



Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal

DIOGO DE SOUZA LOIOLA

**ATIVIDADE ANTITUMORAL DE NANOPARTÍCULAS DE
MAGHEMITA ASSOCIADA AO CITRATO DE RÓDIO (II)
EM ADENOCARCINOMA DE PRÓSTATA *IN VITRO*.**

Brasília

2020

DIOGO DE SOUZA LOIOLA

ATIVIDADE ANTITUMORAL DE NANOPARTÍCULAS DE
MAGHEMITA ASSOCIADA AO CITRATO DE RÓDIO (II)
EM ADENOCARCINOMA DE PRÓSTATA *IN VITRO*.

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Biologia
Animal, do Instituto de Ciências
Biológicas da Universidade de Brasília.

Orientadora: Prof^a. Dra. Sônia Nair Bão

Brasília, 2020.

Dedicatória

Dedico este trabalho a minha mãe Sonia Souza, ao meu finado pai Walmir Loiola, ao meu irmão Lucas e minha vó Josina Helena.

Agradecimentos

Primeiramente, gostaria de agradecer a pessoa mais importante da minha vida, minha mãe Sonia. Obrigado mãe por me ensinar tudo o que eu sei, você é meu exemplo de vida, responsabilidade, força e perseverança. Ao meu pai Walmir, que me mostrou como se doar ao próximo, como valorizar as pessoas e fazer amizades para uma vida inteira. Obrigado ao meu irmão Lucas Loiola, pelas piadas internas, e nos momentos certos, seu apoio. Vocês três são os pilares que mantêm a minha vida de pé, AMO muito cada um de vocês.

Aos meus irmãos Rômulo Fabiano, Waldívia e Rafaela, meu muito obrigado.

Aos meus familiares, obrigado tios e primos da família Loiola e principalmente da família Souza. Obrigado minha vovozinha linda que eu tanto amo, por suas orações que me protegeram nessa caminhada.

À professora Sônia Nair Bão, pela orientação e apoio que possibilitaram a realização desse mestrado. Levo para minha vida seu exemplo de profissionalismo, organização e ética profissional. A senhora é o 1º dos três pilares que sustentam o nosso laboratório. Tenho um orgulho enorme em ter sido seu orientando. Então meus sinceros agradecimentos!

À Ingrid, por ter sido minha amiga fiel desde o primeiro dia que entrei para o laboratório, obrigado por me ensinar a falar corretamente, me corrigir quando necessário, e me apoiar quando precisei. Saiba que te considero o 2º dos três pilares que sustentam a Microscopia.

À Bruna Guido, que é o 3º dos três pilares centrais do Laboratório de Microscopia. Com elegância, charme e muito requinte, me mostrou como realmente fazer ciência com ética e responsabilidade. Quem sabe um dia eu consiga ser 1/3 do que você é. Ao Diego Nolasco, que por sua vez, me deu um conselho que vou levar para a vida toda. Você me ensinou que quando temos pessoas que nos ama de verdade, não precisamos nos preocupar com a própria felicidade, pois estas pessoas farão isso por você , assim como você faz por elas.

Obrigado especial a professora Thatiane Sampaio, por ter me concedido a oportunidade de ingressar no laboratório de Microscopia e Microanálise, ter segurado na minha mão e me ensinado a dar os primeiros passos dentro da ciência. Obrigado pelas orientações de trabalho e de vida, hoje você é mais que uma professora, é minha amiga.

À Thayssa Victor, por ser um exemplo de integridade, postura e respeito às pessoas que a cercam, obrigado por acreditar no meu potencial e me ajudar a me tornar uma pessoa melhor. Ah! E por não me deixar pagar mico na minha primeira viagem de avião e primeiro congresso da minha vida.

À Barbara Yasmim, por seu papel fundamental na escrita do pré-projeto, pelos conselhos científicos, e consultoria durante todo esse período, mesmo não estando mais em Brasília.

À Barbara Lopes, que entrou junto comigo no mestrado, que não me deixou desistir e me ajudou com toda boa vontade do mundo. Meu muito obrigado.

Ao Welington, irmão, obrigado pela luz que você emana, sua alegria em tempos de tristeza me deu energia necessária para a conclusão desta etapa de minha vida.

Ao Laboratório de Microscopia Eletrônica e cada pessoa que o compõe, foram sete anos de convivência, várias pessoas passaram por aqui, e cada uma deu sua contribuição na minha vida. Foram muitas pessoas e histórias diferentes. Com algumas eu me desentendi outras são amizades para uma vida inteira então meu agradecimento especial aos amigos Natália Lemos, Karine, Núbia, Weskly, Daisy, Eloisio, Matheus, Marcia Rocha, Misleia Rodrigues, Marina, Karen, Ana Brígida, Guilherme Tonelli, Stefanny, Ana Luiza, Melissa e Laís.

Aos professores do bloco K Térreo Renato Resende, Bergman Ribeiro e Tatsuya Nagata, e seus alunos Roberto, Leonardo, Athos e Fabrico pela companhia diária e pela disponibilidade em me ajudar no que foi necessário.

Agradeço a todos meus amigos, principalmente ao “Tio Helinho” que sempre foi mais que um amigo, é um irmão. Seus conselhos foram fundamentais para que eu não desistisse. E em especial ao Rony, obrigado por cada palavra amiga e motivadora que norteou minha caminhada, pois foram vários momentos ruins e em todos você sofreu junto comigo e não me abandonou.

A CAPES, CNPq, FAPDF, FINEP e ao Programa de Pós-graduação em Biologia Animal pelo financiamento deste trabalho. Ao Instituto de Ciências Biológicas e a Universidade de Brasília pela estrutura e ambiente de trabalho.

Por fim, agradeço a Deus, que nunca falhou em minha vida, sempre me abençoando e dando forças para enfrentar todos os obstáculos que passei e ainda irei enfrentar na vida, obrigado Senhor pela proteção e discernimento nas mais diversas situações.

Epígrafe

“É muito melhor lançar-se em busca de conquistas grandiosas, mesmo expondo-se ao fracasso, do que alinhar-se com os pobres de espírito, que nem gozam muito nem sofrem muito, porque vivem numa penumbra cinzenta, onde não conhecem nem vitória, nem derrota.”

(Theodore Roosevelt)

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Os gráficos representam a distribuição de casos e mortes dos dez tipos de câncer mais comuns em 2018 para o sexo masculino.....	16
Figura 2. Incidência e mortalidade de câncer de próstata em 2018.....	17
Figura 3. Representação esquemática do epitélio prostático.....	21
Figura 4. Padrão de Gleason	24
Figura 5. Imagem representativa de nanoestruturas.....	26
Figura 6. Estrutura cristalina e dados cristalográficos da hematita, magnetita e maghemita	27
Figura 7. Estrutura do citrato de ródio II.....	27
Figura 8. Desenho esquemático da associação de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ com Citrato de ródio (II)....	28
Figura 9. Fluxograma do delineamento experimental do projeto.....	31
Figura 10. Nanopartículas de maghemita com citrato de Ródio II por Microscopia Eletrônica de Varredura.	38
Figura 11. Análise por EDS.	39
Figura 12. Constituintes químicos da nanopartícula.....	39
Figura 13. Nanopartícula Magh-Rh ₂ (H ₂ cit) ₄ por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET).	40
Figura 14. Histograma de distribuição.	40
Figura 15. Emissão de Fluorescência. Nanopartículas Mag, Mag-Cit, Rh ₂ (H ₂ cit) ₄ e Magh-Rh ₂ (H ₂ cit) ₄ analisadas no espectrofluorímetro... ..	41
Figura 16. Microscopia de fluorescência de linhagem celular DU-145.....	42
Figura 17. Linhagem celular DU-145 tratada com 400 μM de Magh-Rh ₂ (H ₂ cit) ₄	43

Figura 18. Viabilidade de células DU-145.....	44
Figura 19. Viabilidade de células HNTMC.....	44
Figura 20. Ensaio de formação de colônias	45
Figura 21. Microscopia de Luz da linhagem celular DU-145.....	46
Figura 22. Avaliação morfológica por Microscopia Eletrônica de Varredura da linhagem celulares DU-145 e HNTMC.....	48
Figura 23. DU-145 por Microscopia Eletrônica de Transmissão.....	49
Figura 24. HNTMCs por Microscopia Eletrônica de Transmissão.....	50
Figura 25. Tipo de morte celular por citometria de fluxo.....	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Caracterização dos Fluidos Magnéticos por Zetasizer.....	37
Tabela 2 - Dados quantitativos do EDS.....	39

LISTA DE ABREVIATURAS

BPH: Hiperplasia benigna da próstata

BRCA1: Oncogene que expressa BRCA1 (Proteína do tipo 1 de susceptibilidade ao câncer de mama)

BRCA2: Oncogene que expressa BRCA2 (Proteína do tipo 2 de susceptibilidade ao câncer de mama)

CaP: Câncer de próstata

CaPRC: Câncer de próstata resistente a castração

CaPRCm: Câncer de próstata resistente a castração metastático

CT: Citoplasma

DAPI: 4',6-Diamidino-2-Phenylindole, Dihydrochloride

DH: Diâmetro hidrodinâmico

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium

DNA: Ácido Desoxirribonucleico

DSL: Dispersão Dinâmica da Luz

DTX: Docetaxel solubilizado em etanol absoluto

DU-145: Linhagem de adenocarcinoma de próstata derivado de sítio metastático: cérebro.

EDS/EDX: Espectroscopia de Raios X por Dispersão em Energia

EDTA: Ácido etilenodiamino tetraacético FITC: Fluoresceína

EMA: European Medicines Agency

FCE: Faculdade de Ceilândia

FDA: Food and Drug Administration

G1: fase do ciclo celular

Ic⁵⁰: Metade da concentração inibitória máxima

INCA: Instituto Nacional do Câncer

IPD: Índice de Polidispersão

kDa: kilodaltons

LHRH: Hormônio liberador de hormônio luteinizante

LNCaP: Linhagem de adenocarcinoma de próstata derivada de sítio metastático: linfonodo supraclavicular esquerdo.

MAGH: Maghemita

MAGH-CIT: Maghemita com citrato

MCF-7: Linhagem de células de adenocarcinoma mamário humano não metastático

MDA-MB-231: Linhagem celular de adenocarcinoma mamário humano metastático

MEM: Minimum Essential Media

MET: Microscopia Eletrônica de Transmissão

MEV: Microscopia Eletrônica de Varredura

MMAC1/P10: Gene supressor de tumor no cromossomo 10

MTT: Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium

NIH: National Cancer Institute

NP: Nanopartícula

NPs: Nanopartículas

OMS: Organização Mundial de Saúde

p21: inibidor de quinase dependente de ciclina

p53: Gene codificante da fosfoproteína p53

PAP: Fosfatase acida prostática específica

PBS: Tampão fosfato-salino

PC-3: Linhagem de adenocarcinoma de próstata derivado de sítio metastático: osso

pH: Potencial Hidrogeniônico

PI: Iodeto de Propídio (Propidium Iodide)

PSA: Antígeno prostático específico

P ζ : Potencial Zeta

Q1: Quadrante superior esquerdo

Q2: Quadrante superior direito

Q3: Quadrante inferior direito

Q4: Quadrante inferior esquerdo

R1: Ruído

RA: Receptor andrógeno

S2: Fotomultiplicadora

WHO: World Health Organization

HNTMC: células mesenquimais não tumorais humanas (fibroblastos)

RESUMO

A próstata é uma glândula tubo alveolar. A principal função da próstata adulta é produzir componentes importantes do fluido seminal. A nanobiotecnologia surge como ferramenta multidisciplinar para resolver diversos problemas encontrados em várias áreas do conhecimento. Na saúde, para aplicações farmacológicas, a faixa de tamanho destas nanopartículas varia de 5 a 100 nm. Estudos recentes comprovaram que o agente inorgânico citrato de ródio, quando associado à nanopartículas de maghemita ($\text{Magh-Rh}_2(\text{H}_2\text{cit})_4$), possui estabilidade coloidal e atividade antitumoral em células de câncer de mama pela fragmentação do DNA. O objetivo do trabalho foi avaliar a atividade citotóxica do citrato de ródio II associado à NPs de maghemita ($\text{Magh-Rh}_2(\text{H}_2\text{cit})_4$) em células DU-145 *in vitro*. As linhagens celulares escolhidas para o desenvolvimento do projeto foram DU-145 e HNTMC. A caracterização da forma, morfologia, tamanho e fluorescência da nanopartícula foi investigada usando microscópio eletrônico de varredura (MEV), microscópio eletrônico de transmissão (MET), microscópio de fluorescência e espectrofluorimetria. A estabilidade da partícula foi avaliada no equipamento Zetasizer Nano ZS, aferido o diâmetro hidrodinâmico, potencial zeta e índice de polidispersão. Para as análises da capacidade anti-tumoral da $\text{Magh-Rh}_2(\text{H}_2\text{cit})_4$ foi utilizado o teste de viabilidade celular por exclusão com azul de tripan, alterações morfológicas por MEV, alterações ultraestruturais por MET e internalização por meio de microscopias de fluorescência e MET. Para a identificação do tipo de morte celular (necrose ou apoptose) e alterações morfológicas foi utilizado citometria de fluxo. Após três meses da síntese da NP o pH médio foi de 7,25. O diâmetro hidrodinâmico médio foi de 125,15, o potencial zeta de superfície foi de $-39,41$ mV, com característica monodispersa com índice de polidispersão 0,210. Esses dados revelam que a NP é estável, pois ela não sofre alterações consideráveis nos parâmetros avaliados ao longo do tempo, estes valores são próximos aos encontrados em trabalhos anteriores. O tamanho das NPs $\text{Magh-Rh}_2(\text{H}_2\text{cit})_4$ é um parâmetro importante a ser determinado, pois pode influenciar em sua atividade antitumoral. Os resultados obtidos por MET foram que a NP $\text{Magh-Rh}_2(\text{H}_2\text{cit})_4$ possui a característica de formação de grumos e que apresenta um tamanho de aproximadamente 15 nm. Por MEV foi possível observar a formação de aglomerados similar aos visualizados por MET, e confirmar a presença de ferro e ródio, por meio da ferramenta EDS. A análise de fluorescência no espectrofluorímetro revelou que a $\text{Magh-Rh}_2(\text{H}_2\text{cit})_4$ possui fluorescência excitada em 555 nm. O teste de viabilidade celular de exclusão por azul de tripan revelou a dosagem IC 50 de 400 μM . As alterações morfológicas por meio de MEV mostrou que em função dos tratamentos há uma redução dos prolongamentos celulares e alterações na superfície das células. O ensaio de MET mostrou que as NPs são internalizadas e permanecem em vesículas no citoplasma. Por meio de citometria de fluxo foi possível constatar que a morte celular se dá por necrose e apoptose, sendo a apoptose responsável por cerca de 75% da morte total. As análises indicam real potencial antitumoral da $\text{Magh-Rh}_2(\text{H}_2\text{cit})_4$ em células de adenocarcinoma de próstata, ainda, a NP por possuir fluorescência é uma promissora ferramenta de diagnóstico, no entanto, ainda é necessário outros estudos, principalmente *in vivo*.

PALAVRAS-CHAVES: Câncer de próstata; nanopartículas magnéticas; Ródio II.

ABSTRACT

The prostate is a gland alveolar tube. The main function of an adult prostate is to produce important components of the seminal fluid. The nanobiotechnology appears as a multidisciplinary tool to solve several problems found in many knowledge areas. In health, to pharmacological applications, the size range of these nanoparticles ranges are from 5 to 100 nm. Recent studies proved that the inorganic agent rhodium citrate, when associated to nanoparticles from maghemite ($\text{Magh-Rh}_2(\text{H}_2\text{cit})_4$) has colloidal stability and antitumor activity in breast cancer cells by the fragmentation of the DNA. The goal of this work was to evaluate the antitumor activity of the rhodium citrate II associated to nanoparticles of maghemite ($\text{Magh-Rh}_2(\text{H}_2\text{cit})_4$) in DU-145 in vitro cells. The cell lines chosen for the development of the Project was DU-145 and fibroblast. The description of the shape, morphology, size and fluorescence was investigated using the scanning electron microscope (SEM), transmission electron microscope, fluorescence microscope and spectrofluorimetry. The stability of the particle was evaluated in the Zetasizer Nano SZ equipment, gauged the hydrodynamic diameter and zeta potential and polydispersity index. To the anti tumor capacity statistics of the $\text{Magh-Rh}_2(\text{H}_2\text{cit})_4$ was used the cell viability exam by trypan blue exclusion, morphological alterations by SEM, ultrastructural changes by MET. To the identification of the type of the cell death (necrosis or apoptosis) and morphological alterations was used the flow cytometry. After three months of the synthesis of NP, the average pH was 7,25. The average DH (hydrodynamic diameter) was 125,15, the PZ of the surface was PZ -39,41 mV, with monodispersed feature with PDI 0,210. These data reveals that the NP is stable because it has no considerable changes at the evaluated parameters over time, this values are close to the ones found in the previous works. The size of the NPs $\text{Magh-Rh}_2(\text{H}_2\text{cit})_4$ is a important parameter to be determined, because it might influence the antitumor activity. The results obtained with TEM was that the NP $\text{Magh-Rh}_2(\text{H}_2\text{cit})_4$ pursues the lump-forming feature and it shows the approximately size of 15 nm. With SEM was possible to see the formation of visualized clusters by TEM, and confirm the presence of iron and rhodium, through the EDS tool. The analysis of fluorescence in the spectrofluorimeter revealed that the $\text{Magh-Rh}_2(\text{H}_2\text{cit})_4$ pursues successful fluorescence in 555 nm. The trypan blue exclusion cell viability test revealed that the dosage IC 50 from 400 μM . The morphological alterations through SEM showed that in function of treatments there is a reduction in the cell extensions and changes in the cell membrane. The TEM test showed that the NPs are internalized and stay at the vesicles in the cytoplasm. Through the apoptosis cytometry responsible for 75% of the total death. The analysis indicates real antitumor potential at the $\text{Magh-Rh}_2(\text{H}_2\text{cit})_4$ in prostate adenocarcinoma cells, the NP owing fluorescence it's a promising tool of diagnosis, however, still necessary further tests, mainly *in vivo*.

KEYWORDS: Prostate cancer; magnetic nanoparticles; Rhodium II.

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	17
1.1	CÂNCER DE PRÓSTATA	17
1.1.1	Epidemiologia do Câncer de Próstata	17
1.1.2	Etiologia do Câncer de Próstata	20
1.1.3	Patologia do Câncer de Próstata.....	22
1.2	DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO DO CÂNCER DE PRÓSTATA	23
1.2.1	Diagnóstico do Câncer de Próstata.....	24
1.2.2	Tratamento tradicional do Câncer de Próstata	25
1.2.3	Nanotecnologia.....	26
1.2.4	Nanopartículas de maghemita	27
1.2.5	Citrato de ródio II.....	28
2.	JUSTIFICATIVA	30
3.	OBJETIVO GERAL.....	31
3.1	Objetivos Específicos.....	31
4.	Materiais e Métodos	32
4.1	Linhagens Celulares e Nanopartículas.....	32
4.2	Caracterização dos fluidos magnéticos	33
4.3	Análise da citotoxicidade.....	34

4.4	Análise das alterações morfológicas causadas pelos tratamentos.....	35
4.4.1	Análise por Microscopia de luz.....	35
4.4.2	Análise por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	35
4.4.3	Análise por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET).....	36
4.5	Avaliação do efeito antitumoral por citometria de fluxo	36
4.6	Análise estatística.....	37
5.	Resultados.....	38
5.1	Caracterização dos fluidos magnéticos	38
5.2	Caracterização da nanopartícula por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	38
5.3	Análise Morfológica da Magh-Rh ₂ (H ₂ cit) ₄ por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)	40
5.1	Análise das Nanopartículas por Espectrofluorímetro	41
5.2	Análise por Microscopia de fluorescência	42
5.3	Testes de Viabilidade Celular	44
5.3.1	Exclusão por azul de tripan	44
5.3.2	Formação de colônia	45
5.4	Caracterização Morfológica.....	47
5.4.1	Análise Morfológica após o tratamento com Magh-Rh ₂ (H ₂ cit) ₄ por Microscopia de Luz.....	47
5.4.2	Análise Morfológica após o tratamento com Magh-Rh ₂ (H ₂ cit) ₄ por	

Microscopia Eletrônica de Varredura	48
5.4.3 Análise ultraestrutural após tratamento com Magh-Rh ₂ (H ₂ cit) ₄	50
5.5 Análise de morte celular após os tratamentos por citometria de fluxo	52
6. DISCUSSÃO	53
6.1 Caracterização do fluido magnético.....	53
6.2 Viabilidade Celular	55
7. CONCLUSÕES	58
8. PESPECTIVAS	59
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60

1. INTRODUÇÃO

1.1 CÂNCER DE PRÓSTATA

A carcinogênese é o processo de formação de uma neoplasia, que passa por vários estágios antes de chegar à formação de um tumor, podendo levar vários anos para que uma célula cancerosa prolifere-se e dê origem a um tumor visível. O termo neoplasia é utilizado para designar um “novo crescimento” anormal, excessivo, descontrolado e autônomo, que não cessa quando o estímulo inicial termina. Em geral, apresentam perda ou redução da diferenciação celular, em consequência de alterações em genes e proteínas que regulam a multiplicação e a diferenciação celular (ROBBINS & CONTRAN, 2010; RODRIGUES, 2014).

Em sua fase inicial, o câncer de próstata (CaP) cresce lentamente e pode não apresentar sintomas (STOCKLER *et al.*, 2018). Entretanto, em estágios mais avançados, ocorrem mudanças no tamanho e formato das células neoplásicas prostáticas, que crescem rapidamente podendo se espalhar pelo corpo através de metástases. Os órgãos adjacentes mais suscetíveis à metástase originária do câncer de próstata são: bexiga, responsável pelo abrigo e excreção da urina, o reto, que é o canal da defecação, e as epífises, responsáveis pela mobilidade de ambas as pernas do indivíduo (INCA, 2019).

Nesse estágio pode causar sintomas como: dificuldade para urinar, presença de sangue na urina ou sêmen, pouca urina por micção, redução do jato urinário, demora a iniciar o jato, dor ao ejacular, quando muito avançado, pode provocar dor óssea, infecção generalizada e até insuficiência renal (CAMARGO, 2019).

1.1.1 Epidemiologia do Câncer de Próstata

O câncer de próstata (CaP) é o segundo câncer mais frequente e o quinto como causa principal de morte por câncer em homens. A sua incidência mundial no ano de 2018 foi de 1.276.106 novos casos e causou 358.989 mortes (Figura 1).

Homens

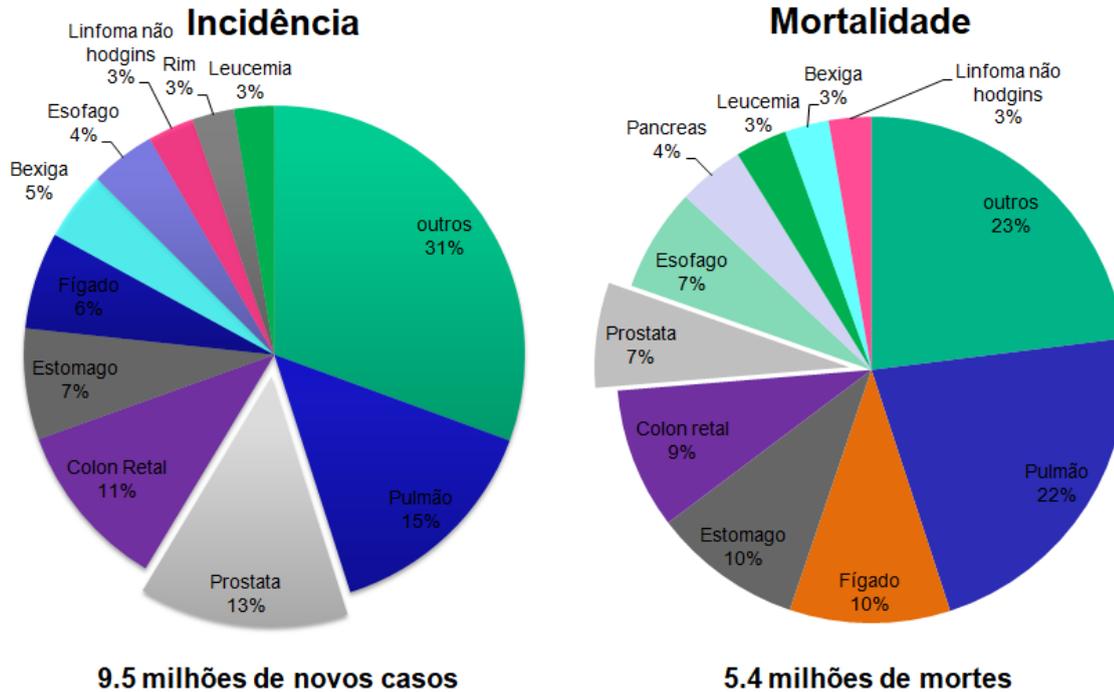


Figura 1. Os gráficos representam a distribuição de casos e mortes dos 10 tipos de câncer mais comuns em 2018 para o sexo masculino. Fonte: GLOBOCAN 2018 (BRAY *et al.* 2018)

A tendência de mortalidade por esse tipo de câncer apresenta-se em declínio em quase todas as regiões do mundo (Figura 2). Por outro lado, a incidência é maior nos países desenvolvidos da América do Norte, Europa Ocidental e Austrália em comparação aos países em desenvolvimento (BRAY *et al.* 2018). Esta disparidade, provavelmente ocorre devido às diferenças entre as práticas regionais de rastreamento de antígeno prostático específico (PSA), o qual é crucial para o monitoramento da doença (KINSELLA *et al.* 2018; NYAME & GORE 2020). O Instituto Nacional de Câncer do Brasil (INCA), por exemplo, não recomenda a triagem sistemática do câncer de próstata (INCA 2013; SILVA 2019), dessa forma, a informação sobre o rastreamento do PSA no país é limitada.

Câncer de Próstata

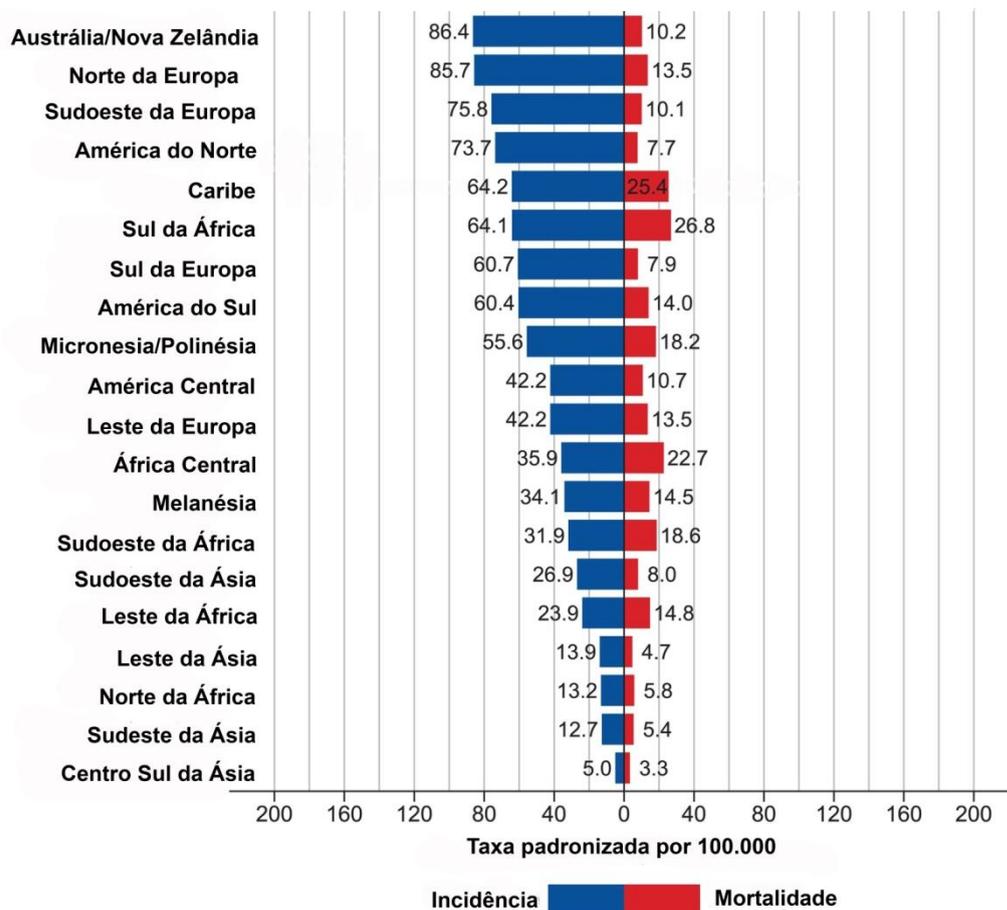


Figura 2. Incidência e mortalidade de câncer de próstata em 2018. Fonte: GLOBOCAN 2018 (BRAY et al. 2018).

No Brasil, estimam-se 68.220 casos novos de CaP para cada ano do biênio 2018-2019, correspondente ao risco estimado de 66,12/100.000 (casos/habitantes). Houve o registro de 15.391 mortes em 2017 (INCA, 2017). Apesar da subnotificação ser um problema no país, estima-se que a região Sul do Brasil seja a mais afetada, com 96,85/100.000 (casos/habitantes) em 2018, seguida pelas regiões Sudeste (69,83/100.000), Centro-Oeste (66,75/100.000), Nordeste (56,17/100.000) e Norte (29,41/100.000) (INCA, 2017). A detecção de CaP em São Paulo, Brasil, foi de aproximadamente 3% (FARIA *et al.* 2010; MULLER *et al.* 2013). Em um estudo brasileiro de 2017, 25% de um total de 16.280 pacientes sucumbiram ao óbito depois do tratamento para CaP (BRAGA *et al.* 2017).

A idade é o fator de risco mais importante para o desenvolvimento do câncer de

próstata. O CaP é raro para homens com menos de 40 anos (LI *et al.*, 2012b) e sua incidência aumenta exponencialmente com a idade (LI *et al.*, 2012a). Quando comparados aos homens de 45 a 69 anos, indivíduos com 70 anos ou mais apresentaram prevalência de câncer cerca de três vezes maior (MORI *et al.*, 2020a). A idade média no diagnóstico de CaP no Brasil é de 68 anos (MORI *et al.*, 2020b), a cada dez homens diagnosticados com câncer de próstata, nove tem mais de 55 anos (SILVA, 2019).

As disparidades raciais na atenção ao CaP também têm sido documentadas em todas as etapas de gestão da neoplasia, desde a apresentação, diagnóstico, tratamento, sobrevida até a morte, com os homens negros com a maior carga em todo o processo de atenção (CHORNOKUR *et al.*, 2011). Os estudos relatam que homens negros apresentaram maior probabilidade de demora em iniciar o tratamento quando comparados com os homens brancos no Brasil e nos Estados Unidos (STOKES *et al.*, 2013; SACRAMENTO *et al.*, 2019).

1.1.2 Etiologia do Câncer de Próstata

A carcinogênese do CaP é lenta e requer a coexistência de fatores de risco constitucionais com fatores de risco ambientais para o desenvolvimento da doença (FERRIS *et al.*, 2011; VAIDYANATHAN *et al.*, 2017). Múltiplos fatores podem estar relacionados ao desenvolvimento da doença e as pesquisas podem apresentar resultados contraditórios. Dessa forma, revisões sistemáticas com meta-análise e casos clínicos com número elevado de participantes têm gerado dados com maior potencial de acreditação na literatura para caracterização dos fatores de risco.

Fatores ambientais implicados no surgimento do câncer de próstata incluem a exposição a herbicidas e pesticidas. Por exemplo, a ocorrência de CaP nos veteranos da Guerra do Vietnã foi causada pelo herbicida agente laranja, desfolhante usado pelo exército dos Estados Unidos durante a guerra (FERRIS *et al.*, 2011; ANSBAUGH *et al.*, 2013). Pacientes fumantes apresentam CaP mais agressivo e apresentam pior resultado no tratamento (BROOKMAN-MAY *et al.*, 2019). A exposição ocupacional ao cádmio e arsênio também aumenta o risco de desenvolvimento de CaP (RAPISARDA *et al.*, 2018). Homens com massa corporal mais elevada e com dieta rica em gordura animal

apresentam maior pré-disposição a desenvolverem CaP (ALLOTT *et al.*, 2013; BRAY & KIEMENEY, 2017).

O genótipo do indivíduo também pode estar envolvido na etiologia do CaP. A transmissão hereditária do CaP está relacionada a 5-15% dos casos (HEIDEGGER *et al.*, 2019). Acredita-se também que o cromossomo X tenha um papel na herança do câncer de próstata, porque contém o receptor de andrógeno (RA) e mutações na região Xq26.3-q27.3 foram observadas em formas esporádicas e hereditárias de câncer de próstata (XU *et al.*, 1998; YASPAN *et al.*, 2008). Estudos mais recentes em 301 famílias afetadas pelo câncer de próstata hereditário definiram vários outros locais (ossos, bexiga e reto) que podem contribuir para o câncer de próstata hereditário (STANFORD *et al.*, 2009; CROPP *et al.*, 2011).

Os eventos iniciais para o desenvolvimento do carcinoma parecem estar relacionados a perda de função dos genes supressores de tumores como gene p53 (BOOKSTEIN *et al.*, 1993). Este codifica a fosfoproteína nuclear de 53-kDa, a qual regula a inibição do ciclo celular e a apoptose em resposta do estresse celular. Aberrações genéticas no p53 no tecido da prostatectomia radical predizem desfechos clinicamente graves de metastase e mortalidade por CaP (QUINN *et al.*, 2019). A proteína P21, codificada pelo gene supressor de tumor p21, é superexpressa em pacientes com CaP (VIOLA *et al.*, 1986). Esta proteína tem a função de inibir a quinase dependente de ciclina e regula a transição do ciclo celular da fase G1 para S. A inibição da P21 tem aumentado a radiosensibilidade das células cancerosas durante o tratamento de CaP (ZHANG *et al.*, 2010). Outro achado é que o gene supressor de tumor MMAC1/p10 apresenta mutações em pacientes com CaP primário (CAIRNS *et al.*, 1997; DONG *et al.*, 2001). Adicionalmente, a existência de mutações no gene BRCA2 e BRCA1 também tem alto risco de desenvolver câncer de próstata (LI *et al.*, 2013; NYBERG *et al.*, 2020).

Embora já se conheça uma variedade de possíveis agentes causadores de CaP, a compreensão da complexidade dos processos ambientais e moleculares que regulam a carcinogênese e a progressão tumoral estão longe de serem elucidados e depende da contínua investigação científica.

1.1.3 Patologia do Câncer de Próstata

A próstata possui forma de cone truncado que mede aproximadamente 4 cm de diâmetro, 2,5 cm de altura e pesa 20 gramas. Situa-se inferiormente à bexiga urinária, anteriormente ao reto, envolvendo a uretra (TIMMS, 2008; HAAGA & BOLL, 2008; SUN *et al.*, 2009). É dividida em quatro zonas glandulares: periférica, transicional, central e periuretral (BARONI *et al.*, 2009). Sua principal função é de produzir e armazenar um fluido incolor e ligeiramente alcalino que constitui 10% a 30% do volume do líquido seminal, que se une aos espermatozoides e juntos formam o sêmen (TIMMS, 2008; SHEN & ABATE-SHEN, 2010;).

O epitélio prostático apresenta elevado nível de organização celular, sendo composto por cinco tipos celulares (Figura 3): células epiteliais basais, células epiteliais secretoras, células transitórias amplificadoras, células neuroendócrinas e células do tipo *stem cells* (SUN *et al.*, 2009; SHEN & ABATE-SHEN, 2010; OLDRIDGE *et al.*, 2012). No compartimento epitelial é secretado o fluido prostático, que contém o antígeno prostático específico (PSA), a fosfatase ácida prostática específica (PAP) e prostaglandinas. A expressão do receptor de androgênios (AR) acontece tanto nas células estromais, como nas epiteliais (ISAACS, 1999; MAITLAND *et al.*, 2008).

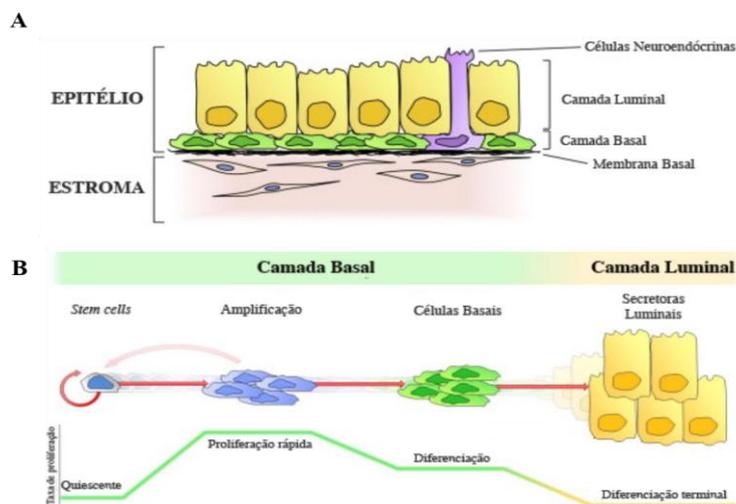


Figura 3. Representação esquemática do epitélio prostático: (A) Arquitetura do epitélio prostático normal. (B) Via hierárquica do epitélio da próstata. Fonte: OLDRIDGE *et al.*, 2012 (adaptado).

A próstata é composta por elementos glandulares e por elementos estromais, separados pela membrana basal (ISAACS, 1999; SUN *et al.*, 2009; LEE *et al.*, 2011; KASIVISVANATHAN *et al.*, 2018). Os elementos glandulares são revestidos pelo epitélio prostático e organizam-se para formar alvéolos e ductos excretórios (DE CARVALHO *et al.*, 1997; VILAMAIOR *et al.*, 2000; 2005). A grande maioria de homens com CaP, apresentam um adenocarcinoma, desenvolvido a partir de células glandulares. Outros tipos de CaP apesar de serem muito raros, incluem: sarcomas, carcinomas de pequenas células, tumores neuroendócrinos e carcinomas de células transicionais (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2020).

Os carcinomas de próstata desenvolvem-se predominantemente na região da zona periférica (65% a 74%) (BARONI *et al.* 2009). A hiperplasia benigna da próstata (BPH) acontece em sua maioria na região da zona de transição (SHEN & ABATE-SHEN, 2010; JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2013).

Quando as neoplasias são similares às células do tecido de origem, possuem taxa de diferenciação e crescimento mais lento e não têm a capacidade de invadir tecidos vizinhos, são classificadas como benignos, mas quando invadem os tecidos adjacentes, as células tendem a se dividir rapidamente de forma agressiva e descontrolada, classifica-se como maligno (INCA, 2019). Esse último caracteriza-se por células anormais que crescem incontrolavelmente e de forma autônoma, resultando na formação de um novo tecido, podendo ir além de seus limites usuais para invadir tecidos adjacentes e se estabelecer em outros órgãos, processo descrito como metástase (HANAHAN & WEINBERG, 2000; ROBBINS & COTRAN, 2010; CAIRNS & MAK, 2016).

1.2 DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO DO CÂNCER DE PRÓSTATA

O câncer de próstata (CaP) é notadamente reconhecido como um problema de saúde pública, dado a sua magnitude no quadro de morbimortalidade masculina, já possuindo consenso entre órgãos oficiais sobre o seu controle e a sua prevenção. Em setembro de 2001, a lei 10.289 instituiu o Programa Nacional de Controle do Câncer de Próstata no Brasil (BRASIL, 2001). A prevenção e detecção precoce do CaP reduz os

riscos de seu agravamento.

1.2.1 Diagnóstico do Câncer de Próstata

O diagnóstico padrão de adenocarcinoma de próstata é realizado por meio do exame clínico tradicional, do toque retal, associado ao exame laboratorial, dosagem do antígeno prostático específico (PSA) em sangue circulante. Em casos suspeitos de tumor é indicada a ultrassonografia pélvica que, por sua vez, poderá mostrar a necessidade de biópsia prostática transretal (INCA, 2018).

O diagnóstico final de câncer de próstata é dado pelo estudo histopatológico do tecido obtido pela biópsia da próstata. O relatório anatomopatológico deve fornecer a graduação histológica do sistema de Gleason, também conhecido como escala ou pontuação de Gleason, e consiste em uma pontuação dada a um câncer de próstata baseada em sua aparência microscópica. O escore de Gleason é importante porque escores maiores estão associados a piores prognósticos, já que são dados a cânceres mais agressivos (GLEASON, 1992).

Para determinar o escore de Gleason (Figura 4), uma peça de tecido prostático deve ser obtida por meio de biópsia. Isto é realizado por meio da remoção da glândula (prostatectomia) ou retirando-se uma amostra da glândula por meio de uma agulha introduzida pelo reto (GLEASON, 1992). O objetivo do escore de Gleason é informar sobre a provável taxa de crescimento do tumor e sua tendência à disseminação, além de ajudar na determinação do tratamento mais adequado para o paciente (NIH, 2019).



Figura 4. Padrão de Gleason (adaptado de NIH, 2019).

1.2.2 Tratamento tradicional do Câncer de Próstata

O CaP é o mais hormônio sensível dentre todos os tipos de câncer (LABRIE, 2011), e a primeira descrição de terapia hormonal, induzida pela utilização de agonistas do hormônio liberador do hormônio luteinizante (LHRH) foi em 1980 (LABRIE *et al.*, 1980), entretanto, este tipo de tratamento só é efetivo quando o tumor é localizado (LABRIE, 2011). Em pacientes com metástase de câncer é recomendada a castração cirúrgica (orquiectomia) ou química (agonistas do LHRH), sendo este tratamento considerado padrão, de primeira linha (OLIVEIRA *et al.*, 2013).

A terapia de privação de andrógenos inibe o crescimento celular de células malignas que dependem dos andrógenos para sua proliferação (TAMMELA, 2012). Um dos problemas da privação de andrógenos é que o tumor se torna resistente, e isso acontece em um prazo de 18 a 24 meses após o início da terapia (OLIVEIRA *et al.*, 2013). Para o tratamento de diversos carcinomas, como o de mama, de próstata, de ovário, de pulmão, gástrico, entre outros, foi descrita a utilização do quimioterápico Docetaxel (DTX) (ZHAO & ASTRUC, 2012), que é um anticancerígeno semi-sintético muito potente, derivado de taxano (XU *et al.*, 2009). Ele foi aprovado para tratamento de câncer de próstata resistente à castração (CaPRC) pela *Food and Drug Administration* (FDA) e pela *European Medicines Agency* (EMA).

A utilização deste quimioterápico é considerada tratamento padrão de primeira linha para metástases do carcinoma da próstata resistentes à castração (CaPRCm) (OLIVEIRA *et al.*, 2013). Essa droga se liga à β -tubulina (MONTERO *et al.*, 2005), estabilizando os microtúbulos, e é agente inibidor da divisão das células por inibir a desmontagem dos microtúbulos, acarretando assim em morte celular (AAPRO, 1996; MONTERO *et al.*, 2005; MUSUMECI *et al.*, 2006).

DTX associado à prednisona (ou prednisolona) é o tratamento de referência para o CaPRC, que são CaPs com quadro de metástase e o paciente apresenta a sintomatologia, ou seja, um quadro oncológico mais grave (FRANKLIN *et al.*, 2013). Alguns estudos demonstram a eficácia da DTX no tratamento de CaPRC, porém, os efeitos adversos no uso deste medicamento ainda é acentuado (TANNOCK *et al.*, 2004). Por exemplo, a associação do DTX a Prednisona em comparação com Mitoxantrona associado à Prednisona demonstraram dados significativos sobre o prolongamento do tempo de vida, mas com um aumento da toxicidade (TANNOCK *et al.*, 2004). Em estudos posteriores confirmaram-se os dados sobre a eficiência do DTX associado à Prednisona (BERTHOLD *et al.*, 2007).

1.2.3 Nanotecnologia

A nanotecnologia é uma área da ciência relativamente nova, porém muito promissora, está presente nas mais diversas aplicações como: medicina, engenharia, biologia, química, ciência de materiais, informática, física entre outras. (TOMKELSKI *et al.*, 2019)

A nanotecnologia surge como ferramenta multidisciplinar para a resolução de diversos problemas encontrados em várias áreas do conhecimento. Na saúde são inúmeras possibilidades cuja uma das principais é o sistema de entrega de fármacos. Nanoestruturas são capazes de encapsular fármacos e protegê-los da ação do organismo, ou mesmo podem servir de carreadores de moléculas para aumentar a biodisponibilidade de fármacos em meio biológico (JAHANGIRIAN *et al.*, 2017).

Nanopartículas (NPs) podem ser dos mais diversos tipos como: nanopartículas de origens poliméricas, metálicas, magnéticas, superparamagnéticas, lipídicas, lipídicas sólidas, nanocápsulas entre outras conforme figura 5 (SAFARI & ZARNEGAR, 2014; DARAEE *et al.*, 2016).

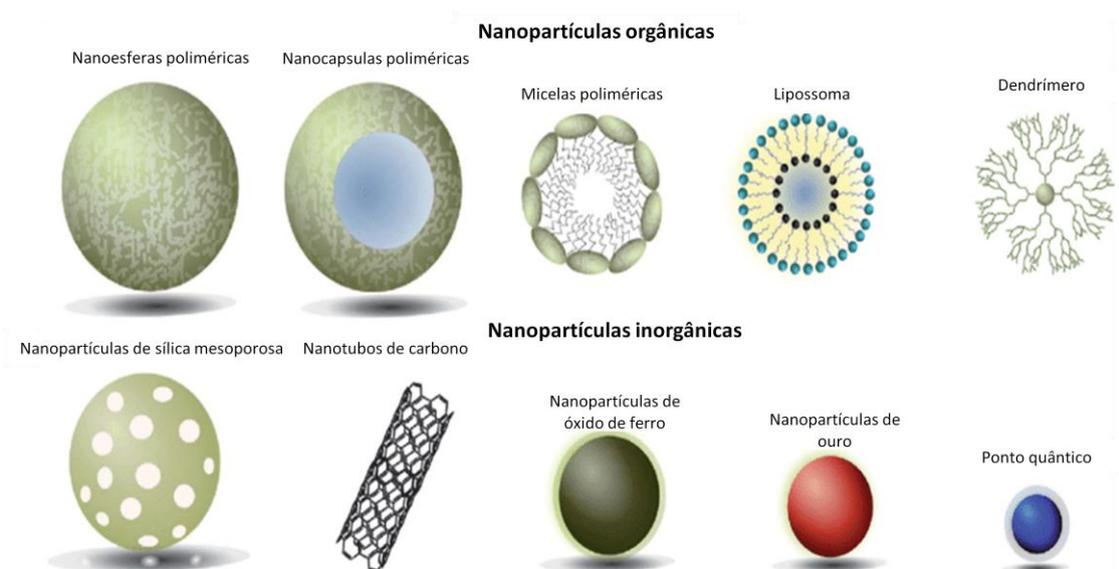


Figura 5. Imagem representativa de nanoestruturas, (adaptado de RICHARDS, *et al.* 2016).

Para aplicações farmacológicas, a faixa de tamanho destas NPs varia de 5 a 100 nm, porém esse tamanho pode variar de acordo com a natureza da nanopartícula (NP) (NIE *et al.*, 2007; DARAEE *et al.*, 2016). A associação de moléculas antitumorais com um nanossistema inorgânico melhora seu desempenho biológico, aumentando a segmentação patológica, diminuindo a quantidade de fármaco a ser administrada, além de acrescentar funções adicionais que esses sistemas podem oferecer como aquecimento térmico e resposta a campos magnéticos que podem facilitar a liberação do medicamento no sítio (TIMKO *et al.*, 2014; GUIVAR *et al.*, 2017).

1.2.4 Nanopartículas de maghemita

A maghemita ($\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$) é o resultado da oxidação de outro composto metálico chamado magnetita. A letra γ é usada para diferenciá-la da hematita que possui

conformação espacial diferente da maghemita, a qual apresenta a mesma fórmula química conforme demonstrado na figura 6 (WU *et al.*, 2015; ASHRAF *et al.*, 2019).

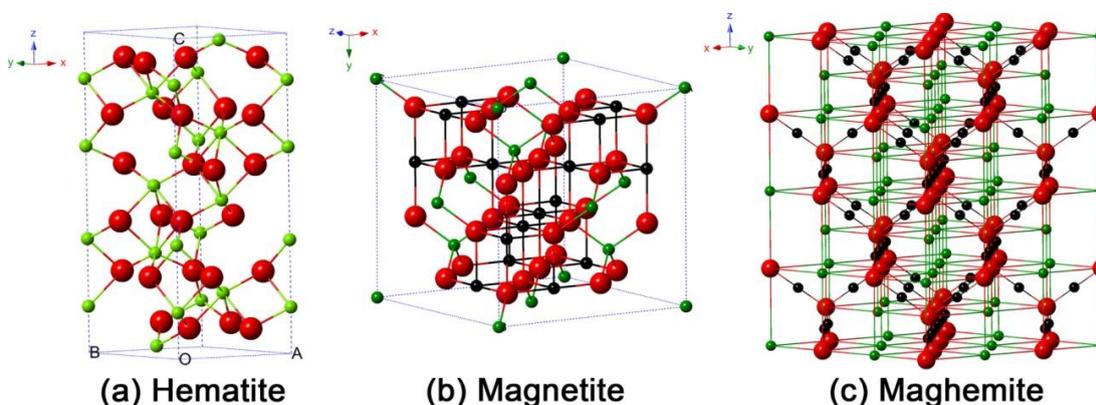


Figura 6. Estrutura cristalina e dados cristalográficos da hematita, magnetita e maghemita (a bola preta é Fe^{2+} , a bola verde é Fe^{3+} e a bola vermelha é O^{2-}). Adaptado de WU *et al.*, 2015)

1.2.5 Citrato de ródio II

O citrato de ródio II ($\text{Rh}_2(\text{H}_2\text{cit})_4$) um dos integrantes dos carboxilatos de ródio (ESPÓSITO, 2000), é um complexo com duas unidades centrais que fazem interação com quatro íons citrato a uma unidade dimetalica $\text{Rh}_2+-\text{Rh}_2+$, possui uma cadeia fechada e é composta por duas moléculas de ródio ligadas a água com quatro grupos radicais constituídos por citrato e três carboxilas (Figura 7).

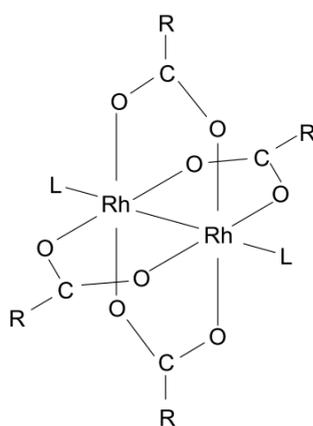


Figura 7. Estrutura do citrato de ródio II. (ESPOSITO, 2015).

Estudos recentes mostram que o agente inorgânico citrato de ródio, quando associado à nanopartículas de maghemita ($\text{Magh-Rh}_2(\text{H}_2\text{cit})_4$) (figura 8), possui estabilidade coloidal e atividade antitumoral em células de câncer de mama pela fragmentação do DNA mediada por espécies reativas de oxigênio (CARNEIRO *et al.*, 2013; CHAVES *et al.*, 2015; PEIXOTO *et al.*, 2015).

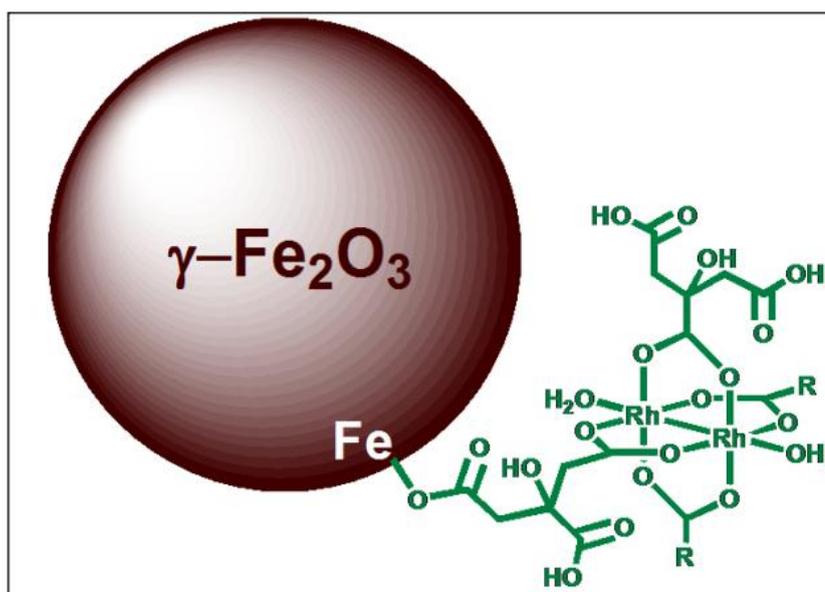


Figura 8. Desenho esquemático da associação de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ com Citrato de ródio(II) (NUNES *et al.*, 2010).

2. JUSTIFICATIVA

Dados referentes ao câncer de próstata revelam um aumento significativo do número de casos acometidos com esta patologia com o decorrer dos anos. De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS, 2019), é o segundo tipo de câncer mais incidente nos homens, e a sexta causa mais frequente de óbitos do sexo masculino no mundo (CASTRO *et al.*, 2011; LIMA *et al.*, 2017), e a cada quatro casos, três são em homens com mais de 65 anos (INCA, 2017).

Um dos fatores limitantes no tratamento dos carcinomas é a falta de especificidade dos quimioterápicos existentes por não ocorrer entrega adequada da droga nas células cancerígenas (BHARALI *et al.*, 2017). Desta forma, são de grande relevância pesquisas que melhorem a especificidade das drogas, fazendo com que elas atuem apenas nas células alvos, minimizando assim sua toxicidade. Os achados deste estudo poderão subsidiar a elaboração de novas formulações farmacológicas para o tratamento desta patologia.

O tratamento padrão para câncer de próstata é baseado no uso de taxanos, porém esse tratamento possui vários efeitos adversos além da resistência decorrente do uso contínuo (MOTTET *et al.*, 2017). O nanossistema composto de citrato de ródio associado à nanopartículas de maghemita (Magh-Rh₂(H₂cit)₄) vem sendo estudado há alguns anos por nosso grupo de pesquisa e já mostrou resultados promissores em modelo de tumor mamário (CARNEIRO *et al.*, 2013, 2015; CHAVES *et al.*, 2015, 2017; PEIXOTO *et al.*, 2015). O estudo da ação de Magh-Rh₂(H₂cit)₄ em outros modelos tumorais é essencial, pois além de ampliar o espectro de tumores que podem ser tratados com esse sistema, elucidar como o processo de internalização e modo de ação dessas nanopartículas pode ser diferente dependendo do tipo celular utilizado.

3. OBJETIVO GERAL

Avaliar a atividade antitumoral do citrato de ródio associado à nanopartículas de maghemita (Magh-Rh₂(H₂cit)₄) em células de adenocarcinoma de próstata (DU-145) *in vitro*.

3.1 Objetivos Específicos

- Caracterizar as nanopartículas;
- Avaliar o efeito citotóxico da nanopartícula Magh-Rh₂(H₂cit)₄, em DU-145 (e células não tumorais HNTMC (fibroblastos) *in vitro*;
- Descrever as alterações morfológicas das células DU-145 e HNTMC decorrentes do tratamento com as nanopartículas e a internalização de Magh-Rh₂(H₂cit)₄ por microscopia eletrônica de transmissão;
- Estudar o efeito antitumoral de Magh-Rh₂(H₂cit)₄ nas células DU-145 por meio dos ensaios de citometria de fluxo: morte Celular.

4. Materiais e Métodos

4.1 Linhagens Celulares e Nanopartículas

A linhagem celular de adenocarcinoma de próstata DU-145 foi cultivada em meio Minimum Essential Media (MEM) (1% de antibiótico e 10% de soro fetal bovino). A linhagem de células não tumorais HNTMC provenientes de polpa dental humana, constituída prioritariamente de fibroblastos, foi cultivada em Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (1% de antibiótico e 10% de soro fetal bovino). As células foram mantidas em incubadora úmida à 37°C e 5% de CO₂, com troca de meio de cultivo e passagens regulares de acordo com a taxa de crescimento.

Os fluidos nanoestruturados foram divididos em 4 grupos: nanopartículas de Maghemita (Magh), Maghemita com citrato (Magh-cit), Citrato de ródio II livre (Rh₂(H₂cit)₂) e Maghemita associada com citrato de ródio II (Magh-Rh₂(H₂cit)₄). Todas foram sintetizadas em colaboração com o professor Marcelo Henrique Souza da Universidade de Brasília, Faculdade de Ceilândia (FCE). A seguir é apresentado um esquema relativo ao desenho experimental utilizado para o desenvolvimento do trabalho (figura 9).

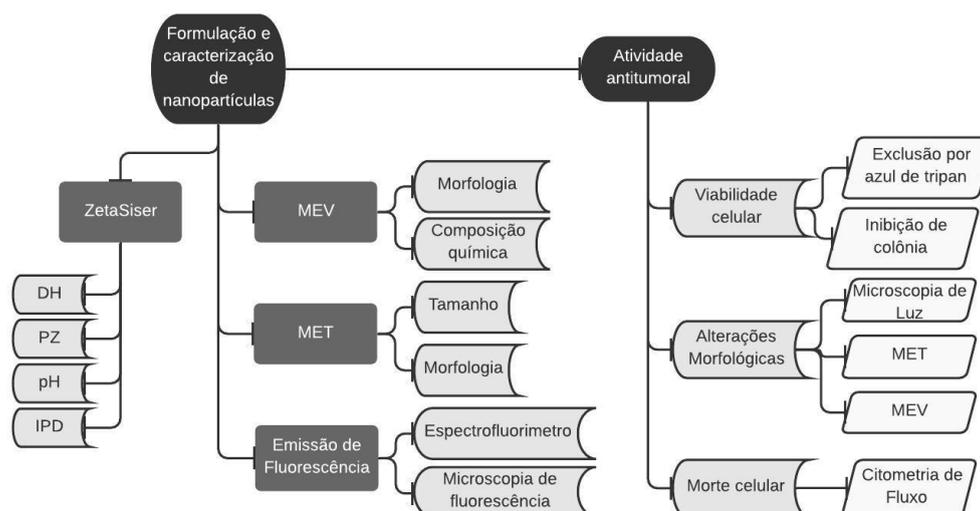


Figura 9. Fluxograma do delineamento experimental do projeto.

4.2 Caracterização dos fluidos magnéticos

Os fluidos magnéticos foram caracterizados quanto sua carga, diâmetro hidrodinâmico, pH e Índice de polidispersão. As amostras foram diluídas em água desionizada e em meio de cultura na temperatura de 25°C, e analisadas no equipamento ZetaSizer Nano (ZS-ZEN3600, Instrumentos Malvern, Reino Unido). A estabilidade das nanopartículas foi verificada em análises ao longo de 600 dias. As amostras foram diluídas na proporção de 1:1000.

A morfologia das nanopartículas foi avaliada por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). As amostras foram diluídas na proporção de 1:2000, montadas em *stubs* recobertos com fita de carbono, secas a temperatura ambiente, metalizadas e analisadas por MEV (JEOL JSM-7001F, Japão). Também foi realizada a análise por meio de espectroscopia por dispersão de energia (EDS) para a identificação da composição da mesma por meio do mesmo equipamento.

A caracterização do diâmetro e a polidispersão das populações das nanopartículas foram realizadas utilizando Microscópio Eletrônico de Transmissão (MET). Para o preparo das amostras, foi realizada a diluição da nanopartícula na proporção de 1:2000, a suspensão passou por 3 ciclos de 10 min em ultrassom para que as partículas ficassem espalhadas e não aglomeradas, característico das partículas magnéticas. Após esse procedimento, foi colocada uma gota em cima do grid recoberto com formvar, após 5 min o excesso foi retirado com o auxílio de papel filtro, aguardou-se secar e a amostra foi analisada no MET (JEOL 1011, Japão), 80kV. As medidas foram realizadas utilizando o software ImageJ.

A análise de emissão de fluorescência foi realizada no espectrofluorímetro Fluorolog (HORIBA, Japão). As amostras foram diluídas nas mesmas concentrações e excitadas na faixa fixada em 555 nanômetros e posteriormente analisadas no equipamento com abertura de fenda de 10 nanômetros.

Para visualizar a emissão de fluorescência da nanopartícula de Magh-Rh₂(H₂cit)₄ em células DU-145 por microscopia de fluorescência, foi realizado o plaqueamento de 1x10⁵ células sobre lamínulas redondas em placas de 24 poços. Após a adesão, o meio de cultura foi retirado e as células foram tratadas com 400 µM de Magh-Rh₂(H₂cit)₄ e

incubadas por 6, 12 e 24 horas. Após o tratamento as lâminas montadas foram analisadas em Microscópio de fluorescência Axiophot (Zeiss, Alemanha)

4.3 Análise da citotoxicidade

4.3.1 Exclusão por azul de tripan

Para a análise da toxicidade das formulações utilizadas neste trabalho, foi realizado o ensaio de viabilidade celular por exclusão, utilizando o corante vital azul de tripan. As linhagens celulares DU-145 e de HNTMC (controle) foram semeadas em placas de 24 poços na concentração de 5×10^4 células em 300 μL de meio MEM ou DMEM de acordo com a linhagem e incubadas por 24 h. Posteriormente, foram adicionados às células os tratamentos nas concentrações de 100, 200, 300, 350, 400 e 600 μM de Magh-Rh₂(H₂cit)₄ e para um grupo de cada linhagem foi adicionado meio de cultura fresco para controle. Após 24 e 48 h, o sobrenadante contendo as células mortas e as células que restaram aderidas aos poços foram coletadas em microtubos. Para a contagem, foram utilizados 25 μL de cada suspensão celular e acrescentados 25 μL de azul de tripan 0,4% (Invitrogen) as soluções foram homogeneizadas e incubadas por três minutos à temperatura ambiente, e em seguida as células foram contadas em câmara de Neubauer. Todas as células foram quantificadas (coradas e não coradas). O cálculo da viabilidade celular foi realizado dividindo-se o número de células viáveis (não coradas) pelo número de células totais e multiplicando por 100.

4.3.2 Ensaio de formação de colônia

O ensaio de formação de colônia é um teste de sobrevivência celular onde é possível analisar a capacidade das células se proliferarem e formarem colônias. Para esse teste, as células DU-145 (1×10^5 por poço) foram semeadas em placas de 24 poços e após sua adesão foram tratadas com 400 μM de Magh-Rh₂(H₂cit) por 24 h. Após o tratamento, a solução foi retirada dos poços e as células sobreviventes foram lavadas duas vezes com PBS 1X e depois desaderidas com auxílio de tripsina-EDTA. Para cada

grupo experimental foi contado e conferida a viabilidade das células com o corante azul de tripan 0,4%. Inicialmente, 1×10^3 foram semeadas em placas de 6 poços com meio MEM, e as células ficaram em cultivo por 14 dias, com o meio de cultivo sendo renovado de acordo com a necessidade. As colônias então formadas foram processadas para a visualização. O meio de cultivo foi retirado e os poços foram lavados cuidadosamente duas vezes com PBS 1X. As colônias foram fixadas com metanol por duas vezes, cinco min cada banho. Para corar as células, foi utilizado cristal violeta 0,5% em água destilada e incubado por cinco min. O corante foi removido e os poços foram lavados com água corrente. As imagens das colônias foram observadas no estereoscópio LEICA M205 C (Leica – Alemanha) no aumento de 8x e as imagens foram obtidas pela câmera LEICA DFC295 (Leica – Alemanha) com auxílio do software Leica Application Suite (Leica – Alemanha).

4.4 Análise das alterações morfológicas causadas pelos tratamentos

4.4.1 Análise por Microscopia de luz

As análises das alterações morfológicas nas células DU-145 e nos HNTMC após 24 e 48 h de tratamento com a formulação Magh-Rh₂(H₂cit)₄ na concentração de 400 µM, foram investigadas por meio de microscopia de luz com o recurso de contraste de fase Axiophot (Zeiss, Alemanha).

4.4.2 Análise por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Para a análise morfológica das células DU-145 e HNTMC, foram semeadas 1×10^6 células em placa de 6 poços contendo no fundo uma lamínula (18x18mm) e após a adesão celular, foram incubadas com 400 µM de Magh-Rh₂(H₂cit)₄ por 24 h. Foi feito o controle sem tratamento com NP. Transcorrido o tempo de incubação, as células foram fixadas com a solução Karnovsky (2% de glutaraldeído, 2% de paraformaldeído, 3% de sacarose, 0,005 M de cloreto de cálcio em tampão cacodilato de sódio 0,1 M)

overnight, a 4°C. Subsequentemente, as células foram lavadas com tampão cacodilato de sódio 0,1 M (pH 7,2) e pós-fixadas durante 30 min com 1% de tetróxido de ósmio. Em seguida, as células foram lavadas duas vezes com água destilada e desidratadas em gradiente crescente de acetona (50%, 70%, 90% e 100%) durante 5 min cada. Após a desidratação, as amostras foram submetidas ao processo de secagem em ponto crítico (Balzers, Alemanha), montadas em porta espécime e metalizadas com ouro no equipamento Sputter coater (Leica, Alemanha). Após essas etapas, as amostras foram analisadas no MEV (JEOL JSM-7001F, Japão).

4.4.3 Análise por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

As linhagens celulares DU-145 e HNTMC foram plaqueadas e após adesão as células receberam ou não (controle) o tratamento com as nanopartículas (400 µM) por 3 e 6 h. As células foram então centrifugadas e lavadas para a retirada do meio de cultura. Logo em seguida, foram fixadas em solução Karnovsky a 4°C por aproximadamente 12h e pós-fixadas por 30 min em tetróxido de ósmio 2%, ferricianeto de potássio 1,6% em tampão cacodilato de sódio 0,2M, pH 7,2. Após essa etapa, foi realizada a contrastação *in block* em solução aquosa de acetato de uranila 0,5% por 24h, desidratados em série de acetona (30-100%) e embebidos em resina Spurr's. Cortes ultrafinos foram contrastados com acetato de uranila e citrato de chumbo, e posteriormente examinados e fotografados em Microscópio Eletrônico de Transmissão (JEOL 1011, Japão) a 80 kV.

4.5 Avaliação do efeito antitumoral por citometria de fluxo

A via de morte celular foi avaliada por citometria de fluxo (FACSCalibur, BD Biosciences, Inc., San Jose, CA) por meio de marcação com anexina e iodeto de propídio (PI).

O preparo das amostras foi realizado por meio da marcação das células tumorais de próstata, DU-145, com anexina V-FITC e iodeto de propídio (PI). 3×10^5 células foram semeadas em placas de 6 poços. Após 24h, as células receberam o tratamento

(Magh), (Magh-cit), (Rh₂(H₂cit)₂) e (Magh-Rh₂(H₂cit)₄) na concentração de 400 µM por 24h. Decorrido o tempo de tratamento, tanto as células aderentes como as em suspensão foram lavadas com PBS e ressuspensas em 100 µL de tampão de ligação de anexina V (10 mM HEPES, 140 mM NaCl e 2,5 mM de CaCl₂ – pH 7,4) contendo 3 µL de anexina-V, por 15 min a temperatura ambiente, protegidas da luz. Após este período, 400 µL do tampão de ligação da Anexina V foram adicionados aos tubos, mantidos no gelo, e posteriormente adicionados 500 µL da solução de PI (PBS e Iodeto de Propídio – para concentração final de 2 µg/mL). As células foram incubadas por mais 5 min no gelo, lavadas com PBS e a aquisição dos dados foi feita no citômetro FACSCalibur (Becton Dickinson) com o auxílio do software CellQuest-Pro. As análises foram feitas a partir de 3 experimentos independentes realizados em triplicata.

A análise dos dados foi realizada no programa FlowJo v.5.2.7 e gráficos feitos no programa GraphPad Prism 5.1.

4.6 Análise estatística

Os dados das análises quantitativas foram submetidos ao teste t de Student para amostras não pareadas (entre dois grupos) ou à análise de variância simples (ANOVA) (entre três ou mais grupos). As análises estatísticas foram conduzidas utilizando o Software GraphPad Prism 5.1 e os resultados foram expressos como Média ± SEM. Valores de P < 0,05 foram considerados estatisticamente significativos.

5. Resultados

5.1 Caracterização dos fluidos magnéticos

Parâmetros de DH, Ipd, $P\zeta$ e pH foram utilizados para medir a estabilidade da formulação. Após acompanhamento ao longo de 600 dias (20 meses) desses parâmetros após a síntese da nanopartícula de Magh-Rh₂(H₂cit)₄, realizando uma média dos resultados encontrados, foram obtidos os seguintes valores: pH de 7,25, DH de 125,15, $P\zeta$ -39,41 mV e IPD de 0,210 (Tabela 1).

Tabela 1- Caracterização dos Fluidos Magnéticos por ZetaSizer.

	Tempo (dias)								
	0	1	7	15	30	60	90	600	Média
pH	7,2	7,1	7,3	7,2	7,4	7,1	7,2	7,5	7,25
DH	121,3	120,1	119,7	122	121,8	119,9	122	154,4	125,15
Pζ	-37,6	-39,4	-42,1	-40,7	-38,9	-39,4	-40,2	-37,0	-39,41
IPD	0,203	0,187	0,193	0,213	0,199	0,21	0,198	0,281	0,210

pH: potencial hidrogênio. DH: Diâmetro Hidrodinâmico. $P\zeta$: Potencial Zeta. IPD: Índice de polidispersão.

5.2 Caracterização da nanopartícula por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Por meio das imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura, foi possível observar a presença de aglomerados de nanopartículas magnéticas de maghemita associadas ao citrato de ródio II (Figura 10), padrão característico desse tipo de material.

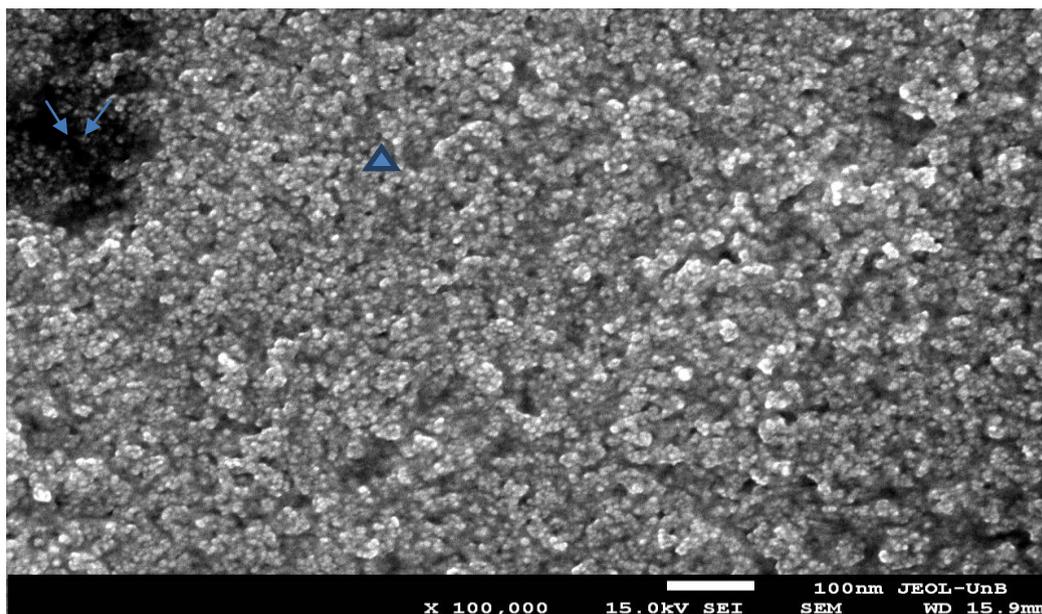


Figura 10. Nanopartículas de maghemita com citrato de Ródio II. Caracterização morfológica da nanopartícula $\text{Magh-Rh}_2(\text{H}_2\text{cit})_4$ por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) (aumento 100.000x). Na seta é possível observar uma nanopartícula isolada, no triângulo podemos ver a aglomeração de nanoestruturas que assumem esse formato em função de suas características magnéticas.

A identificação dos elementos químicos presentes na nanopartícula $\text{Magh-Rh}_2(\text{H}_2\text{cit})_4$ foi realizada por meio da técnica de EDS (Figuras 11 e 12), a qual revelou a presença de oxigênio (O), ferro (Fe) e ródio (Rh) na amostra, comprovando a funcionalização das nanopartículas magnéticas de óxido de ferro com citrato de ródio. Outros elementos residuais como sódio (Na), magnésio (Mg), silício (Si) e cálcio (Ca) também foram identificados. A presença de ouro (Au) se deve ao processo de metalização (Figura 11 e Tabela 2).

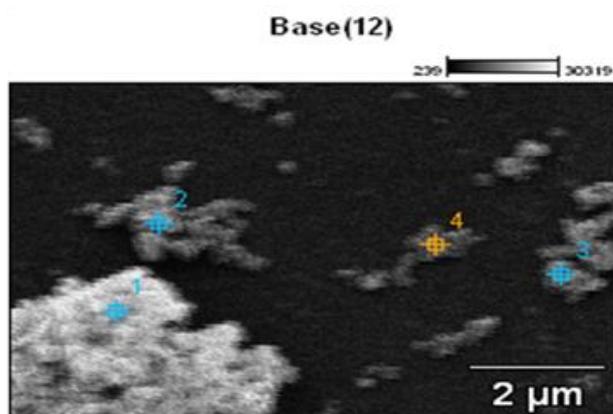


Figura 11. Micrografia de nanopartículas com os pontos 1,2,3 e 4 selecionados aleatoriamente a fim de identificar os elementos químicos que constituem a amostra com o uso de EDS.

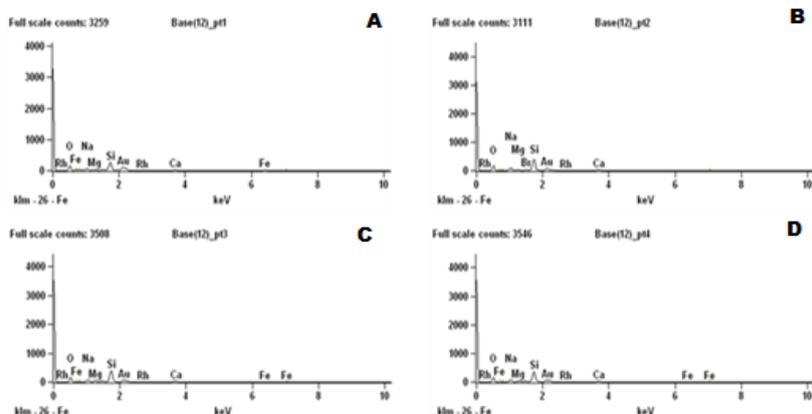


Figura 12. Constituintes químicos da nanopartícula Magh-Rh₂(H₂cit)₄, resultado da análise por EDS, onde os gráficos A,B,C e D representam os pontos 1,2,3 e 4 da figura 11.

Tabela 2 - Dados quantitativos do EDS.

	O	Na	Mg	Si	Ca	Fe	Rh	Au
Figura 13 (A)	34.61	6.47	1.75	17.85	2.59	6.64	0.58	33.19
Figura 13 (B)	36.23	8.01	2.25	28.63	4.61	1.13	0.09	19.14
Figura 13 (C)	36.35	8.87	2.32	31.33	4.56	0.17	0.03	16.54
Figura 13 (D)	35.29	8.12	2.00	27.31	3.71	0.96	1.36	21.26

5.3 Análise Morfológica da Magh-Rh₂(H₂cit)₄ por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

Nas imagens obtidas por microscopia eletrônica de transmissão (Figura 13), observou-se novamente a formação de aglomerados de nanopartícula Magh-Rh₂(H₂cit)₄, corroborando com as imagens obtidas por MEV (Figura 10). Por meio do software ImageJ, 500 nanopartículas foram mensuradas apresentando pico modal entre 10 a 17 nm (Figura 14).

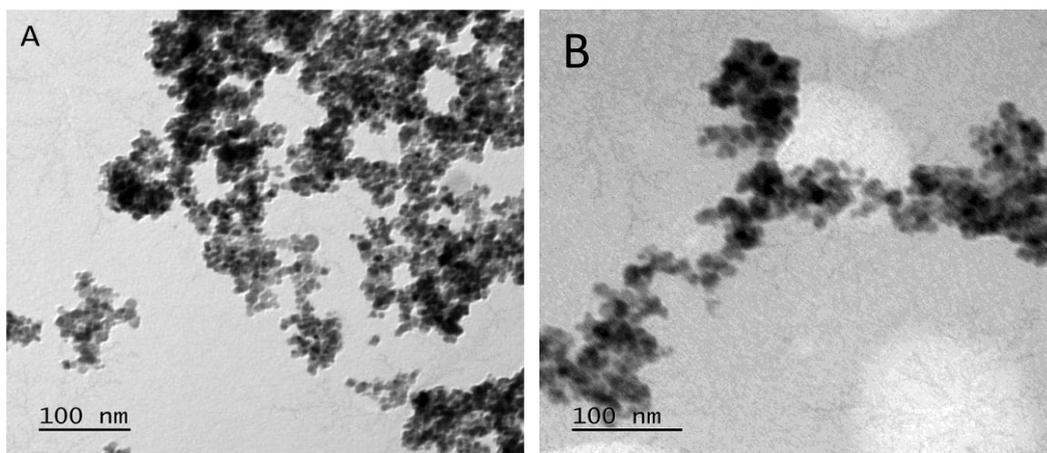


Figura 13. Nanopartícula Magh-Rh₂(H₂Cit)₄ por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET). Micrografias de aglomerados de Magh-Rh₂(H₂Cit)₄. A: 25.000X. B: 30.000X.

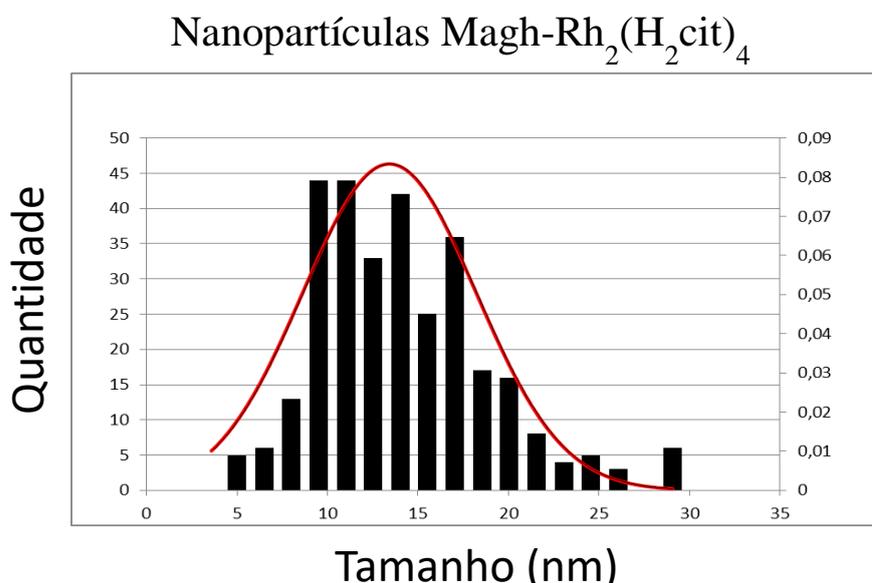


Figura 14. Histograma de distribuição. Histograma de relação entre o tamanho das nanopartículas e quantidade, obtidos através das imagens A e B da figura 12.

5.1 Análise das Nanopartículas por Espectrofluorímetro

A emissão de fluorescência por Espectrofluorímetro, foi realizada para os seguintes compostos: (I) nanopartícula de Maghemita (Magh); (II) nanopartícula funcionalizadas com citrato (Magh-cit); (III) citrato de ródio livre (Rh₂(H₂cit)₄) e (IV) nanopartícula funcionalizada com citrato e ródio (Magh-Rh₂(H₂cit)₄).

As amostras Magh (linha amarela) e Magh-cit (linha azul) não apresentaram fluorescência, entretanto, a amostra $Rh_2(H_2cit)_4$ (linha verde) emitiu fluorescência em 650 nm e a amostra Magh- $Rh_2(H_2cit)_4$ (linha vermelha) em 570 nm como mostrado na figura 15.

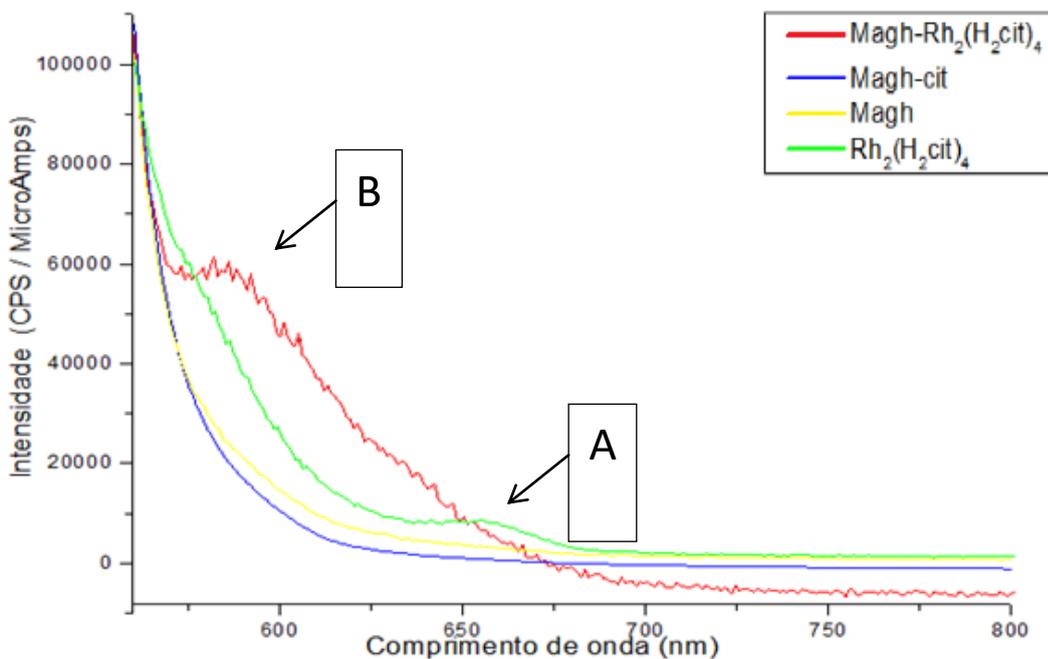


Figura 15. Emissão de Fluorescência das nanopartículas Magh, Magh-Cit, $Rh_2(H_2cit)_2$ e Magh- $Rh_2(H_2cit)_4$) analisadas no espectrofluorímetro. O gráfico exibe o resultado da curva da amostra em fotomultiplicadora (S2) sem o ruído do sinal do equipamento (R1). A linha verde no ponto A, mostra o comprimento de onda da fluorescência do ródio na faixa de 630 a 670 nm e na linha vermelha no ponto B, evidencia a emissão de fluorescência no comprimento na faixa de 550 a 590 nm.

5.2 Análise por Microscopia de fluorescência

Os compostos Magh e Magh-Cit testados separadamente não apresentaram fluorescência. O $Rh_2(H_2cit)_4$ e a Magh- $Rh_2(H_2cit)_4$ apresentaram fluorescência no espectro verde (Figuras 16 e 17). As imagens foram sobrepostas, e apresentaram a localização citoplasmática dos compostos. O único marcador utilizado para a análise foi o DAPI, marcador nuclear.

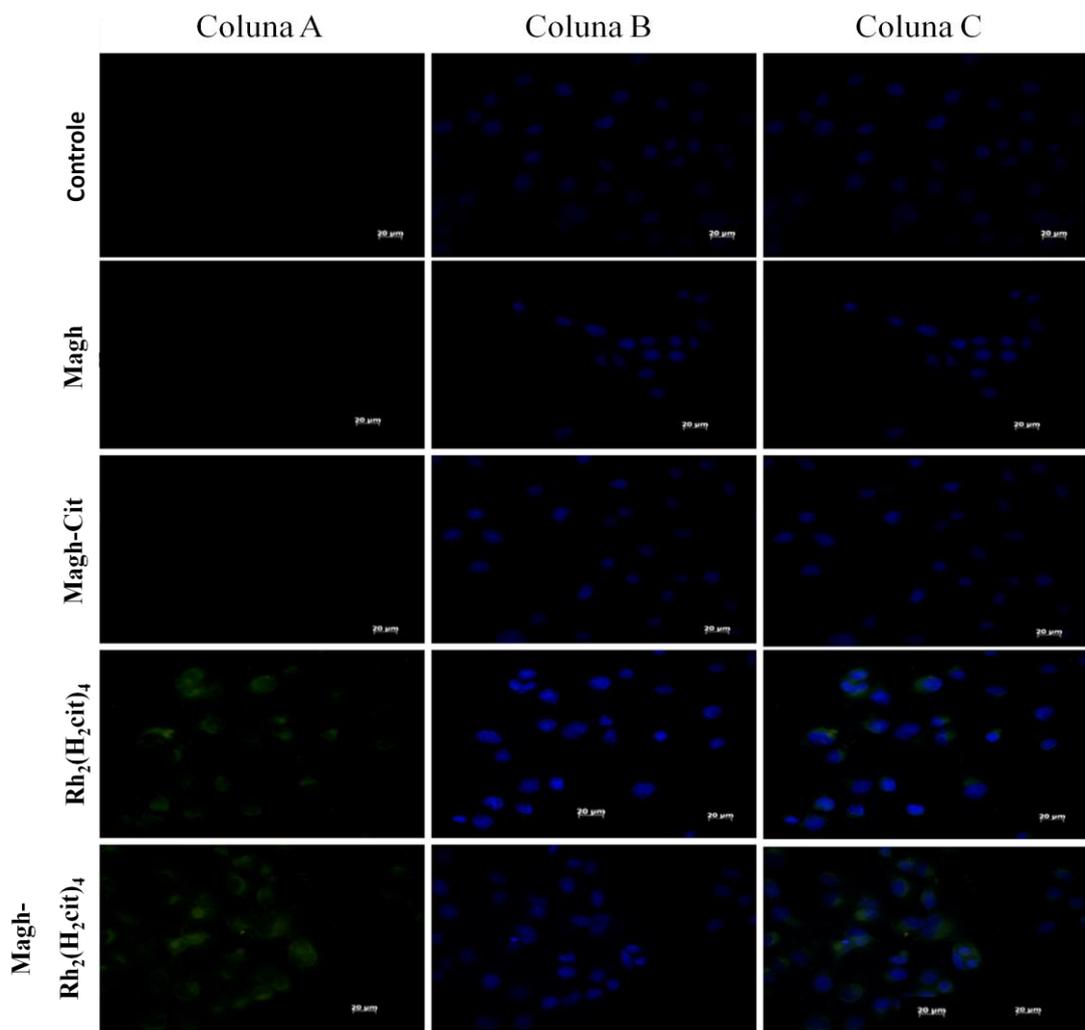


Figura 16. Microscopia de fluorescência da linhagem celular DU-145. Coluna A: Sem marcação. Coluna B: marcação com DAPI e coluna C: sobreposição das colunas A e B. Barra de escala 20 μ m.

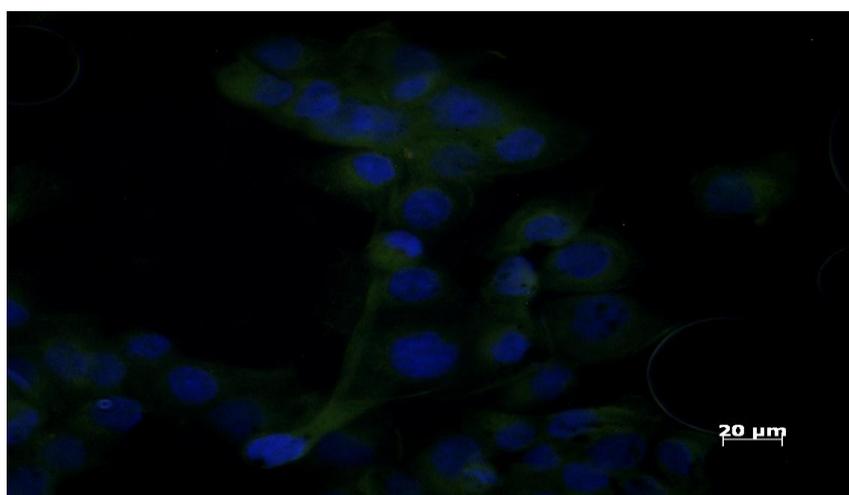


Figura 17. Linhagem celular DU-145 tratada com 400 μM de $\text{Magh-Rh}_2(\text{H}_2\text{cit})_4$. Em azul marcação de DNA por DAPI, em verde fluorescência da nanopartícula.

5.3 Testes de Viabilidade Celular

5.3.1 Exclusão por azul de tripan

O tratamento com a nanopartícula de $\text{Magh-Rh}_2(\text{H}_2\text{cit})_4$ promoveu a redução da viabilidade de células tumorais (Figura 18) e não tumorais (Figura 19) em todas as concentrações analisadas.

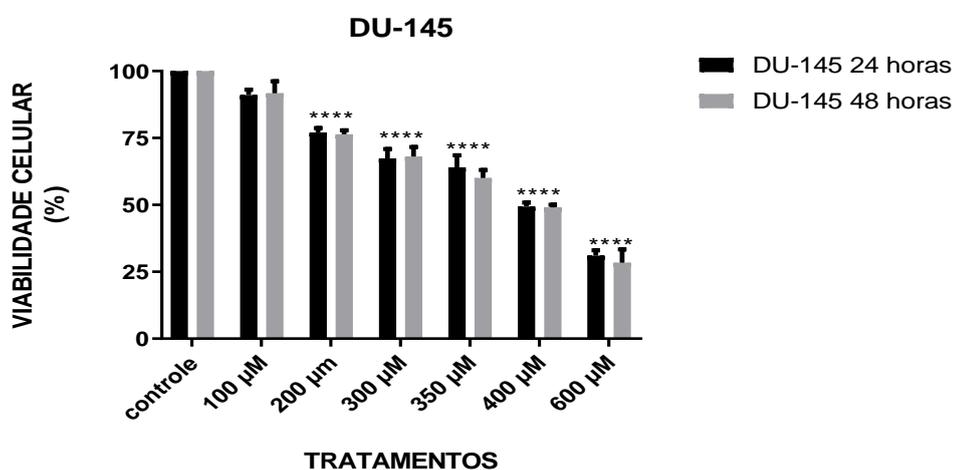


Figura 18. Viabilidade de células DU-145. Após 24 e 48 h de tratamento com $\text{Magh-Rh}_2(\text{H}_2\text{cit})_4$ nas concentrações de 100, 200, 300, 350, 400 e 600 μM . **** há diferença estatística com o controle. $P < 0,001$ (***).

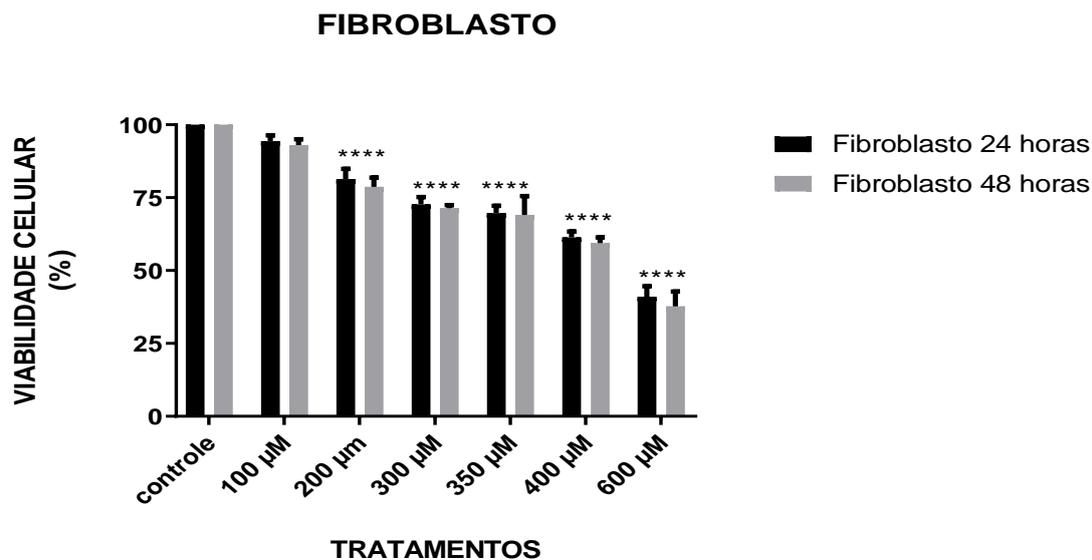


Figura 19. Viabilidade de fibroblastos (HNTMC). Após 24 e 48 h de tratamento com Magh-Rh₂(H₂cit)₄ nas concentrações de 100, 200, 300, 350, 400 e 600µM. **** há diferença estatística com o controle. P <0,001(***).

5.3.2 Formação de colônia

Após 24 horas de tratamento das células DU-145 com Magh, Magh-Cit, Rh₂(H₂cit)₄ e Magh-Rh₂(H₂cit)₄ e após 14 dias de cultivo, a capacidade de formação de colônia, bem como o tamanho das células foram avaliados. O tratamento com Magh-Rh₂(H₂cit)₄ foi o que diminui a capacidade clonogênica das células, visto que reduziu a quantidade e o tamanho das colônias (Figura 20).

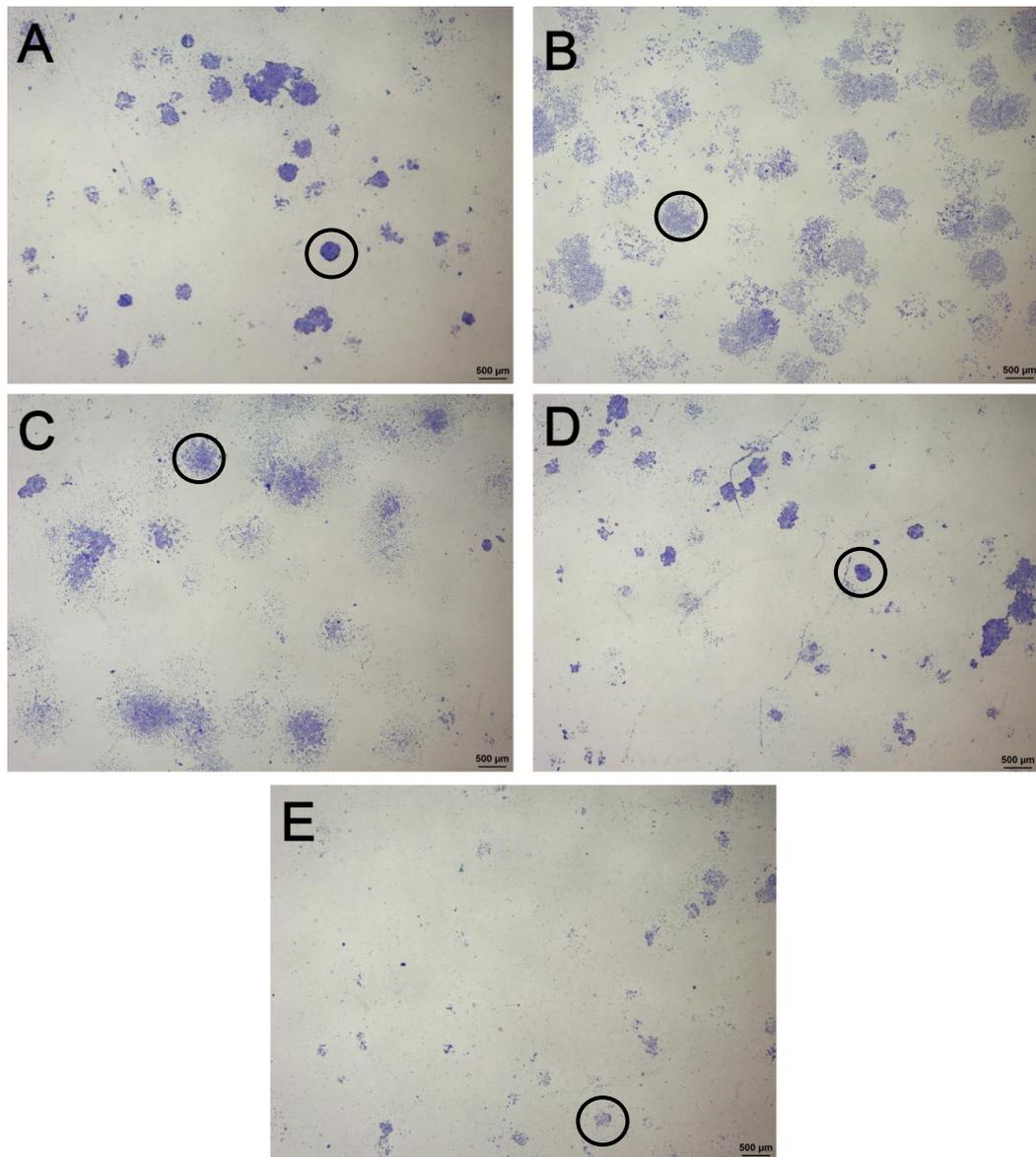


Figura 20. Ensaio de formação de colônias. (A) controle sem tratamento, (B) tratamento com Magh, (C) tratamento com Magh-Cit, (D) tratamento com $\text{Rh}_2(\text{H}_2\text{cit})_4$ e (E) tratamento com Magh- $\text{Rh}_2(\text{H}_2\text{cit})_4$. A coloração azul nas imagens representam células coradas com azul de tripan, possibilitando observar a quantidade e o tamanho das colônias em cada tratamento. Os círculos idênticos que aparecem em todas as imagens evidenciam uma colônia de cada amostra e as alterações de tamanho e quantidade das colônias.

5.4 Caracterização Morfológica

5.4.1 Análise Morfológica após o tratamento com Magh-Rh₂(H₂cit)₄ por Microscopia de Luz

Análises morfológicas da linhagem células DU-145, demonstraram que após o tratamento com a nanopartícula Magh-Rh₂(H₂cit)₄ as mesmas apresentaram diferenças estruturais significativas, como diminuição dos pontos de adesão, alteração da capacidade de formação de colônias e visível redução do tamanho da célula podendo ser observado na figura 21.

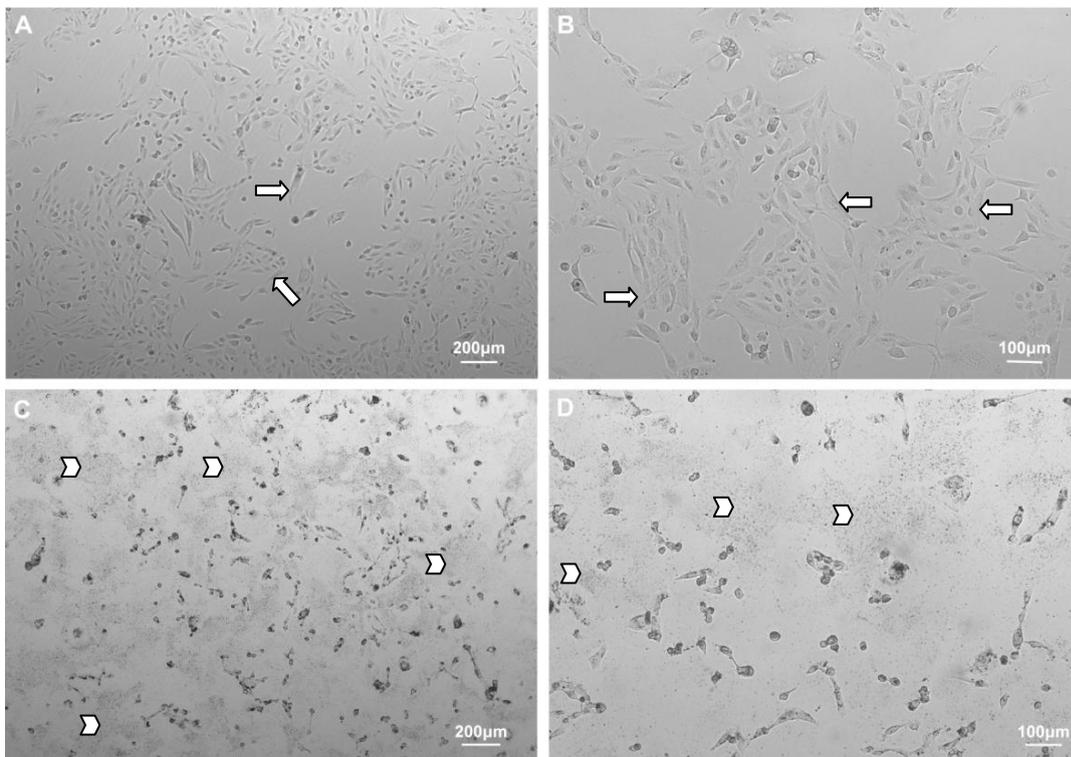


Figura 21. Microscopia de Luz da linhagem celular DU-145. As imagens A e B correspondem ao controle (sem tratamento) as setas evidenciam os prolongamentos celulares os quais quase não estão presentes em C e D. As imagens C e D correspondem ao tratamento com 400 μM de Magh-Rh₂(H₂cit)₄, as pontas das setas mostram nanopartículas no aumento de 5x em A e C e de 20x em B e D.

5.4.2 Análise Morfológica após o tratamento com Magh-Rh₂(H₂cit)₄ por Microscopia Eletrônica de Varredura

Em imagens da superfície celular, obtidas por microscopia eletrônica de varredura, foi possível observar a redução dos pontos de adesão focal das células tratadas com Magh-Rh₂(H₂cit)₄ em comparação com células controle, além disso, verificou-se que as células que foram tratadas com Magh-Rh₂(H₂cit)₄ apresentavam significativas alterações morfológicas da superfície de suas membranas plasmáticas com aspecto mais rugoso e também foi possível observar o acúmulo de aglomerados de nanopartículas (Figura 22).

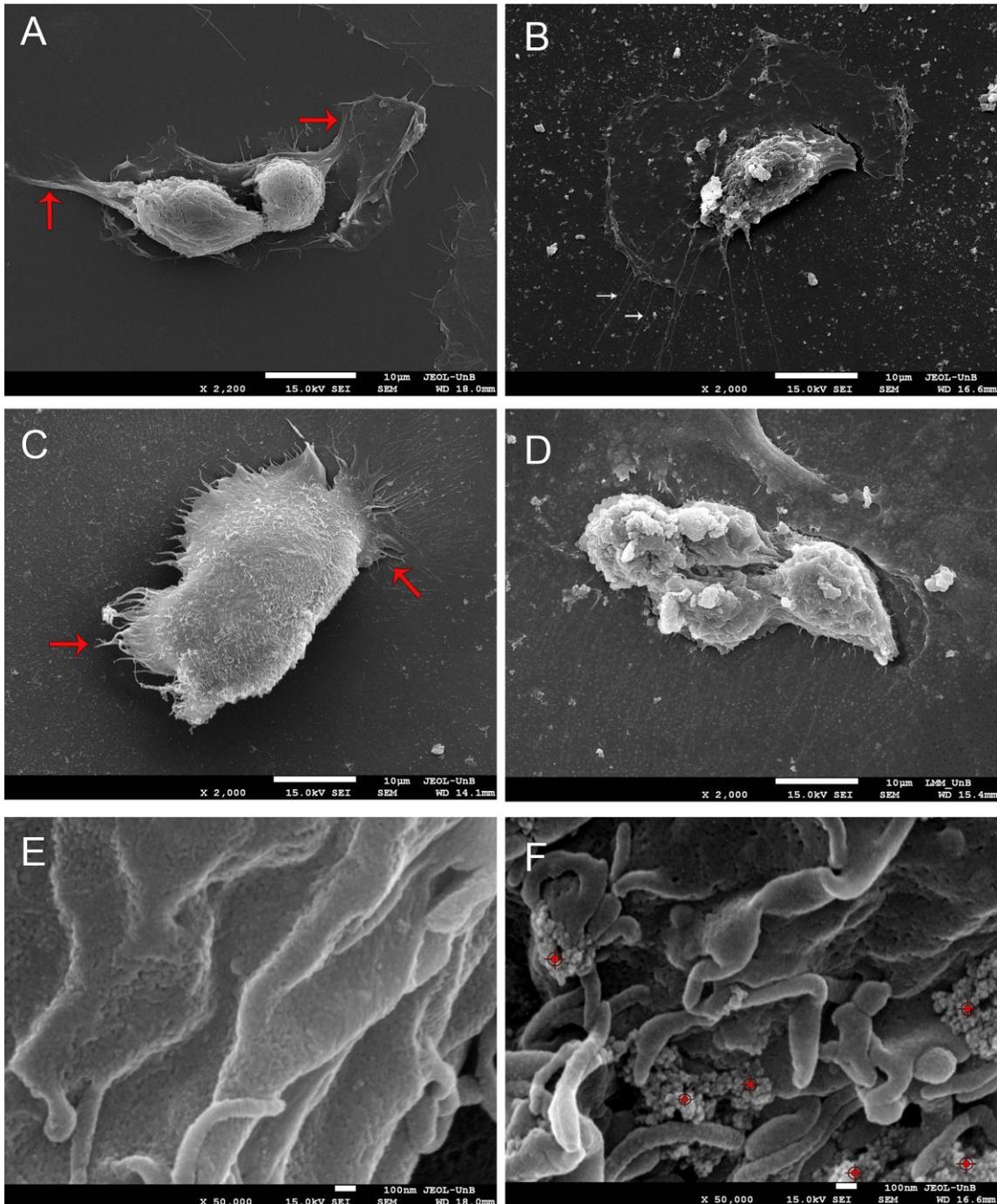


Figura 22. Avaliação morfológica por Microscopia Eletrônica de Varredura das linhagens celulares DU-145 e HNTMCs. Após 24 horas de tratamento com $\text{Magh-Rh}_2(\text{H}_2\text{cit})_4$ (B, D, E, e F) e controle sem tratamento (A e C). As imagens (A) e (C) apresentam os pontos de adesão das células (setas vermelhas) ao substrato bem preservado. As imagens (B) e (D) mostram uma significativa redução dos pontos de adesão sendo que na imagem (D) observamos alterações em que o tamanho da célula está menor do que na imagem (C), observamos também na imagem (F) um aumento na rugosidade da célula e o acúmulo de aglomerados de nanopartículas (pontos vermelhos) na superfície. (A), (B), (C) e (D) 2.000X; (E) e (F) 50.000X.

5.4.3 Análise ultraestrutural após tratamento com Magh-Rh₂(H₂cit)₄.

Os resultados obtidos por microscopia eletrônica de transmissão mostram que as linhagens celulares DU-145 (Figura 23) e HNTMCs (Figura 24) sem tratamento (Figuras 23A e 23C, Figuras 24A e 24C) não sofreram alterações aparentes, e suas estruturas internas do núcleo e citoplasma mantiveram integras. Na amostra tratada com Magh-Rh₂(H₂cit)₄ (Figuras 23B e 23D, Figuras 24B e 24D) foi possível observar nanopartículas no citoplasma das células confirmando a localização citoplasmática.

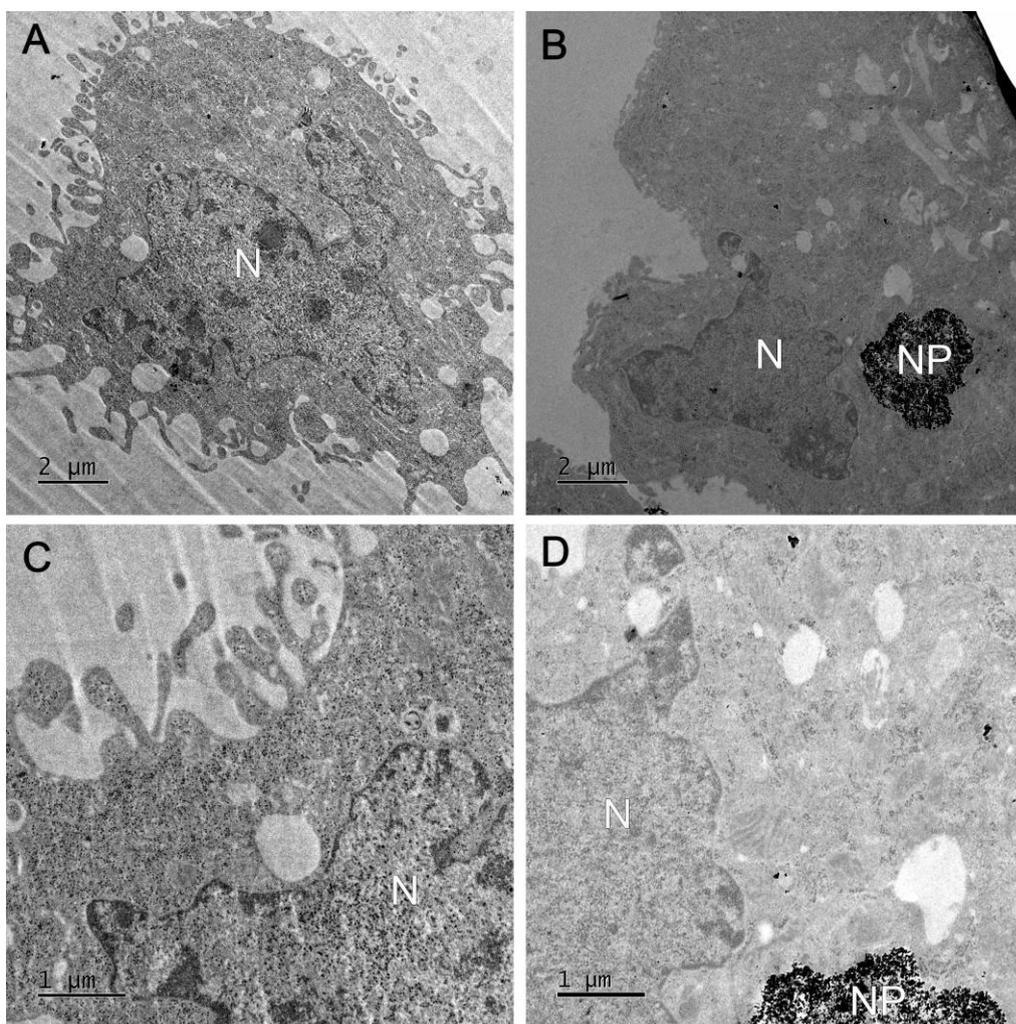


Figura 23. Células DU-145 por microscopia eletrônica de transmissão. Imagens (A) e (C) são controle sem tratamento, em (B) e (D) tratadas com 400 μM de Magh-Rh₂(H₂cit)₄. Onde (N) representa a região do núcleo e (NP) nanopartícula.

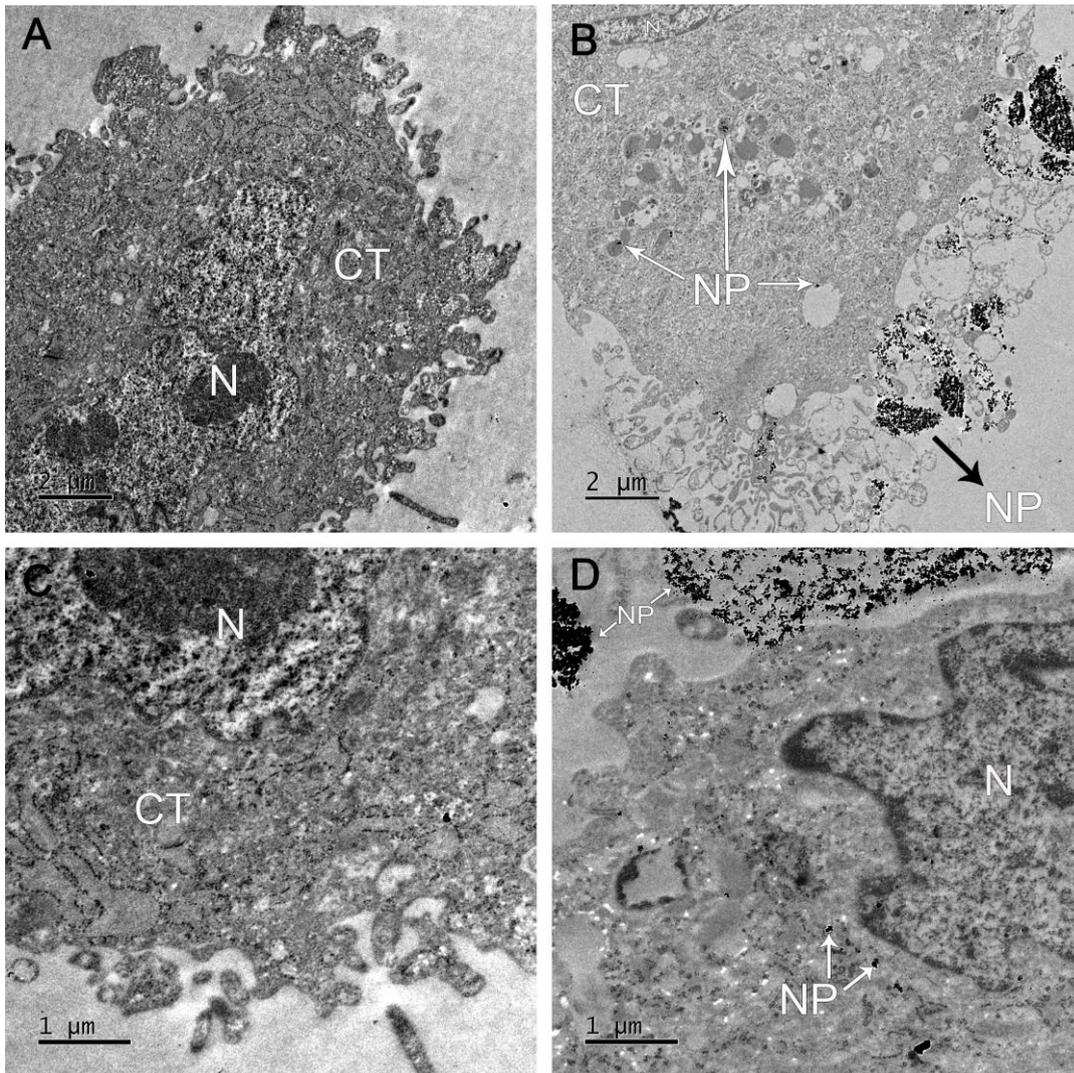


Figura 24. HNTMC por microscopia eletrônica de transmissão. Imagens (A) e (C) são controle sem tratamento, em (B) e (D) tratadas com 400 μM de Magh-Rh₂(H₂cit)₄. Onde (N) representa a região do núcleo, (CT) citoplasma e (NP) nanopartícula.

5.5 Análise de morte celular após os tratamentos por citometria de fluxo

Para avaliar o tipo de morte celular causada pelo tratamento com as nanopartículas em células tumorais DU-145, estas foram tratadas por 24 horas com a dose de 400 μ M.

Entre as amostras analisadas o $\text{Rh}_2(\text{H}_2\text{cit})_4$ e a $\text{Magh-Rh}_2(\text{H}_2\text{cit})_4$ foram as que mais induziram morte celular, sendo no primeiro caso ($\text{Rh}_2(\text{H}_2\text{cit})_4$) observado predominantemente morte por apoptose tardia e no segundo ($\text{Magh-Rh}_2(\text{H}_2\text{cit})_4$) apoptose inicial conforme pode ser observado na figura 25.

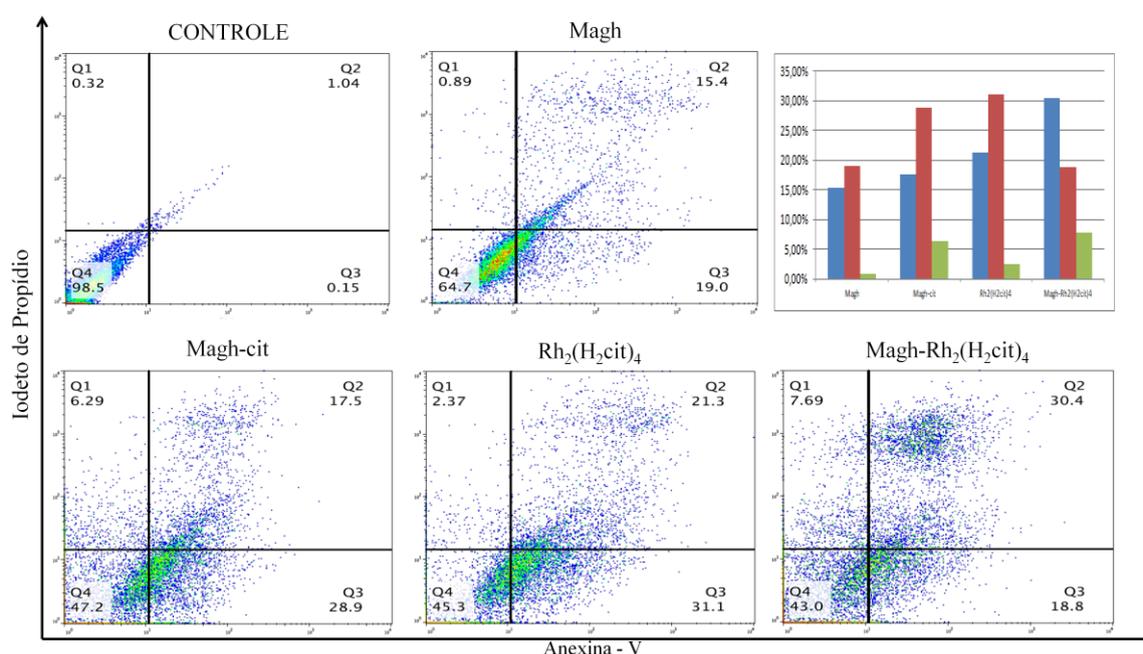


Figura 25. Tipo de morte celular por citometria de fluxo: Imagem de distribuição das populações celulares de acordo com o tipo de morte. Quadrante superior esquerdo (Q1) e nas barras verdes células necróticas, superior direito (Q2) e nas barras azuis células em apoptose tardia, inferior direito (Q3) e nas barras vermelhas às células em apoptose inicial e o inferior esquerdo corresponde às células viáveis (Q4).

6. DISCUSSÃO

6.1 Caracterização do fluido magnético

Para avaliação da estabilidade e caracterização da nanopartícula foi utilizada a técnica de DLS, que se baseia no movimento Browniano e espalhamento de luz, identificando alterações que uma partícula adquire em um determinado meio. Essas alterações são dependentes de fatores como: pH, força iônica e concentração de um determinado componente.

Os dados obtidos por meio destas duas técnicas após 1, 7, 15, 30, 60, 90 e 600 dias (Tabela 1), revelaram que a formulação é estável, pois não houve alterações consideráveis nos parâmetros avaliados ao longo do tempo, exceto por uma pequena variação no DH após 600 dias (de 120,94 nm para 154,4 nm). Já é conhecido na literatura que nanopartículas com diâmetro entre 100-150 nm são capazes de atravessar capilares fenestrados presentes na região tumoral e se acumular na área tumoral, em contrapartida possuem dificuldade em atravessar capilares normais e se difundir para órgãos como rins, pulmão e coração (DANAIEI, *et al.* 2018). Portanto, o diâmetro médio da nanopartícula apresentada, está dentro dos parâmetros de literatura para uma ação antitumoral.

No caso do PDI (Tabela 1), o valor médio foi de 0,210. Estudos já demonstraram que valores de PDI entre 0,1 e 0,7 representam uma preparação quase monodispersa, enquanto o $PDI > 0,7$ sugere ampla distribuição de tamanhos macromoleculares em solução (CAO *et al.*, 2015; STETEFELD *et al.*, 2016). O valor médio de pH foi de 7,25, este pH levemente alcalino se próxima ao pH fisiológico (EVORA & GARCIA, 2008). Os valores no presente trabalho foram próximos a valores encontrados em trabalhos anteriores realizados por nosso grupo (CHAVES *et al.*, 2017; ROCHA *et al.*, 2017; LAGO, 2018).

Dentre as várias possibilidades de análises e versatilidades do MEV encontra-se a captação e mensuração de diversos sinais oriundos de interações elétron-amostra. Estas interações podem revelar informações da natureza de uma amostra como a composição, topografia e morfologia (MESQUITA, 2020). A análise da superfície da Magh-Rh₂(H₂cit)₄ por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) (Figura 10) indicou

a formação de aglomerados, característica marcante de amostras magnéticas (MOHTASHAMI *et al.*, 2019). Observou-se também um aspecto esférico e tamanho aproximado de 15 nm. Ainda para verificar a composição química da nanopartícula foi realizada análise de EDS/EDX no MEV confirmando a presença dos elementos químicos como ferro, ródio, e oxigênio. Esses dados corroboram os encontrados anteriormente por nosso grupo de pesquisa (CARNEIRO, 2011; CHAVES, 2013)

Por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) obteve-se microcrografias das nanopartículas e seus aglomerados (Figura 13) e observou-se que o formato relativamente esférico é o mais comum, porém encontraram-se algumas partículas com formato cúbico e oval também. Essa variação no formato pode ter contribuído para um aumento no índice de polidispersão observado na caracterização da nanopartícula por DLS, essas características também foram encontradas em outros trabalhos (CARNEIRO *et al.*, 2011; PEIXOTO, 2012; CHAVES, 2013; PEIXOTO *et al.*, 2015; CHAVES *et al.*, 2015; LAGO; 2018). A partir dessas imagens, foi possível definir que a faixa de variação do tamanho está entre 5nm a 30nm com uma incidência maior do tamanho de 10 a 17 nm, dado que se repete em trabalhos anteriores do grupo.

O $\text{Rh}_2(\text{H}_2\text{cit})_4$ já é conhecido por apresentar emissão de fluorescência no comprimento de onda de 620 nm a 670 nm (ESPÓSITO, 2000). Para verificar se a conjugação do mesmo com a Magh altera essa característica, foi realizado o ensaio de emissão de fluorescência por espectrofluorimetria, o qual indicou que o $\text{Rh}_2(\text{H}_2\text{cit})_4$ possui fluorescência na faixa que vai de 620 nm a 670 nm, aproximadamente e que essa fluorescência se mantém mesmo após a conjugação com a Magh, porém no comprimento de onda de 570 nm a 600 nm, aproximadamente (Figura 15). O mesmo ensaio indicou que as nanopartículas de Magh e de Magh-Cit não apresentaram fluorescência.

Em microscopia de fluorescência foi identificado, pela primeira vez, a emissão de fluorescência da $\text{Magh-Rh}_2(\text{H}_2\text{cit})_4$ no espectro verde, dado obtido também para o $\text{Rh}_2(\text{H}_2\text{cit})_4$. Por outro lado não foi detectada fluorescência alguma nos outros compostos, corroborando com os dados anteriores e demonstrando que a conjugação do ródio com a nanopartícula de maghemita não altera a capacidade do ródio II de emitir fluorescência, apenas desloca a sua faixa de emissão.

6.2 Viabilidade Celular

A viabilidade celular neste estudo não pode ser realizada por técnicas geralmente utilizadas na literatura, como por exemplo, o ensaio de viabilidade por MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina), o qual consiste em um ensaio colorimétrico cuja absorvância reflete a viabilidade celular (KUMAR *et al.*, 2018), pois acredita-se que a formulação Magh-Rh₂(H₂cit)₄, de coloração férrica (marrom), interage com o meio reacional, já que os resultados obtidos por esse método não eram condizentes com o que se observava ao microscópio óptico. Desta forma, o resultado do teste não seria confiável, interferindo na quantificação de células viáveis. Outra maneira de avaliar a viabilidade seria através de técnicas que emitem fluorescência de acordo com a porcentagem de células viáveis, como por exemplo os reagentes AlamarBlue™ e PrestoBlue™. Esta característica é limitante para a análise da viabilidade celular das células tratadas com Magh-Rh₂(H₂cit)₄, pois, como demonstrado na caracterização dos fluidos magnéticos, este composto emite fluorescência no mesmo comprimento de onda dos reagentes citados, impossibilitando assim a análise de viabilidade celular por emissão de fluorescência (GAUCHER & JARRAYA, 2015; KUMAR *et al.*, 2018).

Os ensaios de citotoxicidade foram avaliados então pela técnica de exclusão por azul de tripan. Esta técnica é utilizada para avaliar a integridade da membrana plasmática, onde somente as células que possuem alguma alteração na membrana, seja por necrose ou apoptose, são coradas pelo azul de tripan, diferentemente de células viáveis que são seletivas a entrada de corantes (STROBER, 2015).

Não houve significância estatística entre os tempos de tratamento de 24h e 48h (Figuras 18 e 19) concluindo que a nanopartícula não é tempo dependente. Porém ao comparar as diferentes concentrações em um mesmo tempo de tratamento, a nanopartícula se mostrou dose dependente, quanto maior a concentração da nanopartícula utilizada no tratamento menor foi a viabilidade celular, como já demonstrado em outras linhagens tumorais, como MCF-7 e MDA-MB-231 (CHAVES *et al.* 2017).

Sato e colaboradores (2013), em estudo de citotoxicidade com nanopartículas de

óxido de ferro não funcionalizadas em linhagens DU-145 e PC-3 de câncer de próstata descreveram que o tratamento aumentava a produção de espécies reativas de oxigênio e de 8-OH-Dg. Neste mesmo sentido, Chaves et al, (2017), também verificaram que células de mama MCF-7 e MDA-MB 231 tratadas com Magh-Rh₂(H₂cit)₄, tinham maior produção de espécies reativas de oxigênio. Mecanismo proposto para a toxicidade da formulação.

Apesar do IC⁵⁰ (400µM) ter sido menor pra linhagem controle que para linhagem tumoral, o ensaio de viabilidade não demonstrou uma especificidade da formulação para linhagens tumorais, porém o uso de campo magnético externo para direcionamento das nanopartículas pode reduzir esse efeito *in vivo* (AMANDA, 2018)

As análises morfológicas por microscopia de luz da linhagem células DU-145 demonstraram que após o tratamento com a nanopartícula Magh-Rh₂(H₂cit)₄ as células apresentaram diferenças morfológicas significativas, como a diminuição dos pontos de adesão (Figura 22D), alteração na capacidade de formação de colônias (Figura 20) e visível redução do tamanho da célula (Figura 22D), até o presente momento, este é o primeiro trabalho a explorar tais alterações utilizando a linhagem DU-145, não sendo possível afirmar se as mudanças podem generalizar-se, refletindo as mesmas características em outras linhagens celulares como a PC-3 e LnCaP.

Em imagens de superfície celulares obtidas por microscopia eletrônica de varredura (Figura 22F), além da redução do tamanho das células e redução dos pontos de adesão focal, já observados anteriormente em microscopia óptica - foi possível observar alterações morfológicas na superfície celular de células tratadas com Magh-Rh₂(H₂cit)₄ em comparação ao grupo de células controle. O grupo tratado apresentou aspecto mais rugoso e um acúmulo de aglomerados de nanopartículas na superfície celular.

O ensaio clonogênico ou o ensaio de formação de colônias é um ensaio de sobrevivência celular *in vitro* com base na capacidade de uma única célula se transformar em colônia (capacidade das células de produzir descendentes). O teste clonogênico pode ser utilizado para determinar a eficácia de agentes citotóxicos. A capacidade de proliferação contínua celular nos tecidos é um pré-requisito para manter a integridade e função dos tecidos normais, enquanto que nos tumores a erradicação deste

fenótipo é necessária para reduzir a capacidade de proliferação ilimitada destas células, prevenindo recorrências (FLAKEN *et al.*, 2006; RAFEHI, *et al.* 2011). O resultado mostrou que o tratamento reduziu drasticamente a capacidade clonogênica da linhagem celular DU-145 após o tratamento com Magh-Rh₂(H₂cit)₄, indicando diminuição do fenótipo tumoral (clonogenia).

A avaliação de internalização das nanopartículas por MET (Figuras 23 e 24) indicou a presença de grandes aglomerações de nanopartículas no interior de vesículas no citoplasma da célula e também na superfície celular em linhagem DU-145, após 3h de exposição. Enquanto que em linhagem não tumoral (HNTMC) poucas nanopartículas foram internalizadas, ficando a maioria no meio extracelular. Também se observou uma diminuição significativa nos prolongamentos celulares, principalmente na linhagem DU-145 (Figura 24). Dados estes, similares aos encontrados por Chaves et al, (2017) em estudo comparativo de internalização do mesmo composto entre linhagens tumorais (MCF-7 e MDA-MB 231) e HNTMC (fibroblastos de polpa dentária), exceto que, no estudo citado nanopartículas também foram visualizadas no núcleo celular das linhagens tumorais, após 6h de exposição.

Análise por citometria de fluxo indicou predominância de morte celular nos grupos tratados com Magh-Rh₂(H₂cit)₄ e Rh₂(H₂cit)₄. Sendo que, no primeiro grupo prevaleceu a morte por apoptose tardia enquanto que no segundo prevaleceu apoptose inicial, indicando que a nanopartícula completa acelera o processo de morte celular por apoptose (Figura 25). O grupo tratado com Magh-Rh₂(H₂cit)₄ apresentou 52,4% de morte, esse resultado foi condizente com o teste de viabilidade celular por exclusão de azul de tripan na dosagem de 400 µM pois 45,3% do total permaneceram viáveis. Dados similares foram encontrados por Sato et al. (2013) em estudo comparando a via de morte celular de linhagem DU-145 entre grupo tratado com nanopartículas de óxido ferro e nanopartículas de óxido de ferro funcionalizadas com DTX.

7. CONCLUSÕES

Em função dos resultados obtidos pode-se concluir que:

- A nova opção de rota de síntese escolhida produziu uma formulação estável e foi possível observar emissão de fluorescência na faixa do verde, e com comprimento de onda na faixa de 570 nm aproximadamente, característica que pode ser explorada para outras finalidades, como diagnóstico por imagem e marcação celular.
- A citotoxicidade da Magh-Rh₂(H₂cit)₄ foi menor em células não tumorais que em células tumorais, de forma dose dependente,
- O tipo de morte celular predominante foi por apoptose tardia.
- A nanopartícula diminuiu a capacidade de formação de colônia da linhagem DU-145.
- A nanopartícula foi internalizada por ambas linhagens celulares utilizadas.

8. PESPECTIVAS

As perspectivas propostas para a continuidade desse trabalho são:

- Fazer avaliação *in vivo* da toxicidade sistêmica da Magh-Rh₂(H₂cit)₄ e da capacidade antitumoral para o tratamento do câncer de próstata.
- Fazer uma avaliação *in vivo* da Magh-Rh₂(H₂cit)₄ como agente contrastante para adenocarcinoma de próstata.
- Realizar triagem *in vitro* da capacidade antitumoral de Magh-Rh₂(H₂cit)₄ para outras linhagens tumorais.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AAPRO, M. The scientific rationale for developing taxoids. **Anti-cancer drugs**, v. 7, p. 33-36, 1996.
2. ALLOTT, E H e MASKO, E M e FREEDLAND, S J. Obesity and prostate cancer: weighing the evidence. **European urology**, v. 63, n. 5, p. 800–9, May 2013.
3. AMANDA, A.C. **Administração de células mesenquimais em um modelo murino de glioblastoma multiforme: comparação entre as vias intranasal e endovenosa**. Dissertação (mestrado)—Fundação Universidade de Brasília, Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, 2018.
4. AMERICAN CANCER SOCIETY. Guidelines for the early detection of cancer: Update of early detection guidelines for prostate, colorectal, and endometrial cancers. **Cancer Journal for Clinicians**, v.51, p.38-75, 2020.
5. ANSBAUGH , N.; SHANNON, J.; MORI, M.; FARRIS, P. E. *et al.* Agent Orange as a risk factor for high-grade prostate cancer. **Cancer**, 119, n. 13, p. 2399-2404, 2013.
6. ASHRAF, N.; *et al.* Iron/iron oxide nanoparticles: advances in microbial fabrication, mechanism study, biomedical, and environmental applications. **Critical Reviews in Microbiology**. 2019.
7. BARONI, R. H.; NOVIS, M. I.; CAIADO, Â. H. M.; CERRI, L. M. D. O. *et al.* Ressonância magnética da próstata: uma visão geral para o radiologista. **Radiologia Brasileira**, 42, p. 185-192, 2009.
8. BERTHOLD, D. R. *et al.* Docetaxel plus prednisone or mitoxantrone plus prednisone for advanced prostate cancer: updated survival in the TAX 327 study. **Journal of Clinical Oncology**, v. 26, n. 2, p. 242-245, 2007.
9. BHARALI, D. J. *et al.* Anti-CD24 nano-targeted delivery of docetaxel for the treatment of prostate cancer. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 13, n. 1, p. 263-273, 2017.
10. BOOKSTEIN, R.; MACGROGAN, D.; HILSENBECK, S. G.; SHARKEY, F. *et al.* p53 is mutated in a subset of advanced-stage prostate cancers. **Cancer**

- Research**, 53, n. 14, p. 3369-3373, 1993.
11. BRAGA, S. F. M.; SOUZA, M. C. D.; OLIVEIRA, R. R. D.; ANDRADE, E. I. G. *et al.* Patient survival and risk of death after prostate cancer treatment in the Brazilian Unified Health System. **Revista de Saúde Pública**, 51, 2017.
 12. BRASIL. Lei n 10.289, de 20 de setembro de 2001. Institui o Programa Nacional de Controle do Câncer de Próstata. **Presidência da República Casa Civil**, Diário Oficial da União.
 13. BRAY, F. e KIEMENEY L. A. Epidemiology of Prostate Cancer in Europe: Patterns, Trends and Determinants. **Management of Prostate Cancer**. 2017.
 14. BRAY, F.; FERLAY, J.; SOERJOMATARAM, I.; SIEGEL, R. L. *et al.* Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **Cancer Journal for Clinicians**, 68, n. 6, p. 394-424, 2018.
 15. BROOKMAN-MAY, S. D.; CAMPI, R.; HENRIQUEZ, J. D. S.; KLATTE, T. *et al.* Latest Evidence on the Impact of Smoking, Sports, and Sexual Activity as Modifiable Lifestyle Risk Factors for Prostate Cancer Incidence, Recurrence, and Progression: A Systematic Review of the Literature by the European Association of Urology Section of Oncological Urology (ESOU). **European Urology Focus**, 5, n. 5, p. 756-787, 2019.
 16. CAIRNS, P.; OKAMI, K.; HALACHMI, S.; HALACHMI, N. *et al.* Frequent inactivation of PTEN/MMAC1 in primary prostate cancer. **Cancer Research**, 57, n. 22, p. 4997-5000, 1997.
 17. CAIRNS, R.A.; MAK, T.W. The current state of cancer metabolism. **Nature Reviews Cancer**, v. 16, n. 10, p. 613-614, 2016.
 18. CAMARGO, A.C. <<https://accamargo.org.br/tipos-de-cancer/prostata>> CAMARGO, 2014. Acesso em: Dez/2019.
 19. CAO M, WANG P, KOU Y, *et al.* Gadolinium (III)-chelated silica nano- spheres integrating chemotherapy and photothermal therapy for cancer treatment and magnetic resonance imaging. **ACS Appl Mater Interfaces**. n. 7 v. 45.2015.
 20. CARNEIRO, M. L. B., LOPES, C. A. P., MIRANDA-VILELA, A. L., JOANITINI, G. A., DA SILVA, I. C., MORTARI, M. R., SOUZA, A. R., BÁO,

- S. N. Acute and subchronic toxicity of the antitumor agent rhodium (II) citrate in Balb/c mice after intraperitoneal administration. **Toxicology Reports**, v. 2, p. 1086-1100, 2015.
21. CARNEIRO, M. L. B.; NUNES, E. S.; PEIXOTO, R. C.; OLIVEIRA, R. G.; LOURENÇO, L. H.; DA SILVA, I. C.; SIMIONI, A. R.; TEDESCO, A. C.; DE SOUZA, A. R.; LACAVA, Z. G.; BÁO, S. N. Free Rhodium (II) citrate and rhodium (II) citrate magnetic carriers as potential strategies for breast cancer therapy. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 9, p.11-27, 2011.
22. CARNEIRO, M.L.B. **Efeitos Biológicos de citrato de ródio II livre e de sua associação a nanopartículas magnéticas e a magnetolipossomas em células de carcinoma mamário: estudos in vitro e in vivo.** Tese de doutorado em Biologia Molecular. Universidade de Brasília. Brasília. 2011.
23. CARNEIRO, MARCELLA L. B. *et al.* Antitumor effect and toxicity of free rhodium (II) citrate and rhodium (II) citrate-loaded maghemite nanoparticles in mice bearing breast cancer. **Journal of nanobiotechnology**, v. 11, n. 1, p. 4, 2013.
24. CASTRO, H. A. S. *et al.* Contribuição da densidade do PSA para predizer o câncer da próstata em pacientes com valores de PSA entre 2,6 e 10,0 ng/ml. **revista Radiologia Brasileira.**, v.44, n.4, p. 205–209, 2011.
25. CHAVES, N. L. **Estudo de morte celular em células MCF-7 tratadas com citrato de ródio associado a nanopartículas de maghemita.** 2013. 66 f., il. Dissertação (Mestrado em Biologia Animal) - Universidade de Brasília, Brasília, 2013.
26. CHAVES, NATALIA L. *et al.* Exploring cellular uptake of iron oxide nanoparticles associated with rhodium citrate in breast cancer cells. **International journal of nanomedicine**, v. 12, p. 5511, 2017.
27. CHAVES, NATALIA L. *et al.* Rhodium Citrate Associated with Maghemite Nanoparticles Causes DNA Fragmentation Independently of Caspases 3 and Mediated by Reactive Oxygen Species. **Journal of Nanomedicine & Nanotechnology**, v. 6, n. 5, p. 1, 2015.
28. CHORNOKUR, G.; DALTON, K.; BORYSOVA, M. E.; KUMAR, N. B.

- Disparities at presentation, diagnosis, treatment, and survival in African American men, affected by prostate cancer. **Prostate**, 71, n. 9, p. 985-997, 2011.
29. CROPP, C. D.; SIMPSON, C. L.; WAHLFORS, T.; HA, N. *et al.* Genome-wide linkage scan for prostate cancer susceptibility in Finland: evidence for a novel locus on 2q37.3 and confirmation of signal on 17q21-q22. **International Journal of Cancer**, 129, n. 10, p. 2400-2407, 2011.
30. DANAEI, M.; *et al.* Impact of Particle Size and Polydispersity Index on the Clinical Applications of Lipidic Nanocarrier Systems. **Pharmaceutics**. V, 10, p. 57. 2018.
31. DARAEI, H.; EATEMADI, A.; ABBASI, E.; *et al.* Application of gold nanoparticles in biomedical and drug delivery. **Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology**, v. 44, n. 1, p. 410-422, 2016.
32. DE CARVALHO, H F e VILAMAIOR, P S e TABOGA, S R. Elastic system of the rat ventral prostate and its modifications following orchiectomy. **The Prostate**, v. 32, n. 1, p. 27-34, 15, 1997.
33. DONG, J. T.; LI, C. L.; SIPE, T. W.; FRIERSON, H. F., JR. Mutations of PTEN/MMAC1 in primary prostate cancers from Chinese patients. **Clinical Cancer Research**, 7, n. 2, p. 304-308, 2001.
34. ESPOSITO, B. P.; Interações de complexos de ródio (II) com albumina humana. Tese de doutorado, área química orgânica. Universidade de São Paulo- Instituto de Química. 2000.
35. EVORA & GARCIA, Equilíbrio Ácido-Base. **Fundamentos Em Clínica Cirúrgica**. Cap. VI n. 41 v. 3, p. 301-11. 2008.
36. FARIA, E. F.; CARVALHAL, G. F.; VIEIRA, R. A.; SILVA, T. B. *et al.* Program for prostate cancer screening using a mobile unit: results from Brazil. **Urology**, 76, n. 5, p. 1052-1057, 2010.
37. FERRIS, I. T. J.; BERBEL-TORNERO, O.; GARCIA, I. C. J.; LOPEZ-ANDREU, J. A. *et al.* [Non dietetic environmental risk factors in prostate cancer]. **Actas Urológicas Españolas**, 35, n. 5, p. 289-295, 2011.
38. FRANKEN1, N.A.P; RODERMOND1, H.M; STAP, J.; *et al.*, Clonogenic assay of cells in vitro. **Nature Protocols**. v.1 n.5 p. 2315. 2006.

39. FRANKLIN, M. *et al.* – Doença metastática, resistente à castração. Recomendações Clínicas no Tratamento do Carcinoma da Próstata. 1.^a Ed., F. Calais da Silva – **Grupo Português Genito Urinário**, 187-206. 2013.
40. GAUCHER, S., & JARRAYA, M. Technical note: comparison of the PrestoBlue and LDH release assays with the MTT assay for skin viability assessment. *Cell and Tissue Banking*, 16(3), 325–329. 2015
41. GLEASON F DONALD, Histologic Grading of Prostate Cancer: A Perspective. **HUMAN PATHOLOGY** v. 23, n. 3.1992.
42. GUIVAR, J. A. R *et al.* Magnetic, structural and surface properties of functionalized maghemite nanoparticles for copper and lead adsorption. **Royal Society of Chemistry**, v. 7, n. 46, p. 28763-28779, 2017.
43. HAAGA, J. R.; BOLL, D. Computed Tomography & Magnetic Resonance Imaging Of The Whole Body E-Book. **Elsevier Health Sciences**, 2008.
44. HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The Hallmarks of Cancer. *Cell*, v. 100, n. 3, p.57–70, 2000.
45. HEIDEGGER, I.; TSAUR, I.; BORGMANN, H.; SURCEL, C. *et al.* Hereditary prostate cancer - Primetime for genetic testing? **Cancer Treat Rev**, 81, p. 101927, 2019.
46. INCA. **Câncer de próstata**. Brasil, 04/10/2019 2019. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-de-prostata>. Acesso em: 23/01/2020.
47. INCA. Estimativa 2018: incidência de câncer no Brasil. **Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva**. Coordenação de Prevenção e Vigilância., p. 128, 2017.
48. INCA. Rastreamento de Câncer de Próstata. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files//media/document//rastreamento-prostata-2013.pdf>. Acesso em: 23/01/2020.
49. ISAACS, J. T. The biology of hormone refractory prostate cancer: why does it develop. **Urologic Clinics of North America**, v. 26, n. 2, p. 263-273, 1999.
50. JAHANGIRIAN, H.; LEMRASKI, E.G.; WEBSTER, T.J.; *et al.* A review of drug delivery systems based on nanotechnology and green chemistry: green

- nanomedicine. **International journal of nanomedicine**. v. 12, p. 2957-2978, 2017.
51. JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica: Texto e atlas**. 12. ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan Ltda, 2013.
52. KASIVISVANATHAN *et al.* MRI-Targeted or Standard Biopsy for Prostate-Cancer Diagnosis. **New England Journal of Medicine**. v.378 n. 19 1767-1777. 2018.
53. KINSELLA, N.; HELLEMAN, J.; BRUINSMA, S.; CARLSSON, S. *et al.* Active surveillance for prostate cancer: a systematic review of contemporary worldwide practices. **Translational Andrology and Urology**, 7, n. 1, p. 83-97, 2018.
54. KUMAR, P., NAGARAJAN, A., & UCHIL, P. D. Analysis of cell viability by the alamarblue assay. **Cold Spring Harbor Protocols**. v, 6, p. 462–464. 2018.
55. LABRIE e FERNAND *et al.* Antifertility effects of LHRH agonists in the male. **Journal of Andrology**, v. 1, n. 5, p. 209-228, 1980.
56. LABRIE, F. Blockade of testicular and adrenal androgens in prostate cancer treatment. **Nature Reviews Urology**, v. 8, n. 2, p. 73-85, 2011.
57. LAGO, W. F. **Caracterização da coroa proteica em nanopartículas de Magh-Rh₂(H₂cit)₄ e sua interação com macrófagos humanos**. 2018. 84 f., il. Dissertação (Mestrado em Nanociência e Nanobiotecnologia)—Universidade de Brasília, Brasília, 2018.
58. LEE, C H e AKIN-OLUGBADE, O e KIRSCHENBAUM, A. Overview of prostate anatomy, histology, and pathology. **Endocrinology and metabolism clinics of North America**, v. 40, n. 3, p. 565– 75, viii–ix, 2011.
59. LI, D.; KUMARASWAMY, E.; HARLAN-WILLIAMS, L. M.; JENSEN, R. A. The role of BRCA1 and BRCA2 in prostate cancer. **Frontiers in Bioscience**. (Landmark Ed), 18, p. 1445-1459, 2013.
60. LI, J.; DJENABA, J. A.; SOMAN, A.; RIM, S. H. *et al.* Recent trends in prostate cancer incidence by age, cancer stage, and grade, the United States, 2001-2007. **Prostate Cancer**, 2012, p. 691380, 2012a.
61. LI, J.; GERMAN, R.; KING, J.; JOSEPH, D. *et al.* Recent trends in prostate

- cancer testing and incidence among men under age of 50. **Cancer Epidemiol**, 36, n. 2, p. 122-127, 2012b.
62. LIMA, L. R.; DA SILVA, CAMPOS, I. L.; ALVES, D. C. **Investigação e prevalência dos fatores de risco para elevação e desenvolvimento de câncer de próstata e elevação do PSA: uma revisão de literatura**. Editor Gerente, p. 13, 2017.
63. MAITLAND, N. J. e COLLINS, A. T. Prostate cancer stem cells: a new target for therapy. **Journal of clinical oncology**, v. 26, n. 17, p. 2862-2870, 2008.
64. MESQUITA, P.G; ALMEIDA, H.S; CARDOSO, D.N.P. *et al.* Evaluation of morphological characteristics of treated chorume sludge via geobag through MEV and EDS techniques. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 1, p. 3351-3358, jan. 2020.
65. MOHTASHAMI, L.; *et al.* Galbanic Acid-Coated Fe₃O₄ Magnetic Nanoparticles with Enhanced Cytotoxicity to Prostate Cancer Cells. **Thieme Medical Publishers**. v, 85 p. 169–178, 2019.
66. MONTERO, A. *et al.* Docetaxel for treatment of solid tumours: a systematic review of clinical data. **The lancet oncology**, v. 6, n. 4, p. 229-239, 2005.
67. MORI, R. R.; FARIA, E. F.; MAUAD, E. C.; RODRIGUES JR., A. A. *et al.* Prostate cancer screening among elderly men in Brazil: should we diagnose or not? **International Brazilian Journal of Urology**, 46, p. 34-41, 2020.
68. MORI, R. R.; FARIA, E. F.; MAUAD, E. C.; RODRIGUES, A. A., JR. *et al.* Prostate cancer screening among elderly men in Brazil: should we diagnose or not? **International Brazilian Journal of Urology**, 46, n. 1, p. 34-41, 2020.
69. MOTTET, *et al.* EAU-ESTRO-SIOG guidelines on prostate cancer. Part 1: screening, diagnosis, and local treatment with curative intent. **European Urology**, v. 71, n. 4, p. 618-629, 2017.
70. MULLER, R. L.; FARIA, E. F.; CARVALHAL, G. F.; REIS, R. B. *et al.* Association between family history of prostate cancer and positive biopsies in a Brazilian screening program. **World Journal of Urology**, 31, n. 5, p. 1273-1278, 2013.
71. MUSUMECI, Teresa *et al.* PLA/PLGA nanoparticles for sustained release of

- docetaxel. **International journal of pharmaceutics**, v. 325, n. 1, p. 172-179, 2006.
72. NIE, S.; XING, Y.; KIM, G. J.; SIMONS, J. W. Nanotechnology applications in cancer. **Annual Review of Biomedical Engineering**, v. 9, p. 257–288, 2007.
73. NIH-National Cancer Institute. <<https://training.seer.cancer.gov/prostate/abstract-code-stage/morphology.html>> Acessado em 25/02/2019.
74. NUNES, E. S, CARNEIRO, M. L. B., de OLIVEIRA, R. G. S., BÁO, S. N., & DE SOUZA, A. R. Colloidal stability, surface characterisation and intracellular accumulation of Rhodium (II) citrate coated superparamagnetic iron oxide nanoparticles in breast tumour: a promising platform for cancer therapy. **Journal of nanoparticle research**, v. 15, n. 6, p. 1-15, 2010.
75. NYAME, Y. A.; GORE, J. L. What Goes Up Must Come Down: Identifying Truth from Global Prostate Cancer Epidemiology. **European Urology**, 77, n. 1, p. 53-54, 2020.
76. NYBERG, T.; FROST, D.; BARROWDALE, D.; EVANS, D. G. *et al.* Prostate Cancer Risks for Male BRCA1 and BRCA2 Mutation Carriers: A Prospective Cohort Study. **European Urology**, 77, n. 1, p. 24-35, 2020.
77. OLDRIDGE, E. E. *et al.* Prostate cancer stem cells: are they androgen-responsive? **Molecular and cellular endocrinology**, v. 360, n. 1–2, p. 14–24, 2012.
78. OLIVEIRA, A. G. *et al.* – Tratamento do cancro da próstata no idoso. Recomendações Clínicas no Tratamento do Carcinoma da Próstata. 1.^a Ed., F. Calais da Silva – **Grupo Português Genito Urinário**, p. 177-187. 2013.
79. Organização mundial da saúde – OMS. Disponível em: <<https://www.who.int/about/es/>>. Acesso em: 14 janeiro 2019.
80. PEIXOTO, A. *et al.* Antitumor effect of free rhodium (II) citrate and rhodium (II) citrate-loaded maghemite nanoparticles on mice bearing breast cancer: a systemic toxicity assay. **Tumor Biology**, v. 36, n. 5, p. 3325-3336, 2015.
81. PEIXOTO, R. C. A. **Avaliação toxicologica e antitumoral do tratamento sistêmico com citrato de ródio (II) livre e associado a nanopartículas de maghemita em modelo experimental de câncer de mama**. 106f. Dissertação de

- mestrado – Universidade de Brasília. 2012.
82. QUINN, D. I.; STRICKER, P. D.; KENCH, J. G.; GROGAN, J. *et al.* p53 nuclear accumulation as an early indicator of lethal prostate cancer. **British Journal of Cancer**, 121, n. 7, p. 578-583, 2019.
83. RAFEHI, H., ORLOWSKI, C., GEORGIADIS, G. T., VERVERIS, K., EL-OSTA, A., KARAGIANNIS, T. C. Clonogenic Assay: Adherent Cells. **Journal of Visualized Experiments** v. 49, p. 2573, 2011.
84. RAPISARDA, V.; MIOZZI, E.; LORETO, C.; MATERA, S. *et al.* Cadmium exposure and prostate cancer: insights, mechanisms and perspectives. **Frontiers in Bioscience**. (Landmark Ed), 23, p. 1687-1700, 2018.
85. RICHARDS, D.A; MURUANI, A; CHUDASAMA, V. Antibody fragments as nanoparticle targeting ligands: a step in the right direction. **The Royal Society of Chemistry**. 2016.
86. ROBBINS e COTRAN, bases patológicas das doenças Vinay Kumar... [*et al.*]; [tradução de Patrícia Dias Fernandes... *et al.*]. - Rio de Janeiro : **Elsevier**, 2010.
87. ROCHA, M, *et al.* Modulation of fibronectin and laminin expression by Rhodium (II) citrate-coated maghemite nanoparticles in mice bearing breast tumor. **Scientific Reports** ; 7: 17904. 2017
88. RODRIGUES, G. **Eletroquimioterapia para tratamento de cancer – desenvolvimento e avaliação em estudo de caso com camundongos portadores de melanoma B16F10**. 2014. Tese (Doutorado em Biotecnologia) Universidade de São Paulo, 2014.
89. SACRAMENTO, R. S.; SIMIÃO, L. D. J.; VIANA, K. C. G.; ANDRADE, M. A. C. *et al.* Associação de variáveis sociodemográficas e clínicas com os tempos para início do tratamento do câncer de próstata. **Ciência & Saúde Coletiva**, 24, n. 9, p. 4, 2019.
90. SAFARI, J e ZARNEGAR, Z. Advanced drug delivery systems: nanotechnology of health design. **Journal of Saudi Chemical. Soc.** v. 18, p. 85-99, 2014.
91. SATO, A; ITCHO, N; ISHIGURU, H; *et al.*, Magnetic nanoparticles of Fe₃O₄ enhance docetaxel-induced prostate cancer cell death. **International Journal of Nanomedicine**. v. 8 p. 3151–3160. 2013.

92. SHEN, Michael M.; ABATE-SHEN, Cory. Molecular genetics of prostate cancer: new prospects for old challenges. **Genes & development**, v. 24, n. 18, p. 1967-2000, 2010.
93. SILVA, I. N. D. C. J. A. G. D. Câncer de próstata: vamos falar sobre isso? **Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva**, p. 12, 2019.
94. STANFORD, J. L.; FITZGERALD, L. M.; MCDONNELL, S. K.; CARLSON, E. E. *et al.* Dense genome-wide SNP linkage scan in 301 hereditary prostate cancer families identifies multiple regions with suggestive evidence for linkage. **Hum Mol Genet**, 18, n. 10, p. 1839-1848, 2009
95. STETEFELD, O.; MCKENNA, S.; PATE, T.R. Dynamic light scattering: a practical guide and applications in biomedical sciences. **Biophysical Reviews**. V. 8, n. 4, p. 409–427. 2016.
96. STOCKLER, M.; JUNKER. K.; FORNARA. P. Low-risk prostate cancer prior to or after kidney transplantation. **European Urology Focus**, v, 4, p. 148-152, 2018.
97. STOKES, W. A.; HENDRIX, L. H.; ROYCE, T. J.; ALLEN, I. M. *et al.* Racial differences in time from prostate cancer diagnosis to treatment initiation: a population-based study. **Cancer**, 119, n. 13, p. 2486-2493, 2013.
98. STROBER, W. Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability. *Current Protocols in Immunology*, 111(1), A3.B.1-A3.B.3. 2015.
99. SUN, Yin; NIU, Junyang; HUANG, Jiaoti. Diferenciação neuroendócrina no câncer de próstata. **Jornal americano de pesquisa de tradução**, v. 1, n. 2, p. 148, 2009.
100. TAMMELA, TLJ. Endocrine prevention and treatment of prostate cancer. **Molecular and cellular endocrinology**, v. 360, n. 1, p. 59-67, 2012.
101. TANNOCK, Ian F. *et al.* Docetaxel plus prednisone or mitoxantrone plus prednisone for advanced prostate cancer. **New England Journal of Medicine**, v. 351, n. 15, p. 1502-1512, 2004.
102. TIMKO, Brian P. *et al.* Near-infrared-actuated devices for remotely controlled drug delivery. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, n. 4, p. 1349- 1354, 2014.
103. TIMMS, Barry G. Prostate development: a historical

- perspective. **Differentiation**, v. 76, n. 6, p. 565-577, 2008.
104. TOMKELSKI, M. L.; Scremin, G.; Fagan, S. B. Ensino de Nanociência e Nanotecnologia: perspectivas manifestadas por professores da educação básica e superior. **Ciência e Educação.**, Bauru, v. 25, n. 3, p. 665-683, 2019.
105. VAIDYANATHAN, V.; NAIDU, V.; KAO, C. H.; KARUNASINGHE, N. *et al.* Environmental factors and risk of aggressive prostate cancer among a population of New Zealand men - a genotypic approach. **Molecular BioSystems**, 13, n. 4, p. 681-698, 2017.
106. VILAMAIOR, P S *et al.* Collagen fiber reorganization in the rat ventral prostate following androgen deprivation: a possible role for smooth muscle cells. **The Prostate**, v. 45, n. 3, p. 253–8, 2000.
107. VILAMAIOR, P S L e TABOGA, S R e CARVALHO, H F. Modulation of smooth muscle cell function: morphological evidence for a contractile to synthetic transition in the rat ventral prostate after castration. **Cell biology international**, v. 29, n. 9, p. 809–16, 2005.
108. VIOLA, M. V.; FROMOWITZ, F.; ORAVEZ, S.; DEB, S. *et al.* Expression of ras oncogene p21 in prostate cancer. **The New England Journal of Medicine**, 314, n. 3, p. 133-137, 1986.
109. WU, W. *et al.* Recent progress on magnetic iron oxide nanoparticles: synthesis, surface functional strategies and biomedical application. **Science and Technology of Advanced Materials**. v, 16, 2015.
110. XU, J.; MEYERS, D.; FREIJE, D.; ISAACS, S. *et al.* Evidence for a prostate cancer susceptibility locus on the X chromosome. **Nature Genetics**, 20, n. 2, p. 175-179, 1998.
111. XU, Zhenghong *et al.* The performance of docetaxel-loaded solid lipid nanoparticles targeted to hepatocellular carcinoma. **Biomaterials**, v. 30, n. 2, p. 226-232, 2009.
112. YASPAN, B. L.; MCREYNOLDS, K. M.; ELMORE, J. B.; BREYER, J. P. *et al.* A haplotype at chromosome Xq27.2 confers susceptibility to prostate cancer. **Nature Genetics**, 123, n. 4, p. 379-386, 2008.
113. ZHANG, M.; SIEDOW, M.; SAIA, G.; CHAKRAVARTI, A. Inhibition of p21-

activated kinase 6 (PAK6) increases radiosensitivity of prostate cancer cells.

Prostate, 70, n. 8, p. 807-816, 2010.

114.ZHAO, P.; ASTRUC, D. Docetaxel nanotechnology in anticancer therapy. **ChemMedChem**, v. 7, n. 6, p. 952-972, 2012.