfamida é um agente cujo metabólito principal (fosforamida mostarda) produz *crosslinks* entre guaninas de fitas adjacentes, tornando o DNA ilegível (EMADI *et al*, 2009). Sua distribuição através das camadas celulares ocorre por difusão simples dada a sua hidrofilicidade, e sua degradação intracelular decorre na presença e atividade da enzima aldeído desidrogenase (KANAKRY, 2013). Tais fatores contribuem para que a droga e consequentemente seus efeitos estejam distribuídos de forma a serem mais evidentes na periferia do esferoide. A figura correspondente mostra certo adensamento celular na área central do corte, o que sugere este efeito. No mais, as características de rarefação tecidual encontradas também na amostra tratada com DMSO são observadas nas bordas do corte.

Figura 33 - Fotomicrografias dos cortes histológicos dos esferoides sem tratamento (CC) e tratados com NaCl, DMSO e ciclofosfamida. A = 10x, B = 20x e C = 40x.



6 CONCLUSÃO

A partir do trabalho realizado foi possível padronizar a síntese de nanopartículas de óxido de ferro de forma eficaz e a baixo custo. A síntese utiliza reagentes de fácil acesso e de baixo custo, além do processo de obtenção das nanopartículas por co-precipitação ser rápido, eficaz, reprodutível, com alto rendimento, permitindo a construção de esferoides com mínima quantidade de nanopartículas e com a funcionalidade maior ou equivalente ao material já disponível no mercado. Com os resultados obtidos conclui-se que as nanopartículas de óxido de ferro sintetizadas permitem a construção de uma microestrutura tumoral como proposto. Pode-se considerar para etapas futuras, realizar novos testes mais aprofundados visando a correlação das nanopartículas sintetizadas com as nanopartículas disponíveis no mercado, a fim de validar a técnica e o produto apresentados.

Os esferoides produzidos durante o estudo mostraram-se estáveis, o que significa que apresentam coesão suficiente e camadas externas de células viáveis, por pelo menos 10 dias após o início das culturas, possibilitando testes a partir do quarto dia após o início. A existência de volumes centrais marcados por brometo de etídio ou iodeto de propídio, denotando morte celular, pode ser aproveitada em estudos futuros como emulação de internalidades hipóxicas e necróticas, próprias de tumores sólidos (CUI, 2006; BREDHOLT *et al*, 2015).

Os modelos de microtumores obtidos por esta técnica mostraram-se de fácil manipulação, e permitiram sua utilização em testes de toxicidade por luminescência ou por colorimetria (absorvância), não tendo sido detectada diferença significativa de performance entre quantificação das viabilidades pelas duas técnicas. Os presentes dados permitem sugerir as duas técnicas como igualmente eficientes.

Os esferoides também puderam ser submetidos a análises morfológicas de camadas de células viáveis por microscopia óptica de fluorescência, e análise histológica de cortes do material fixado. Para microscopia de fluorescência, não foi verificada a necessidade do uso de equipamentos HCS/HCA/HT (*High Content Screening / High Content Analysis / High Throughput*), e a visualização por microscopia de fluorescência invertida convencional mostrou-se totalmente suficiente para as análises. A microscopia óptica dos cortes corados por HE também foi satisfatória, tendo fornecido uma boa quantidade de informações sobre a morfologia

do tecido. Assim, mostraram-se adequados para estudos de fisiologia tumoral, os quais podem incluir também experimentos de imunofluorescência. Foi possível encontrar em todos os experimentos as diferenças morfológicas e fisiológicas de toxicidade causadas pelos candidatos a controles positivos, atestando sua adequação ao uso com tal propósito.

O produto final deste trabalho a partir dos dados apresentados pode, portanto, ser utilizado em testes posteriores de eficácia de fármacos que visem tratar os tumores prostáticos humanos. Ademais, o modelo de esferoides proposto construído a partir das nanopartículas de óxido de ferro sintetizadas é estável e permite a obtenção de resultados reprodutíveis, essa característica faz do modelo uma boa ferramenta para construção de microtecidos com outras linhagens celulares, sendo um bom candidato a sistema teste para testes de segurança de fármacos ou outros produtos que requeiram essa avaliação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; MORGAN, D.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P.; WILSON, J.; HUNT, T; *Biologia molecular da célula*. Artmed Editora, 2010.

ALTOMARE A, CORRIERO N, CUOCCI C, FALCICCHIO A, MOLITERNI A, RIZZI R. QUALX2.0: A qualitative phase analysis software using the freely available database POW-COD. *Journal of Applied Crystallography*, v. 48, p. 598–603, 2015.

ALZAIDE, J.; ALZAHRANI, E.; EL-MOUHTY, N.R.A.; Chemical Studies on the Preparation of Magnetic Nanoparticles Coated with Glycine and its Application for Removal of Heavy Metals; *Oriental Journal of Chemistry*, v. 32, n. 3, p. 1503-1513, 2016.

AMORIM, S. R.; KLIER, A. H.; ANGELIS, L. H. De. Controle de qualidade na indústria farmacêutica : identificação de substâncias por espectroscopia no infravermelho. *Rev. Bras. Farm*, v. 94, n. 3, p. 234–242, 2013.

ANVISA. AGENCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. *Farmacopeia Brasileira*. 6.ed. v.1. Brasília, 2019. Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br.

ARAMI, H.; KHANDHAR, A.; LIGGITT, D.; KRISHNAN, K.M.; In vivo delivery, pharmacokinetics, biodistribution and toxicity of iron oxide nanoparticles. *Chemical Society Reviews*.; v. 44, p. 8576–8607, 2015.

ARRIORTUA, O. K.; INSAUSTI, M.; LEZAMA, L.; GIL DE MURO, I.; GARAIO, E.; DE LA FUENTE, J. M.; FRATILA, R. M.; MORALES, M. P.; COSTA, R.; ECEIZA, M.; SAGARTZAZU-AIZPURUA, M.; AIZPURUA, J. M. RGD-Functionalized Fe3O4 nanoparticles for magnetic hyperthermia. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 165, p. 315–324, 2018. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2018.02.031

ASSIS, M.F.L.; SANTOS, E.C.O.; JESUS, I.M.; PINTO, W.V.M.; MEDEIROS, R.L.F.; SILVA, D.F.L.; Uso da Cultura de Células em Testes Diagnósticos Laboratoriais em Medicina e Biologia. *Cadernos de Saúde Coletiva*, Rio de Janeiro, v. 15, n. 3, p. 425 - 432, 2002.

BABIC, M., HORÁK, D., TRCHOVÁ, M., JENDELOVÁ, P., GLOGAROVÁ, K., LESNÝ, P., HERYNEK, V., HÁJEC, M., SYKOVÁ, E.; Poly (L-lysine)-modified iron oxide nanoparticles for stem cell labeling. *Bioconjugate chemistry*, v. 19, n. 3, p. 740-750, 2008.

BARLTROP, J.A.; OWEN, T.C.; CORY, A.H.; CORY, J.G.; 5-(3carboxymethoxyphenyl)-2(4,5-dimethylthiazol)-3-(4-sulphophenyl) tetrazolium, inner salt (MTS) and related analogs of 3-(4,5- dimethylthiazol)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reducing to purple water-soluble formazans as cell-viability indicators. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, v.1, n. 11, p. 611-614, 1991. BATISTA-GALLEP, T.; PASQUOTO-STIGLIANI, T.; GUILGER, M.; RHEDER, D.; GERMANO-COSTA, T.; BILESKY-JOSÉ, N.; FRACETO, L.; CARVALHO, C.; LIMA, R. Efeitos de Nanopartículas Comerciais de Óxido de Ferro (Fe₂O₃): Citotoxicidade, Genotoxicidade e Estresse Oxidativo. *Química Nova*, v. 2018, n. 9, p. 974–981, 2018.

BAYDA, S., ADEEL, M., TUCCINARDI, T., CORDANI, M., & RIZZOLIO, F; The history of nanoscience and nanotechnology: From chemical–physical applications to nanomedicine. *Molecules*, v. 25, n. 1, p. 112, 2020.

BEE, A.; MASSART, R.; NEVEU, S. Synthesis of very fine maghemite particles. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, v. 149, n. 1–2, p. 6–9, ago. 1995. Disponível em: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0304885395003177

BERRY, C.C.; Progress in functionalization of magnetic nanoparticles for applications in biomedicine. Journal of physics D: *Applied physics*, v. 42, n. 22, p. 224003, 2009.

BONFIM, L.; PASSOS, P. Q. S.; GONÇALVES, K. O.; COURROL, L. C; SILVA, F. R. O.; VIEIRA, D. P.; Microwave-mediated synthesis of iron-oxide nanoparticles for use in magnetic levitation cell cultures. *Applied Nanoscience*, p. 1-11, 2019.

BOUTRY, S.; FORGE, D.; BURTEA, C.; MAHIEU, I.; MURARIU, O.; LAURENT, S.; ELST, L.V.; MULLER, R. N.; How to quantify iron in an aqueous or biological matrix: a technical note. *Contrast media & molecular imaging*, v. 4, n. 6, p. 299-304, 2009.

BREDHOLT, G., MANNELQVIST, M., STEFANSSON, I. M., BIRKELAND, E., BO, T. H., OYAN, A. M., ... AKSLEN, L. A. Tumor necrosis is an important hallmark of aggressive endometrial cancer and associates with hypoxia, angiogenesis and inflammation responses. *Oncotarget*, v. 6, n. 37, p. 39676- 39691, 2015.

BRESLIN, S.; O'DRISCOLL, L. Three-dimensional cell culture: The missing link in drug discovery. *Drug Discovery Today*, v. 18, n. 5–6, p. 240–249, 2013. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.drudis.2012.10.003

BÜNGER, C. M., JAHNKE, A., STANGE, J., DE VOS, P., & HOPT, U. T.; MTS colorimetric assay in combination with a live-dead assay for testing encapsulated L929 fibroblasts in alginate poly-I-lysine microcapsules in vitro. *Artificial organs*, v. 26, n. 2, p. 111-116, 2002.

CALLISTER, W. D.; RETHWISCH, DAVID G. *Materials science and engineering.* NY: John wiley & sons, 2007.

CARVALHO, L. R.; VIEIRA, D. P. Evaluation of genotoxic potential of peptides used in nuclear medicine (PSMA -617 and -11, and ubiquicidine 29-41) using a flowcytometric, semi-automated analysis of micronuclei frequency in cell cultures. *Toxicology Reports*, v. 7, p. 304–316, 2020. CERQUEIRA, N.; Métodos alternativos ainda são poucos e não substituem totalmente o uso de animais. *Ciência e Cultura*, v. 60, n. 2, p. 47-49, 2008.

CESARZ, Z.; TAMAMA, K.; Spheroid Culture of Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells International*, p. 1-11, 2016.

CHAKRABORTY, A., BOER, J. C., SELOMULYA, C., PLEBANSKI, M.; Amino acid functionalized inorganic nanoparticles as cutting-edge therapeutic and diagnostic agents. *Bioconjugate chemistry*, v. 29, n. 3, p. 657-671, 2017.

CHAKRABORTY, A., ROYCE, S. G., PLEBANSKI, M., & SELOMULYA, C.; Glycine microparticles loaded with functionalized nanoparticles for pulmonary delivery. *International journal of pharmaceutics*, v. 570, p. 118654, 2019.

CHERAGHIPOUR, E.; JAVADPOUR, S.; MEHDIZADEH, A. R. Citrate capped superparamagnetic iron oxide nanoparticles used for hyperthermia therapy. *Journal of Biomedical Science and Engineering*, v. 05, n. 12, p. 715–719, 2012.

CORY, A.H.; OWEN, T.C.; BARLTROP, J.A.; CORY, J.G.; Use of an aqueous soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth assays in culture. *Cancer communications*, v. 3, n. 7, p. 207-212, 1991.

CUI, S.; FORMATION OF NECROTIC CORES IN THE GROWTH OF TUMORS: ANALYTIC RESULTS. *Acta Mathematica Scientia*, v. 26, n. 4, p. 781–796, 2006.

DADFAR, S. M.; ROEMHILD, K.; DRUDE, N. I.; VON STILLFRIED, S.; KNÜCHEL, R.; KIESSLING, F.; LAMMERS, T. Iron oxide nanoparticles: Diagnostic, therapeutic and theranostic applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 138, p. 302–325, 2019.

DEDA, D. K.; CARDOSO, R. M.; UCHIYAMA, M. K.; PAVANI, C.; TOMA, S. H.; BAPTISTA, M. S.; ARAKI, K.; A reliable protocol for colorimetric determination of iron oxide nanoparticle uptake by cells. *Analytical and bioanalytical chemistry*, v. 409, n. 28, p. 6663-6675, 2017.

DOWNS, R. T. & HALL-WALLACE, M.; The American Mineralogist Crystal Structure Database. *American Mineralogist.* v. 88, p. 247-250, 2003.

DU, V.; LUCIANI, N.; RICHARD, S.; MARY, G.; GAY, C.; MAZUEL, F.; REFFAY, M.; MENASCHÉ, P.; AGBULUT, O.; WILHELM, C.; A 3D magnetic tissue stretcher for remote mechanical control of embryonic stem cell differentiation. *Nature communications*, v. 8, n. 1, p. 400, 2017.

DUVAL, K., GROVER, H., HAN, L. H., MOU, Y., PEGORARO, A. F., FREDBERG, J., & CHEN, Z; Modeling physiological events in 2D vs. 3D cell culture. *Physiology*, v. 32, n. 4, p. 266-277, 2017.

EDMONDSON, R; BROGLIE, J.J.; ADCOCK, A.; YANG, L.; Three-Dimensional Cell Culture Systems and Their Applications in Drug Discovery and Cell-Based Biosensors. *Assay and drug development technologies*, v. 12, n. 4, p. 207-218, 2014.

EMADI, A.; JONES, R. J.; BRODSKY, R. A. Cyclophosphamide and cancer: Golden anniversary. *Nature Reviews Clinical Oncology*, v. 6, n. 11, p. 638–647, 2009.

ESKES, C., BOSTRÖM, A. C., BOWE, G., COECKE, S., HARTUNG, T., HENDRIKS, G., PAMIES, D., PITON, A., ROVIDA, C; Good cell culture practices & in vitro toxicology. *Toxicology In Vitro*, v. 45, p. 272-277, 2017.

ESTEVES-PEDRO, N. M., SUGIBAYASHI, K., OSTROSKY, E. A., FERRARI, M., DA SILVA SUFI, B., MATHOR, M. B., MORENO, P.R.H., LOURENÇO, F.R., CONSIGLIERI, V.O., BABY, A.R., KANEKO, T. M. Validation cytotoxicity assay for lipophilic substances. *Current topics in medicinal chemistry*, v. 18, n. 4, p. 275-286, 2018.

FERREIRA, L. P.; GASPAR, V. M.; MANO, J. F. Design of spherically structured 3D in vitro tumor models-Advances and prospects. *Acta biomaterialia*, v. 75, p. 11-34, 2018.

FONSECA FILHO, H.D.; LOPES, G.A.C.; Avanços em caracterização de amostras sólidas cristalinas através de Difratometria de Raios-X. *Estação Científica (UNIFAP)*. v.3, n.1, p. 31-45, 2013.

FRANCISQUINI, E.; SCHOENMAKER, J.; SOUZA, J. A. Nanopartículas Magnéticas e suas Aplicações. *Química Supramolecular e Nanotecnologia*, p. 269–289, 2014.

FRESHNEY, R. I.; *Culture of animal cells: a manual of basic technique and specialized applications.* John Wiley & Sons, ed. 7. 2010.

GALLETI, S. R.; Introdução à microscopia eletrônica. *Biológico*, v. 65, n. 1/2, p. 33-35, 2003.

GALLO, M.A.; *In Casarett & Doull's – Toxicology: The Basic Science of Poisons.* 7^a Edição. Nova Iorque. Editora McGraw-Hill. p. 1-3, 2001.

GODUGU, C.; PATEL, A.R.; DESAI, U.; ANDEY, T.; SAMS, A.; SINGH, M.; AlgiMatrix[™] Based 3D Cell Culture System as an In-Vitro Tumor Model for Anticancer Studies. *PloS one*, v. 8, n. 1, p. e53708, 2013.

GOMES, M.; O Papel Revolucionário da Nanotecnologia e das Células Estaminais na Medicina Regenerativa. *Ciência Viva.* 2008. Disponível em: <http://www.cienciaviva.pt/divulgacao/fronteira/gomes.asp>. Acesso em: 28 de outubro de 2019. GRAZULIS, S., CHATEIGNER, D., DOWNS, R. T., YOKOCHI, A. T., QUIROS, M., LUTTEROTTI, L., MANAKOVA, E., BUTKUS, J., MOECK, P. & LE BAIL, A.; Crystallography Open Database – an open-access collection of crystal structures. *Journal of Applied Crystallography.* v. 42, p. 726-729, 2009.

GRAŽULIS, S., DAŠKEVIČ, A., MERKYS, A., CHATEIGNER, D., LUTTEROTTI, L., QUIRÓS, M., SEREBRYANAYA, N. R., MOECK, P., DOWNS, R. T. & LEBAIL, A.; Crystallography Open Database (COD): an open-access collection of crystal structures and platform for world-wide collaboration. *Nucleic Acids Research*. v. 40, p. D420-D427, 2012.

GRAŽULIS, S., MERKYS, A., VAITKUS, A. & OKULIČ-KAZARINAS, M.; Computing stoichiometric molecular composition from crystal structures. *Journal of Applied Crystallography*, v. 48, p. 85-91, 2015.

GUIDO, R. V. C.; ANDRICOPULO, A. D.; OLIVA, A. G. Planejamento de fármacos, biotecnologia e química medicinal: aplicações em doenças infecciosas. *Estudos Avançados*, v. 24, n. 70, p. 81-98, 2010

HAISLER, W.L.; TIMM, D.M.; GAGE, J.A.; TSENG, H.; KILLIAN, T.C.; SOUZA, G.R.; Three-dimensional cell culturing by magnetic levitation. *Nature Protocols.* v. 8, n. 10, p. 1940-1949, 2013.

HICKMAN, J.A.; GRAESER, R.; HOOGT, R.; VIDIC, S.; BRITO, C.; GUTEKUNST, M.; KUIP, H.; Three-dimensional models of cancer for pharmacology and cancer cell biology: Capturing tumor complexity in vitro/ex vivo. *Biotechnology journal*, v. 9, n. 9, p. 1115-1128, 2014.

HO, V.H.B.; GWO, W.M.; HUANG, C.L.; HO, S.F.; CHAW, S.Y.; TAN, E.Y.; NG, K.W.; LOO, J.S.C.; Manipulating Magnetic 3D Spheroids in Hanging Drops for Applications in Tissue Engineering and Drug Screening. *Advanced Healthcare Materials,* v. 2, p. 1430–1434, 2013.

HOFMAN, M. S., VIOLET, J., HICKS, R. J., FERDINANDUS, J., THANG, S. P., AKHURST, T., ... SANDHU, S; [177 Lu]-PSMA-617 radionuclide treatment in patients with metastatic castration-resistant prostate cancer (LuPSMA trial): a single-centre, single-arm, phase 2 study. *The Lancet Oncology*, v. 19, n. 6, p. 825–833, 2018.

HUTCHINSON, L.; KIRK, R.; High drug attrition rates—where are we going wrong? *Clinical Oncology*, v. 8, p. 189-190, 2011.

INCA. Instituto Nacional do Câncer. *Tipos de Câncer. Câncer de Prostata*. 2020a. Disponível em: https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-de-prostata. Acesso em: 06 de junho de 2020.

INCA. Instituto Nacional do Câncer. **Como se comportam as células cancerosas?** 2020b. Disponível em: http://www1.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=318. Acesso em: 06 de junho de 2020. INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. *ISO 10993-5: biological evaluation of medial devices-Part 5: test for cytotoxicity: in vitro methods.* Geneva: ISO, 2009. 34p.

JEONG, Y. G.; LEE, J. S.; SHIM, J. K.; HUR, W.; A scaffold-free surface culture of B16F10 murine melanoma cells based on magnetic levitation. *Cytotechnology*, v. 68, n. 6, p. 2323-2334, 2016.

JOSEPH, E.; SINGHVI, G. *Nanomaterials for Drug Delivery and Therapy.* 2019. Cap. 4, Multifunctional nanocrystals for cancer therapy: a potential nanocarrier. Nanomaterials for Drug Delivery and Therapy, p. 91–116.

KANAKRY, C. G., GANGULY, S., ZAHURAK, M., BOLAÑOS-MEADE, J., THOBURN, C., PERKINS, B., FUCHS, E.J., JONES, R.J., HESS, A.D., LUZNIK, L. Aldehyde dehydrogenase expression drives human regulatory T cell resistance to posttransplantation cyclophosphamide. *Science translational medicine*, v. 5, n. 211, p. 211ra157-211ra157, 2013.

KNIGHT, E., & PRZYBORSKI, S.; Advances in 3D cell culture technologies enabling tissue-like structures to be created in vitro. *Journal of Anatomy*, v. 227, n. 6, p. 746-756, 2015.

KOSMIDER, B.; ZYNER, E.; OSIECKA, R.; OCHOCKI, J. Induction of apoptosis and necrosis in A549 cells by the cis-Pt(II) complex of 3-aminoflavone in comparison with cis-DDP. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, v. 563, n. 1, p. 61–70, 2004.

KURASH, M. M.; GILL, R.; KHAIRULIN, M.; HARBOSH, H.; KEIDAR, Z. 68Galabeled PSMA-11 (68Ga-isoPROtrace-11) synthesized with ready to use kit: normal biodistribution and uptake characteristics of tumour lesions. *Scientific Reports*. v.10, n.1, p. 1-8, 2020.

LAURENT, S., Dutz, S.; Häfeli, U. O.; & Mahmoudi, M.; Magnetic fluid hyperthermia: focus on superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *Advances in colloid and interface science*, v. 166, n. 1-2, p. 8-23, 2011.

LELIEVRE, S.A.; KWOK, T.; CHITTIBOYINA, S.; Architecture in 3D Cell Culture: An Essential Feature for in vitro Toxicology. *Toxicology In Vitro*, v. 45, p. 287–295, 2017.

LIAO, X.; Zhu, J.; Zhong, W.; Chen, H. Y.; Synthesis of amorphous Fe₂O₃ nanoparticles by microwave irradiation. *Materials Letters*, v. 50, n. 5-6, p. 341-346, 2001.

LIU, W.T.; Nanoparticles and their biological and environmental applications. *Journal of bioscience and bioengineering*, v. 102, n. 1, p. 1-7, 2006.

LÜTJE, S., HESKAMP, S., CORNELISSEN, A. S., POEPPEL, T. D., VAN DEN BROEK, S. A., ROSENBAUM-KRUMME, S., BOCKISCH, A., GOTTHARDT, M., RIJPKEMA, M., BOERMAN, O. C; PSMA ligands for radionuclide imaging and therapy of prostate cancer: clinical status. *Theranostics*, v. 5, n. 12, p. 1388, 2015.

MANAIA, E. B., ABUÇAFY, M. P., CHIARI-ANDRÉO, B. G., SILVA, B. L., JUNIOR, J. A. O., CHIAVACCI, L. A.; Physicochemical characterization of drug nanocarriers. *International Journal of Nanomedicine*, v. 12, p. 4991, 2017.

MARAFANTE, E.; BALLS, M.; The European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM). *Alternatives to Animal Testing: New Ways in the Biomedical Sciences, Trends and Progress*, p. 21-25, 1994.

MARTINS, F.T.; Aplicações Tecnológicas do Polimorfismo Farmacêutico. **Revista Processos Químicos.** 2010.

MATOS, H.L.S.; *Síntese de nanopartículas de Óxido de Ferro funcionalizadas para remoção de Pb*²⁺. 2016. 109 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Instituto de Química da Universidade Federal de Goiás.

MCTI, Ministério da Ciência Tecnologia, Inovações. *Guia Brasileiro de Produção Manutenção e utilização de Animais em Atividades de Ensino ou Pesquisa Científica.* 1ª edição. 2016

MCTI. Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações. *RENAMA - Rede Nacional de Métodos Alternativos.* Acesso em: 22 de setembro de 2019. Disponível em: https://www.mctic.gov.br/mctic/opencms/ciencia/SEPED/Saude/renama/renama.html.

MCELVANY, K. D. FDA Requirements for Preclinical Studies. Frontiers of Neurology and Neuroscience, *Pharmacology*, v. 25, p. 46–49, 2009.

MERKYS, A., VAITKUS, A., BUTKUS, J., OKULIČ-KAZARINAS, M., KAIRYS, V. & GRAŽULIS, S.; COD::CIF::Parser: an error-correcting CIF parser for the Perl language. *Journal of Applied Crystallography*, v. 49, p. 292–301, 2016.

MORETTO, L.D.; STEPHANO, M.A. *Métodos alternativos ao uso de animais em pesquisa.* Limay Editora. São Paulo. p.734. 2019

MOSAAD, E.O.; CHAMBERS, K.F.; FUTREGA, K.; CLEMENTS, J.A.; DORAN, M.R.; The Microwell-mesh: A highthroughput 3D prostate cancer spheroid and drug-testing platform. *Scientific Reports,* v. 8, n. 253, 2018.

NARDINO, D.; **Preparo e caracterização dos diferentes polimorfos do Cloridrato de Metformina utilizando técnica de recristalização por evaporação de solventes.** Dissertação (Mestrado em Processos Químicos e Biotecnológicos) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Toledo, 2018.

NATH, S.; DEVI, G.R.; Three-Dimensional Culture Systems in Cancer Research: Focus on Tumor Spheroid Model. *Pharmacology & Therapeutics.* v.163, p.94–108, 2017 NATIONAL INSTITUTE OF ENVIRONMENTAL HEALTH SCIENCES. Guidance document on using in vitro data to estimate in vivo starting doses for acute toxicity. *North Carolina: NIH Publication*, 2001.

OCAMPO, I.Z.; PASSOS, P.Q.S.; CARVALHO, L.R.; CRUZ, C.A.L.; ESTEVES-PEDRO, N.M.; SILVA, F.M.; HIGA, O.Z.; DIAS, L.A.P.; OKAZAKI, K.; VIEIRA, D.P.; In vitro cytotoxic and genotoxic evaluation of peptides used in nuclear medicine (DOTATATE and Ubiquicidin29-41) in CHO-K1 cells. *Cytotechnology*, v. 68, p. 2301-2310, 2016.

OECD. Trabalhando com o Brasil. *Políticas melhores para uma vida melhor*. p. 1 – 64. 2018. Disponível em: http://www.oecd.org/brazil/Active-with-Brazil-Port.pdf. Acesso em: 13 de setembro de 2020.

OLIVEIRA, L.P.S.; MARINHO, M. E.; FUMAGALI, E. O.; Nanomedicamentos e os desafios da Anvisa diante da inexistência de um marco regulatório no Brasil. *Amazon's Research and Environmental Law*, v. 3, p. 36-51, 2015.

ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT (OECD). *Guidance document on using cytotoxicity test to estimate starting doses for acute oral systemic toxicity tests. Nº129.* Series on Testing and Assessment 2010. Acesso em: 01 de Junho de 2020. Disponível em: https://ntp.niehs.nih.gov/iccvam/suppdocs/feddocs/oecd/oecd-gd129.pdf

PARSONS, J.G.; LUNA, C.; BOTEZ, C.E.; ELIZALDE, J.; GARDEA-TORRESDEY, J.L.; Microwave Assisted Synthesis of Iron(III) Oxyhydroxides/Oxides Characterized Using Transmission Electron Microscopy, X-ray Diffraction, and X-ray Absorption Spectroscopy. *Journal of Physics and Chemistry of Solids*, v. 70, n. 3-4, p. 555-560, 2009.

PHUNG, Y. T.; BARBONE, D.; BROADDUS, V. C.; HO, M.; Rapid generation of in vitro multicellular spheroids for the study of monoclonal antibody therapy. *Journal of Cancer*, v. 2, p. 507, 2011.

PICOLI, T.; BARBOSA, J. S.; VARGAS, G. D. Á.; DE OLIVEIRA HÜBNER, S.; FISCHER, G.; Toxicidade e eficiência do dimetilsulfóxido (dmso) no congelamento de células madin-darby bovine kidney (mdbk). *Science And Animal Health*, v. 3, n. 2, p. 159-168, 2015.

PROMEGA. Technical Bulletin. **CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay.** Revisado dez. 2012. Disponível em: <https://www.promega.com/-/media/files/resources/protocols/technicalbulletins/0/celltiter-96-aqueous-one-solution-cell-proliferation-assay-systemprotocol.pdf>. Acesso em: 19 de setembro de 2019.

QUIRÓS, M., GRAŽULIS, S., GIRDZIJAUSKAITĖ, S., MERKYS, A. & VAITKUS, A.; Using SMILES strings for the description of chemical connectivity in the Crystallography Open Database. *Journal of Cheminformatics*. v. 10, n. 23, p. 1-17, 2018. SARGENTELLI, V.; FERREIRA, A. Nanopartículas Magnéticas: O Cobalto. *Eclética Química*, v. 35, n. 4, p. 153-163, 2010.

SAHOO, Y.; GOODARZI, A.; SWIHART, M. T.; OHULCHANSKYY, T. Y.; KAUR, N.; FURLANI, E. P.; PRASAD, P. N. Aqueous ferrofluid of magnetite nanoparticles: Fluorescence labeling and magnetophoretic control. *Journal of Physical Chemistry* **B**, v. 109, n. 9, p. 3879–3885, 2005.

SENSENIG, R.; SAPIR, Y.; MACDONALD, C.; COHEN, S.; POLYAK, B.; Magnetic nanoparticle-based approaches to locally target therapy and enhance tissue regeneration in vivo. *Nanomedicine*, v. 7, n. 9, p. 1425-1442, 2012.

SCHWAMINGER, S. P., BLANK-SHIM, S. A., SCHEIFELE, I., FRAGA-GARCIA, P., BERENSMEIER, S.; Peptide binding to metal oxide nanoparticles. *Faraday Discussions*, v. 204, p. 233-250, 2017.

SHRESTHA, S., JIANG, P., SOUSA, M. H., MORAIS, P. C., MAO, Z., & GAO, C.; Citrate-capped iron oxide nanoparticles impair the osteogenic differentiation potential of rat mesenchymal stem cells. *Journal of Materials Chemistry B*, v. 4, n. 2, p. 245-256, 2016.

SILVA, R. G.; SILVA, W. E.; BELIAN, M. F.; Quimioterápicos Antineoplásicos à Base de Platina Sob a Luz da Biologia Evolutiva. *Revista Virtual de Química*, v. 10, n. 5, 2018.

SIGMA-ALDRICH. *Glycine.* Product Specification. Disponível em: https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/g7126?lang=pt®ion=BR. Acesso em: 31 de maio de 2020a.

SIGMA-ALDRICH. **Poly-lysine.** BioFiles Life Science Attachment and Matrix Factors. v. 3, n.8. Disponível em: https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/flashapps/biofiles-movie/pdf/biofiles_issue3.8.pdf. Acesso em: 31 de maio de 2020b.

SIGMA-ALDRICH. Product information. *Poly-L-lysine Hydrobromide*. Disponível em: https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/p1524?lang=pt®ion=BR Acesso em: 31 de maio de 2020c.

SIGMA-ALDRICH. Product information. *Cyclophosphamide monohydrate.* Disponível em: https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Sigma/Product_Information_Sheet/c0768pis.pdf. Acesso em: 31 de maio de 2020d.

SOARES, P.I.P.; LOCHTE, F.; ECHEVERRIA, C.; PEREIRA, L.C.J.; COUTINHO, J.T.; FERREIRA, I.M.M.; NOVO, C.M.M.; BORGES, J. P.M.R; Thermal and magnetic properties of iron oxide colloids: influence of surfactants. *Nanotechnology*, v. 26, n. 42, p. 425704, 2015.

SOUZA, G. R., MOLINA, J. R., RAPHAEL, R. M., OZAWA, M. G., STARK, D. J., LEVIN, C. S., BRONK, L. F.; ANANTA, J.S.; MANDELIN, J.; GEORGESCU, M. M.; BANKSON, J.A.; GELOVANI, J.G.; KILLIAN, T.C.; ARAP, W.; PASQUALINI, R.; Three-dimensional tissue culture based on magnetic cell levitation. *Nature nanotechnology*, v. 5, n. 4, p. 291-296, 2010.

SPANS, L.; HELSEN, C.; CLINCKEMALIE, L.; VAN DEN BROECK, T.; PREKOVIC, S.; JONIAU, S.; LERUT, E.; CLAESSENS, F.; Comparative Genomic and Transcriptomic Analyses of LNCaP and C4-2B Prostate Cancer Cell Lines. *PLoS One*, v. 9, n. 2, p. e90002, 2014.

SRINIVASAN, S. Y., PAKNIKAR, K. M., BODAS, D., & GAJBHIYE, V. Applications of cobalt ferrite nanoparticles in biomedical nanotechnology. *Nanomedicine*, v. 13, n. 10, p. 1221-1238, 2018.

TAKAHASHI, A.; MATSUMOTO, H.; YUKI, K.; YASUMOTO, J.; KAJIWARA, A.; AOKI, M.; FURUSAWA, Y.; OHNISHI, K.; OHNISHI, T.; High-Let Radiation Enhanced Apoptosis but not Necrosis Regardless of P53 Status. *International Journal of Radiation Oncology* Biology* Physics*, v. 60, n. 2, p. 591-597, 2004.

TRIVEDI, M. K., SETHI, K. K., PANDA, P., JANA, S.; Physicochemical, thermal and spectroscopic characterization of sodium selenate using XRD, PSD, DSC, TGA/DTG, UV-vis, and FT-IR. *Marmara Pharmaceutical Journal*. v. 21, n. 2, p. 311-318, 2016.

TSENG, H., DAQUINAG, A. C., SOUZA, G. R., & KOLONIN, M. G.; Threedimensional magnetic levitation culture system simulating white adipose tissue. *Adipose-Derived Stem Cells: Methods and Protocols,*.Humana Press, New York, NY, 2018. p. 147-154.

TÜRKER, E., DEMIRÇAK, N., ARSLAN-YILDIZ, A.; Scaffold-free three-dimensional cell culturing using magnetic levitation. *Biomaterials Science*, v. 6 n. 7, p. 1745–1753, 2018.

UMBRICHT, C. A.; BENEŠOVÁ, M.; SCHMID, R. M.; TÜRLER, A.; SCHIBLI, R.; VAN DER MEULEN, N. P.; MÜLLER, C. 44Sc-PSMA-617 for radiotheragnostics in tandem with 177Lu-PSMA-617—preclinical investigations in comparison with 68Ga-PSMA-11 and 68Ga-PSMA-617. *EJNMMI Research*, v. 7, n. 1, 2017.

WU, W.; HE, Q.; JIANG, C.; Magnetic Iron Oxide Nanoparticles: Synthesis and Surface Functionalization Strategies. *Nanoscale research letters*, v. 3, n. 11, p. 397, 2008.

YANG, S. C., RYU, J., CHOI, K. O., KANG, T. S., LEE, J. K., SONG, C. W., KO, S. Dynamic light scattering-based method to determine primary particle size of iron oxide nanoparticles in simulated gastrointestinal fluid. *Food chemistry*, v. 161, p. 185-191, 2014.

ZANONI, M.; PICCININI, F.; ARIENTI, C.; ZAMAGNI, A.; SANTI, S.; POLICO, R.; BEVILACQUA, A.; TESEI, A.; 3D tumor spheroid models for in vitro therapeutic screening: a systematic approach to enhance the biological relevance of data obtained. *Scientific reports*, v. 6, p. 19103, 2016.

ZHANG, T., GE, J., HU, Y., & YIN, Y. A general approach for transferring hydrophobic nanocrystals into water. *Nano letters*, v. 7, n. 10, p. 3203-3207, 2007.

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES Diretoria de Pesquisa, Desenvolvimento e Ensino Av. Prof. Lineu Prestes, 2242 – Cidade Universitária CEP: 05508-000 Fone/Fax(0XX11) 3133-8908 SÃO PAULO – São Paulo – Brasil http://www.ipen.br

O IPEN é uma Autarquia vinculada à Secretaria de Desenvolvimento, associada à Universidade de São Paulo e gerida técnica e administrativamente pela Comissão Nacional de Energia Nuclear, órgão do Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações.