

BIOTRANS

Programa de Pós-Graduação em
Biomedicina Translacional

Mestrado e Doutorado



LORAYNE AGUIAR PEREIRA

**AVALIAÇÃO DO EFEITO CITOTÓXICO E VALIDAÇÃO DE MODELOS
EXPERIMENTAIS 3D *IN VITRO* PARA APLICAÇÃO DE TRATAMENTO COM
NANO-ANÉIS DE Fe@Fe₃O₂ PARA HIPERTERMIA MAGNÉTICA**

DUQUE DE CAXIAS

2021

LORAYNE AGUIAR PEREIRA

**AVALIAÇÃO DO EFEITO CITOTÓXICO E VALIDAÇÃO DE MODELOS
EXPERIMENTAIS 3D *IN VITRO* PARA APLICAÇÃO DE TRATAMENTO COM
NANO-ANÉIS DE Fe@Fe₃O₂ PARA HIPERTERMIA MAGNÉTICA**

Trabalho final apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Biomedicina Translacional, como parte da obtenção do título de mestre em Ciências Biomédicas na Universidade do Grande Rio (UNIGRANRIO).

Orientadora: Sara Gemini Piperni

Segundo orientador: Victor do Valle Pereira Midlej

DUQUE DE CAXIAS

2021

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UNIGRANRIO – NÚCLEO DE COORDENAÇÃO DE BIBLIOTECAS

P436a Pereira, Lorayne Aguiar.
Avaliação do efeito citotóxico e validação de modelos experimentais 3D *in vitro* para
aplicação de tratamento com nano-anéis de Fe@Fe₃O₂ para hipertermia magnética / Lorayne
Aguiar Pereira. – Duque de Caxias, 2021.

46 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado em Biomedicina Translacional) – Universidade do Grande
Rio “Prof. José de Souza Herdy”, Escola de Ciências da Saúde, 2021.

“Orientadores: Prof.^a Sara Gemini Piperni

Prof. Victor do Valle Pereira Midlej”

Referências: f. 34.

LORAYNE AGUIAR PEREIRA

**AVALIAÇÃO DO EFEITO CITOTÓXICO E VALIDAÇÃO DE MODELOS
EXPERIMENTAIS 3D *IN VITRO* PARA APLICAÇÃO DE TRATAMENTO COM
NANO-ANÉIS DE Fe@Fe₃O₂ PARA HIPERTERMIA MAGNÉTICA**

Trabalho final apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Biomedicina Translacional, como parte da obtenção do título de mestre em Ciências Biomédicas na Universidade do Grande Rio (UNIGRANRIO).

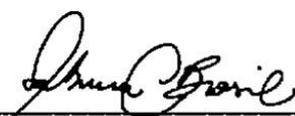
Rio de Janeiro, 01 de junho de 2021.

BANCA EXAMINADORA



Prof^a. Dra. Esther Rieko Takamori

UNIFASE/FMP



Prof^a. Dra. Sabrina Castro Brasil

UNIGRANRIO



Prof. Dr. Paulo André da Silva

UNIGRANRIO

AGRADECIMENTOS

A Deus e as forças que regem junto a Ele por me ajudarem a trilhar meu caminho e me guiarem até aqui.

A minha mãe, Claudia de Souza Aguiar, meu incondicional agradecimento. Obrigado pela criação, por todo apoio e esforço em todos os momentos.

Ao meu namorado Victor Hugo de Oliveira dos Santos, pela grande torcida, ajuda e confiança no meu potencial e estar sempre ao meu lado em todos os momentos vividos nesses 8 anos juntos.

Aos meus orientadores Professores Sara Gemini Piperni e Victor do Valle Pereira Midlej, pela oportunidade, confiança, atenção e aprendizados. Vocês são grandes exemplos de profissionais e pessoas a serem seguidos.

À Professora Sara Gemini Piperni, gostaria de dar um agradecimento especial, pela grande oportunidade, por deixar eu seguir o caminho da pesquisa científica, pelos ensinamentos diários e por sempre segurar a minha mão em todos os momentos difíceis seja relacionados a bancada como na vida, por sempre confiar em mim e me fazer acreditar que posso. Todos os ensinamentos foram e serão válidos.

Aos grupos de pesquisa da UNIGRANRIO e FIOCRUZ por complementarem nos conhecimentos e discussões de artigos e resultados.

As amigas que adquiri durante o mestrado, a Ana Beatriz Machado, ex-técnica do laboratório presente na UNIGRANRIO (LAMP), e a Priscilla Rueles, colega de turma, por não me fazerem desistir nunca e sempre me ensinarem coisas incríveis durante todos os dias juntas no laboratório, por serem sempre tão incríveis comigo, por estar presente em todos os momentos incluindo alegrias, tristezas, vitórias, desespero, curtições, conquistas e pela amizade de vocês até aqui.

A todas as instituições de ensino envolvidas que colocaram em prática este programa de pós-graduação em biomedicina translacional e tornar possível pesquisas multidisciplinares e, assim, permitir resultados concretos para pesquisas que vão da bancada para o leito. Ao CBPF que contribuiu na realização de medidas e caracterizações apresentados neste trabalho, em especial a Bianca Monserrat e Marcel Martins pela paciência e compartilhamento de conhecimentos que contribuíram significativamente para as análises de dados e discussão de resultados.

A FAPERJ, pelo apoio financeiro.

RESUMO

A utilização dos esferoides, modelos tridimensionais (3D), é um modelo promissor para o estudo do câncer, tendo em vista a mimetização do comportamento das células *in vivo*, assim como possibilita a minimização da utilização de modelos animais. Uma das novas abordagens estudadas contra o câncer é a hipertermia magnética, que, usando nanopartículas (NPs) de óxido de ferro magnéticas promovem a destruição das células cancerosas, por possuírem maior sensibilidade à altas temperaturas. As NPs de *Vortex Iron oxide Particles (VIPs)* apresentam um novo formato em nano-anéis, os quais geram um aquecimento superior as NPs esféricas já existentes. Este projeto tem o objetivo de analisar o efeito citotóxico das NPs *VIPs* em modelos celulares 3D de linhagens distintas. As NPs *VIPs* de Ferro-magnetita ($\text{Fe@Fe}_3\text{O}_4$) foram sintetizadas e caracterizadas com as técnicas de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Difração de Raios X (DRX) para determinar sua morfologia e fases cristalinas. Os esferoides de HEK293 e SAOS2 foram produzidos em diferentes números celulares (10000, 30000 e 50000 células/poço) e a caracterização morfológica e volumétrica dos esferoides foram feitas utilizando o *software Image J*. O número de células contidos nos esferoides e a citotoxicidade das NPs *VIPs* (expostas a 24h as concentrações de 20, 30, 50, 70, 100 e 500 $\mu\text{g/ml}$) foram avaliadas com o ensaio de MTT. Os resultados mostraram que os esferoides de 10000 células/poço apresentam maior viabilidade e morfologia regular para uma melhor comparação após o tratamento hipertérmico. Nos resultados de exposição das NPs *VIPs* em 24 horas não houve morte celular significativa nos esferoides de células HEK293 e SAOS2. Os esferoides de 10000 células/poço apresentaram melhor viabilidade, assim como, não foi observado a morte das células presentes nos esferoides quando em contato com as diferentes concentrações de NPs *VIPs*, o que permite a escolha de uma grande variedade de doses para futuras aplicações de hipertermia magnética.

Palavras-chave: Câncer, esferoides, Hipertermia magnética, nanopartículas de óxidos de ferro e *VIPs*.

ABSTRACT

The use of spheroids, three-dimensional (3D) models, is a promising model for the study of cancer, in view of mimicking the behavior of cells in vivo, as well as enabling the minimization of the use of animal models. One of the new approaches being studied against cancer is magnetic hyperthermia, which, using magnetic iron oxide nanoparticles (NPs) promote the destruction of cancer cells, as they are more sensitive to high temperatures. Vortex Iron oxide Particles (VIPs) NPs feature a new shape in nano-rings, which generate higher heat than existing spherical NPs. This project aims to analyze the cytotoxic effect of VIPs NPs in 3D cell models of different lineages. The Ferromagnetite VIP NPs (Fe@Fe₃O₄) were synthesized and characterized with Scanning Electron Microscopy (SEM) and X-Ray Diffraction (XRD) techniques to determine their morphology and crystalline phases. The HEK293 and SAOS2 spheroids were produced in different cell numbers (10000, 30000 and 50000 cells/well) and the morphological and volumetric characterization of the spheroids were performed using Image J software. The number of cells contained in the spheroids and the cytotoxicity of NPs VIPs (exposed to 24h at concentrations of 20, 30, 50, 70, 100 and 500 µg/ml) were evaluated with the MTT assay. The results showed that spheroids of 10,000 cells/well have greater viability and regular morphology for better comparison after hyperthermic treatment. In the results of exposure of VIPs NPs in 24 hours there was no significant cell death in HEK293 and SAOS2 cell spheroids. The spheroids of 10,000 cells/well showed better viability, as well as the death of cells present in the spheroids when in contact with different concentrations of VIPs NPs was not observed, which allows the choice of a wide variety of doses for future applications of magnetic hyperthermia.

Keywords: Cancer, spheroids, Magnetic hyperthermia, iron oxide nanoparticles and VIPs.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 Principais características para o desenvolvimento do microambiente tumoral.....	1
FIGURA 2 Taxa mundial da mortalidade do câncer no ano de 2018.....	2
FIGURA 3 Comparação do cultivo de células em bidimensional-2D e tridimensional-3D.....	3
FIGURA 4 Diferença entre as formas de hipertermia que proporciona o aquecimento tecidual tumoral	6
FIGURA 5 Diferença do efeito de permeabilidade e retenção sanguínea entre tecido normal e tecido tumoral	8
FIGURA 6 Diferença morfológica e comportamental das NPs de óxido de ferro.....	9
FIGURA 7 Síntese das nanopartículas de Fe@Fe ₃ O ₄	13
FIGURA 8 Formação dos esferoides de HEK-293 e SAOS-2 em diferentes quantidades celulares	16
FIGURA 9 Exposição das NPs de Fe@Fe ₃ O ₄ VIPs aos esferoides	18
FIGURA 10 Micrografias de MEV das NPs VIPs de Fe@Fe ₃ O ₄	19
FIGURA 11 Difratoograma das NPs de Fe@Fe ₃ O ₄	20
FIGURA 12 Comparação da estabilidade coloidal das NPs em contato com água e meio de cultivo	21
FIGURA 13 Comparação das células HEK293 de monocamada-2D e esferoides-3D visualizadas por micrografias ópticas.....	22
FIGURA 14 Comparação dos esferoides de HEK293 e SAOS2 visualizadas por micrografias ópticas	23
FIGURA 15 Comparação do volume dos esferoides de HEK293 e SAOS2	24
FIGURA 16 Análise da esfericidade dos esferoides das células HEK293 e SAOS2	25
FIGURA 17 Comparação da viabilidade celular entre os esferoides de HEK293 e SAOS2	26
FIGURA 18 Comparação da internalização de células HEK-293 2D e 3D expostas às NPs VIPs.....	27
FIGURA 19 Comparação da internalização de células SAOS2 2D e 3D expostas às NPs VIPs	27
FIGURA 20 Citotoxicidade de NPs de ferro-magnetita após 24 horas de exposição em células HEK-293 e SAOS-2 2D e 3D avaliado com o teste de MTT	28

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 O câncer	1
1.2 Comparação dos modelos celulares 2D e 3D para o estudo do câncer.....	2
1.3 Hipertermia magnética.....	5
1.4 Nanopartículas para hipertermia magnética	6
2. JUSTIFICATIVA	11
3. OBJETIVOS	12
3.1 Objetivo geral	12
3.2 Objetivos específicos	12
4. METODOLOGIA	13
4.1 Síntese das NPs	13
4.2 Caracterização das NPs	14
4.2.1 Difração de Raio X (DRX).....	14
4.2.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	15
4.2.5 Espalhamento dinâmico de luz (Dynamic Light Scattering - DLS).....	15
4.2.6 Potencial Zeta.....	15
4.3 Produção dos esferoides de diferentes linhagens	16
4.4 Caracterização dos esferoides	16
4.4.1 Avaliação da morfologia e do diâmetro	16
4.4.2 Ensaio de viabilidade celular (MTT)	17
4.5 Esferoides expostos às NPs VIPs	18
4.6 Análises estatísticas.....	18
5 RESULTADOS	18
5.1 Caracterização das NPs	18
5.1.1 Análise Morfológica das NPs de Fe@Fe ₃ O ₄	19
5.1.2 Análise Cristalográfica das NPs de Fe@Fe ₃ O ₄	19
5.1.3 Análise da estabilidade das NPs de Fe@Fe ₃ O ₄ em meio de cultivo	20

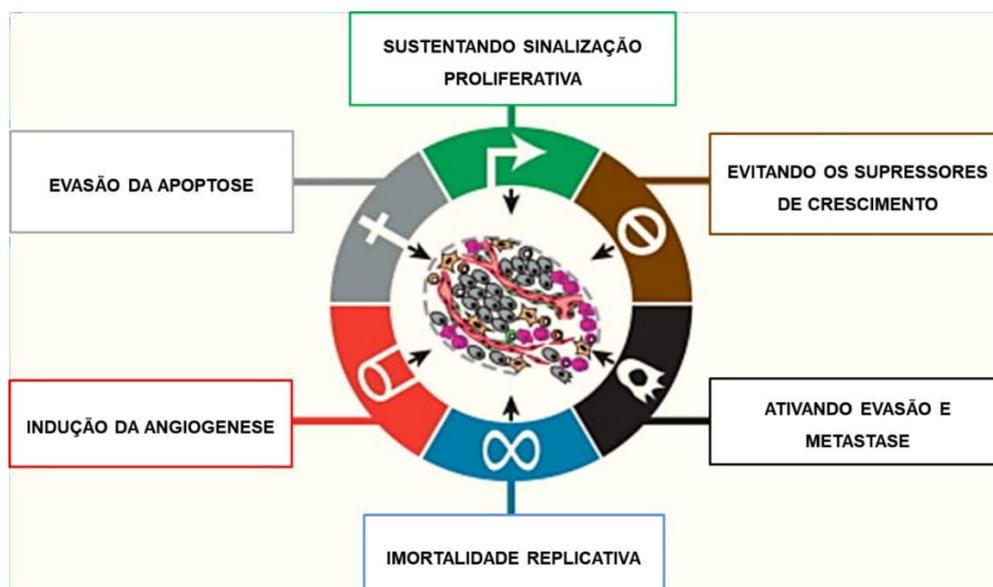
5.2 Caracterização dos esferoides	21
5.2.1 Avaliação morfológica dos esferoides.....	22
5.2.2 Avaliação da Viabilidade dos esferoides.....	25
5.3 Avaliação da interação das NPs de Fe@Fe₃O₄ nos esferoides	26
5.4 Avaliação da viabilidade dos esferoides quando em contato com as NPs de Fe@Fe₃O₄.....	28
6 DISCUSSÃO	29
7 CONCLUSÃO.....	33
8 REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA	34

1. INTRODUÇÃO

1.1 O câncer

O câncer é uma doença caracterizada por uma divisão celular anormal que resulta na proliferação exacerbada e desordenada das células, afetando tanto a bioquímica intracelular quanto a comunicação intercelular (HANAHAN *and* WEINBERG, 2011; BAÑOBRE-LÓPEZ *et al.*, 2013). As principais características que ajudam na compreensão da progressão do microambiente tumorigênico são destacadas na: sustentação de sinalização proliferativa, evasão de supressores de crescimento, resistência à morte celular, imortalidade replicativa, angiogênese e ativação da invasão e metástase (Figura 1), assim como, a instabilidade do genoma e a inflamação local (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

Figura 1: Principais características para o desenvolvimento do microambiente tumoral.



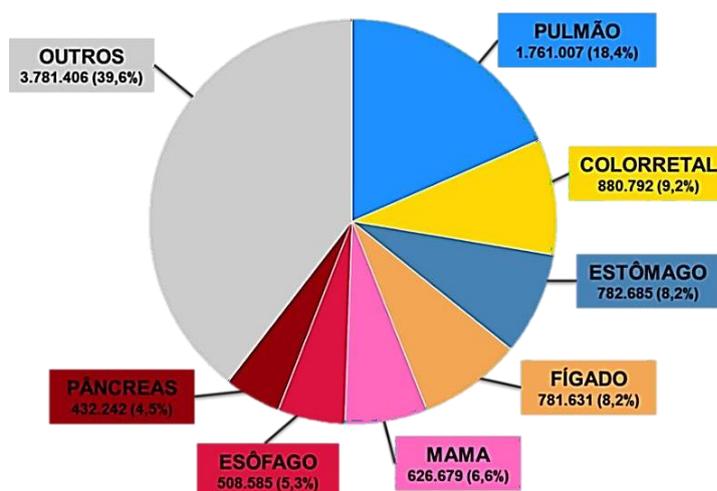
Adaptada Hanahan *and* Weinberg, 2011.

O câncer trata-se de uma patologia multifatorial, onde fatores genéticos e ambientais ajudam a torná-la fortemente resistente aos tratamentos atuais, apesar de alguns tipos de câncer terem se mostrado mais responsivos ao tratamento quando diagnosticados em seus estágios iniciais (LIU *et al.*, 2019). Com a resistência aos tratamentos e evolução da doença, o câncer pode levar a migração das células tumorais. Desta forma, ocorre a invasão e colonização das células mutadas aos

demais tecidos presentes no organismo, através da neovascularização (formação de novos vasos) que está bastante presente neste tecido (GIUSTINI *et al*, 2013; FARZIN *et al*, 2019).

Além disso, com a realização do tratamento, alguns tumores uma vez tratados podem apresentar a recorrência da doença, que, muitas das vezes, leva a morte do paciente. Por estas razões, o câncer é uma doença que possui uma das maiores taxas de mortalidade no mundo (IARC, 2018). É estimada em, aproximadamente, 9,6 milhões de mortes de indivíduos de ambos os sexos e diferentes idades, dados obtidos apenas no ano de 2018 com um levantamento de diferentes tipos de câncer (Figura 2) (IARC, 2018).

Figura 2: Taxa mundial da mortalidade do câncer no ano de 2018.



Aproximadamente 9,6 milhões de pessoas morreram com câncer no ano de 2018. Adaptada de IARC, 2018.

Em vista destas características, mesmo com as técnicas atuais, não existe um tratamento que seja totalmente eficaz. Há a necessidade de um tratamento específico para determinado tumor e que consiga atingir locais de difícil acesso para possíveis tratamentos como, por exemplo, a glia e o osso locais onde se desenvolvem o glioblastoma e osteossarcoma, respectivamente (ALBERTS *et al*, 2017; MAHMOUDI *et al*, 2018). Contudo, é imprescindível e de grande urgência a inserção de uma nova abordagem terapêutica a fim de minimizar esses dados melhorando a sobrevida e a qualidade de vida dos pacientes.

1.2 Comparação dos modelos celulares 2D e 3D para o estudo do câncer

Diversos modelos celulares são utilizados na pesquisa de novas abordagens terapêuticas contra o câncer, assim como em outros tipos de doenças. Normalmente são utilizadas células em monocamadas ou bidimensionais (2D) que possuem uma maior facilidade ao manusear (Figura 3A) (OSSEIRAN *et al*, 2019). Ainda assim não apresentam características que mimetizam o ambiente e o comportamento do tecido tumoral *in vivo*. Os cultivos em monocamada são realizados em cima de um substrato rígido e artificial onde a adesão celular é devida a ligação das proteínas de membrana celular com esse substrato. Contudo, a organização tecidual original se perde devido a limitação das interações entre proteínas celulares. As integrinas e o citoesqueleto sofrem alterações, modificando sua morfologia inicial e alterando a polaridade celular e as vezes até o metabolismo, fenótipo e genótipo comparados aos modelos *in vivo* (CO *et al.*, 2019).

De forma a tentar superar estas limitações foi desenvolvida a cultura de células tridimensionais (3D), os esferoides, um modelo celular que se comporta com maior similaridade ao tecido *in vivo* (Figura 3B) (OSSEIRAN *et al*, 2019). Um agrupamento celular derivado de células cancerosas em monocamadas aderentes desenvolvidas artificialmente. Este modelo permite que as células se organizem e interajam com a estrutura extracelular circundante em três dimensões, não sendo cultivadas em uma única camada plana como nas tradicionais culturas de células em monocamada (2D) (Figura 3A) (CASTIAUX *et al.*, 2019). Desta maneira são restabelecidos os sinais bioquímicos celulares e o acesso a oxigênio e nutrientes de modo não uniforme, como acontece em massas tumorais *in vivo*. Portanto, os esferoides, que tem o seu centro menos acessível ao oxigênio e nutrientes que sua camada externa, formam um gradiente natural que reproduz o que acontece *in vivo* (ZANONI *et al*, 2016; TIETZE *et al*, 2019).

Figura 3: Comparação do cultivo de células em bidimensional-2D (A) e tridimensional-3D (B).

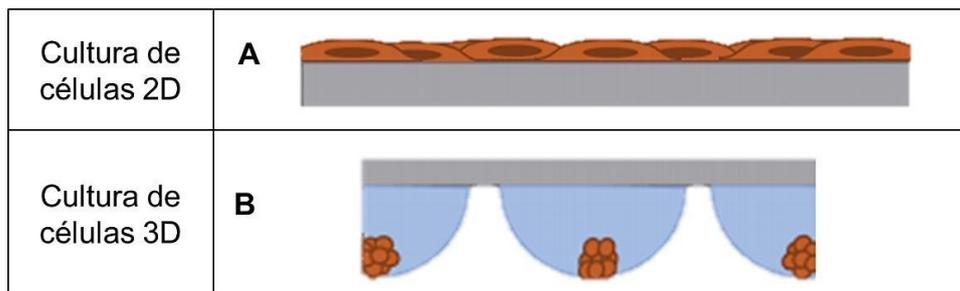


Ilustração da diferença entre formas de cultivo bidimensional 2D e tridimensional 3D. Em A as células se posicionam em uma única camada, pois são cultivadas em placas com um fundo plano. Já em B, a placa de cultivo recebe um revestimento de material polimérico e apresenta um fundo com formato em U, que impede o contato da célula com a placa e intensifica o contato célula-célula apresentando um formato em esfera. Adaptada de Castiaux *et al.*, 2019.

A formação de estruturas de modelos tridimensionais pode depender ou não de um suporte estrutural, como hidrogéis (material formado por uma rede de cadeias poliméricas reticuladas que retém água) de origem vegetal (alginato, agarose), animal (Matrigel®, colágeno) ou química (QGel® Matrix) (CASTIAUX *et al.*, 2019; BERGENHEIM *et al.*, 2020). Outras estruturas são as matrizes inertes, membranas semelhantes a esponjas feitas de poliestireno que contêm poros para as células proliferarem e crescerem. Quando não é presente um suporte estrutural físico, a formação do modelo depende das células se auto agruparem. Para realização desse agrupamento celular, as placas de cultivo podem ser revestidas com polímero hidrofílico para impedir que as células adiram na superfície, permitindo que as células se agrupem e formem sua própria matriz extracelular (ECM) (ZANONI *et al.*, 2016). Além disso, as placas podem apresentar superfícies modificadas com micropadrão ou micropoços que induzem as células a crescer como aglomerados (CASTIAUX *et al.*, 2019). Da mesma forma que pode ser utilizada a técnica da gota suspensa, onde as células são colocadas em uma gota suspensa em meio, permitindo que estas se agreguem e formem esferoides no fundo da gota (FLEDDERMANN *et al.*, 2019).

O modelo no qual é aplicado um revestimento com agarose em uma placa com fundo U facilita a agregação celular. Deste modo, revela uma melhor reprodução do ambiente tumoral exibindo interação célula-célula, presença de centro hipóxico, mimetização de penetração, resposta e resistência a substâncias ao tecido, assim como, produção/deposição de matriz extracelular. O que apresenta ser o modelo tridimensional (3D) (Figura 3B) mais parecido com o ambiente tumoral presente *in*

vivo. Portanto, este modelo supri a falta de informações dos ensaios realizados dos testes em monocamada realizados *in vitro*, além de minimizar a utilização de modelos animais (ZANONI *et al*, 2016; OSSEIRAN *et al*, 2019; TIETZE *et al*, 2019).

1.3 Hipertermia magnética

Na tentativa de desenvolver novas abordagens terapêuticas para o tratamento do câncer, várias pesquisas têm sido realizadas em busca de métodos a serem utilizadas tanto como monoterapia quanto em associação aos demais tratamentos já existentes, tais como: quimioterapia, radioterapia e exérese do tumor. Dentre estas técnicas utilizadas, a hipertermia foi descrita a mais de 5000 anos, sendo aplicada através de um cautério para o tratamento contra o câncer de mama, que retorna aos tempos de hoje sendo uma condição bastante estudada (NIELSEN *et al.*, 2001). Esta abordagem se baseia na indução de calor para promover o aumento da temperatura das células e/ou do corpo humano em um determinado período de tempo com ou sem a utilização de NPs (GIUSTINI *et al*, 2013; FARZIN *et al.*, 2019).

Foi mostrado que as células cancerosas, diferente das células saudáveis, quando expostas a altas temperaturas (entre 41 °C e 45 °C) apresentam maior sensibilidade e sofrem alterações que podem inclusive levar à morte, enquanto as células saudáveis suportam temperaturas até 47° (GRASSET *et al*, 2004; FARZIN *et al.*, 2019). O aumento da temperatura também ajuda na permeabilidade vascular aumentando o fluxo sanguíneo que, conseqüentemente, melhora a oxigenação, regressão do tumor e diminui a formação do centro hipóxico tumoral (BEIK *et al*, 2016).

Em uma comparação entre hipertermia tradicional *versus* hipertermia magnética, o que irá diferir entre essas duas abordagens é o modo de entrega de energia que levará ao aumento da temperatura local e, em ambos os casos, o objetivo sempre será a destruição do tecido tumoral. Na hipertermia tradicional, como exemplo a radioterapia (Figura 4A), o aquecimento é realizado a partir do ambiente externo para o ambiente interno ao tumor, tendo assim a maior fonte de energia entregue na parte superficial dele. Como resultado, os tecidos saudáveis (mais externos ao tumor) são acometidos com maiores doses de calor para que a dose exata alcance o tecido tumoral. Esta técnica apresenta baixa seletividade, possíveis efeitos negativos e, talvez, uma reação térmica não eficiente no local de interesse (BEIK *et al*, 2016). Em

contrapartida, na hipertermia magnética (Figura 4B) são usadas NPs magnéticas entregue às células cancerosas, por via oral ou intravenosa (NEHOFF et al., 2014). Assim, é possível atingir o tecido tumoral a partir do seu interior. Com a indução de um campo magnético alternado entregando altas taxas de energia, onde as NPs sofrerão um processo de reversão (ou seja, a taxa de absorção de energia (SAR), energia está absorvida pelas NPs, fornece o aumento de temperatura local) (GALEANO-VILLAR, 2019). As NPs gerarão uma maior entrega de calor dentro do ambiente tumoral e possivelmente de forma intracelular, devido a internalização das partículas pelas células (ABU-BAKR *et al*, 2019). Desta forma, é diminuída a ação adversa da reação térmica nos tecidos adjacentes (BEIK *et al*, 2016).

Figura 4: Diferença entre as formas de hipertermia que proporciona o aquecimento tecidual tumoral.

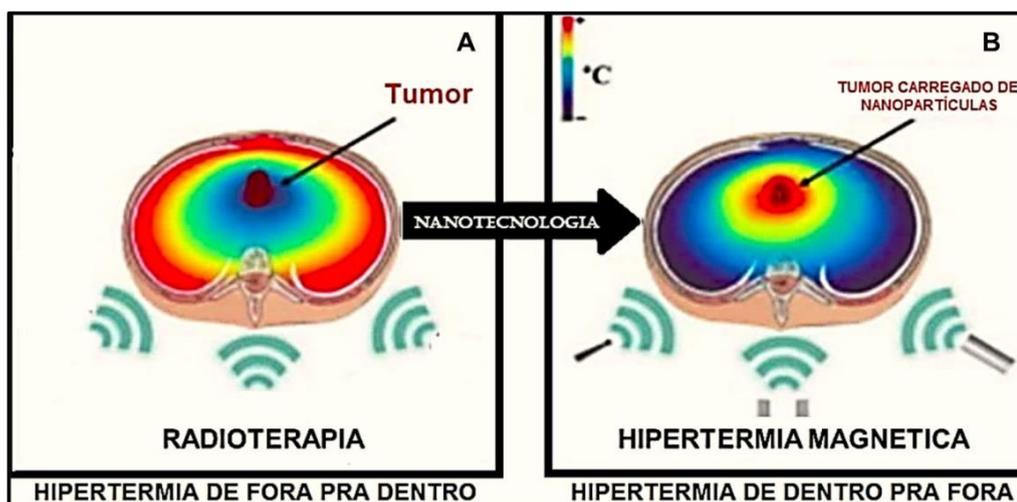


Ilustração da comparação de tratamentos com hipertermia para destruição do tecido tumoral. Em A mostra um exemplo de hipertermia tradicional ocorrendo um aquecimento de fora para dentro com maior fonte de aquecimento no tecido circundante ao tecido tumoral. E em B mostra a hipertermia magnética que utiliza NPs diretamente no tecido tumoral para maior aquecimento, minimizando os efeitos ao tecido adjacente. Adaptada Beik *et al*, 2016.

1.4 Nanopartículas para hipertermia magnética

Um grande avanço na área da biotecnologia é a utilização de NPs ou de materiais nanoestruturados para o desenvolvimento da técnica de hipertermia. Tais materiais já estavam sendo utilizados na terapia contra o câncer como carreadores para liberação de fármacos, melhorando a eficiência do tratamento pois evitam a biotransformação dos mesmos (FARZIN *et al.*, 2019). Um exemplo é a

magnetofecção, técnica que promove a transfecção do material genético acoplado às NPs com a aplicação de um campo magnético para conduzir de forma mais eficiente esse material genético a célula (CEN *et al.*, 2019). Além disso, as NPs magnéticas já estão sendo muito utilizadas para diagnóstico do câncer junto a ressonância magnética (RM) para melhorar os efeitos de contrastes de T1 diminuindo os sinais de T2, tendo uma melhora da nitidez das imagens de RM (MORNET *et al.*, 2004; SÁNCHEZ-CABEZAS *et al.*, 2019).

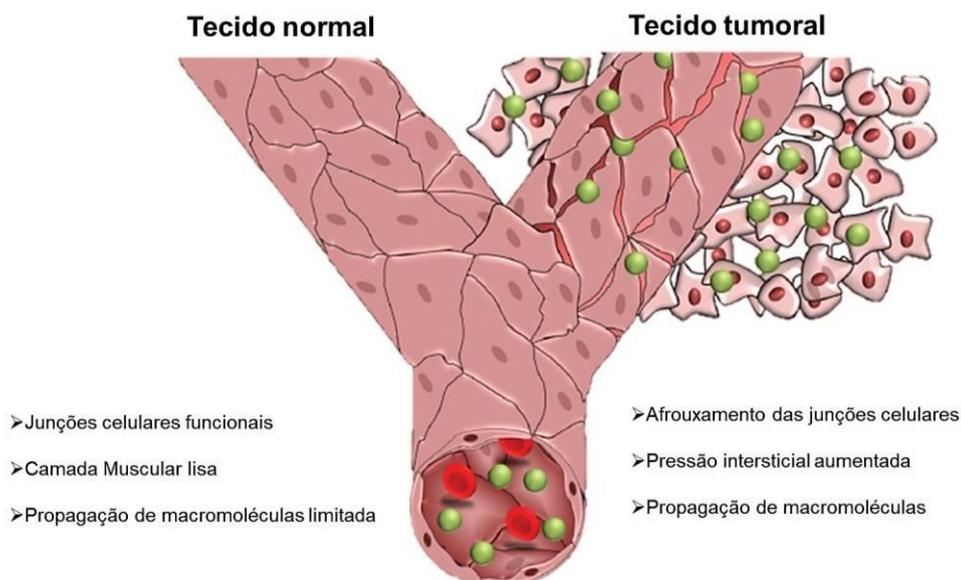
A hipertermia magnética oferece um sistema de aquecimento que se beneficia das propriedades das NPs ou dos biomateriais nanoestruturados ferromagnéticas ou ferrimagnéticas (GALEANO-VILLAR, 2019). A internalização dessas NPs quando expostas à ação de um campo magnético alternado permite um aquecimento controlado concentrando maior parte do calor diretamente nas células tumorais com o intuito de destruí-las, mantendo as células normais funcionais (ABU-BAKR *et al.*, 2019). A seletividade de destruição das células cancerosas é devido ao fato dessas células apresentarem uma morfologia e organização tecidual diferenciada. A divisão dessas células ocorrem de maneira desorganizada e exacerbada, em comparação as células saudáveis, que deixam-nas mais susceptíveis a sua destruição (FARZIN *et al.*, 2019). Diante destas características, a hipertermia magnética já vem sendo testada *in vivo* contra tumores de difícil alcance como o glioblastoma, constituindo um avanço muito importante na pesquisa contra o câncer (MAHMOUDI *et al.*, 2018; ADAMIANO *et al.*, 2019). Por outro lado, a utilização dessa abordagem também já foi observada em osteossarcoma, tumores ósseos que tem um limitado alcance e maiores chances de metástases (ADAMIANO *et al.*, 2019).

Para a escolha das NPs que serão utilizadas na hipertermia magnética e suas propriedades físico-químicas irá depender da composição do material, tamanho e forma de apresentação. Sobretudo, é necessário uma afinidade do mesmo com o tecido, ou seja, a sua biocompatibilidade, assim como a não toxicidade (ICONARU *et al.*, 2012; BAÑOBRE-LÓPEZ *et al.*, 2013) Para a aplicação do tratamento de hipertermia magnética os nanomateriais mais utilizados são os óxidos de ferro magnéticos. A magnetita (Fe_3O_4) que dispõe de maior facilidade de síntese e saturação compreendendo em maior e mais controlada magnetização ((BARROW *et al.*, 2018; ABU-BAKR *et al.*, 2019; GALEANO-VILLAR, 2019). E a maghemita (γ -

Fe₂O₃), que é uma variedade de óxido de ferro com maior oxidação devido sua redução a partir da magnetita, menor quantidade de ferro e revela uma composição química igual a hematita (α -Fe₂O₃). Está última é mais uma variedade de óxido de ferro, porém forma não magnética (BARROW *et al.*, 2018; ABU-BAKR *et al.*, 2019; GALEANO-VILLAR, 2019). Estes materiais são considerados compatíveis e não tóxicos ao organismo e para melhorar a especificidade e, conseqüentemente, a seletividade das NPs às células cancerosas é possível funcionaliza-las utilizando materiais orgânicos ou inorgânicos (BAÑOBRE-LÓPEZ *et al.*, 2013).

As NPs devem se apresentar em nanoescala de 1-100 nm tendo maior interação com o meio biológico. Isso porque, quando elas se encontram com um tamanho abaixo de 50 nm apresentam meia-vida sanguínea maior do que as NPs acima de 50 nm que são facilmente tomadas pelo sistema fagocitário (SÁNCHEZ-CABEZAS *et al.*, 2019). Um tamanho ideal para essas NPs deveria permitir a interação com as células endoteliais do tecido tumoral, que diferente das células do tecido normal, apresentam um efeito de permeabilidade e retenção aumentada (efeito EPR) que possibilita a passagem e disposição uniforme das NPs dentro do tecido tumoral. Esta vantagem é devido à disposição única das células presente nos vasos sanguíneos do tecido canceroso. Nesse local as NPs mostram maior seletividade, pois passam pelas fenestras presentes nesse tecido aumentando sua concentração (Figura 5) (BAÑOBRE-LÓPEZ *et al.*, 2013; NEHOFF *et al.*, 2014). Desta forma é possível induzir um aquecimento por todo tecido destruindo uma maior quantidade de células cancerosas.

Figura 5: Diferença do efeito de permeabilidade e retenção sanguínea entre tecido normal e tecido tumoral.

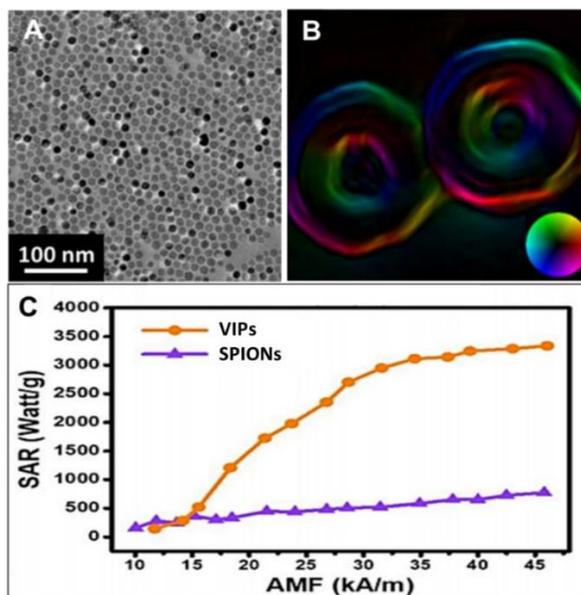


Vantagens do tecido tumoral para a passagem de NPs para possíveis tratamentos. O tecido normal possui suas junções funcionais o que impede a passagem de macromoléculas para dentro do tecido, enquanto que o tecido tumoral há um afrouxamento das junções celulares e maior pressão intersticial, auxiliando a passagens das NPs para dentro do tecido permitindo possíveis tratamentos que utilizam as NPs. Adaptada de Nehoff *et al.*, 2014.

As variações das NPs de óxido de ferro, magnetita e maghemita, se apresentam na forma cúbica com face centrada e um comportamento ferrimagnético, que possui orientações magnéticas organizadas sem a necessidade do estímulo fornecido pelo campo magnético. Na maior parte dos casos relatados na literatura estas NPs apresentam morfologia esférica (Figura 6A), com um diâmetro de aproximadamente 15 nm e acabam possuindo um comportamento superparamagnético à temperatura ambiente, sendo denominadas *Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles*, ou SPIONs. Estas partículas têm orientações magnéticas desorganizadas e nulas, necessitando do estímulo do campo magnético (LIU *et al.*, 2015; Galeano-Villar B, 2019; LIU *et al.*, 2019) . Recentemente foram desenvolvidas NPs em um formato de nano-anéis (Figura 6B), manifestando um comportamento de vórtice magnético e são denominadas *Vortex Iron Oxide Particles (VIPs)*, neste caso a indução de calor eficiente é causado pelo processo de reversão (Figura 6C), devido a sua forma. Com isso, as VIPs realizam giros no seu próprio eixo formando linhas de calor circular ao seu redor, levando o aumento da temperatura obtidos por elas de dentro para fora, que, quando expostas ao campo magnético alternado apresenta uma maior eficiência térmica (GALEANO-VILLAR,

2019; LIU *et al*, 2019). Dessa maneira, estas partículas podem se revelar uma melhor escolha para o tratamento de hipertermia magnética para o tratamento do câncer.

Figura 6: Diferença morfológica e comportamental das NPs de óxido de ferro.



(A e B) Diferença da morfologia das NPs de óxidos de ferro. Em A são observadas as NPs denominadas SPIONs, esféricas, e em B as NPs com formato em nano-anéis, ou seja, as VIPs. O gráfico da imagem C mostra a taxa de absorção de energia com relação ao campo magnético aplicado que esta é convertida em calor. Quanto mais energia as NPs absorvem maior é o calor fornecido por elas. No gráfico C, a curva laranja mostra as NPs com maior taxa de absorção de energia, as VIPs, e em roxo as NPs com baixa absorção, as SPIONs. Adaptada de Liu *et al*, 2019.

2. JUSTIFICATIVA

De acordo com o site *IARC (international agency for research on cancer)*, em 2018, a taxa de mortalidade do câncer chega aproximadamente a 9.6 milhões de pessoas em uma escala mundial (IARC, 2018). A partir desta análise, é evidente que diante de tantas possibilidades de tratamento para o câncer, desde monoterapias a terapias combinadas, ainda faltam recursos terapêuticos que possam agir nas células tumorais evitando a ação do mesmo às células saudáveis. A inserção das NPs de óxido de ferro na biotecnologia trouxe a grande oportunidade de utilizações das mesmas em terapias contra o câncer e em possíveis diagnósticos, apesar de ainda não existir um consenso para a regulamentação do uso de NPs. Contudo, a aplicação dessas NPs ao tratamento tumoral, já é alvo de testes clínicos, como descrito no artigo publicado por Mahmoudi, divulgado em 2018, onde testaram a hipertermia magnética como tratamento contra Glioblastoma, um dos cânceres mais agressivos. Este teste foi realizado com a utilização de NPs de óxido de ferro esférica, junto ao campo magnético alternado que induz um superaquecimento provocando a hipertermia magnética. Efeito que é capaz de afetar especificamente as células cancerígenas que, por natureza, são mais sensíveis às altas temperaturas (MAHMOUDI *et al*, 2018).

De acordo com literatura, as NPs de ferro podem apresentar formatos diversificados, bem como é possível a passagem da forma esférica para um novo formato em nano-anéis. Este novo formato leva ao aumento das propriedades magnéticas, disponibilizando um novo produto que possa melhorar as características de hipertermia. Deste modo, com esse estudo será possível testar um novo formato de NPs, os nano-anéis, que promove o efeito vórtice (*VIPs*) e melhora o seu comportamento magnético. O modelo celular 3D possibilita uma melhor dinâmica tecidual do câncer quando comparados a modelos de células em monocamada (2D). Em seguida, serão expostas ao campo magnético alternado e, por conseguinte, um aumento da temperatura que, levará a destruição das células cancerígenas. Essas NPs serão produzidas de ferro-magnetita, para serem colocadas em contato com células 2D e 3D a fim comparar possível efeito tóxico dessas NPs às células. Verificando assim a dose não citotóxica para futuros tratamentos de hipertermia magnética.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral:

Este projeto tem o objetivo de analisar o efeito das NPs VIPs em modelos celulares 2D e 3D gerados a partir das linhagens celulares humanas HEK-293 e SAOS-2 advindas de rim embrionário e osteossarcoma, respectivamente.

3.2 Objetivos específicos:

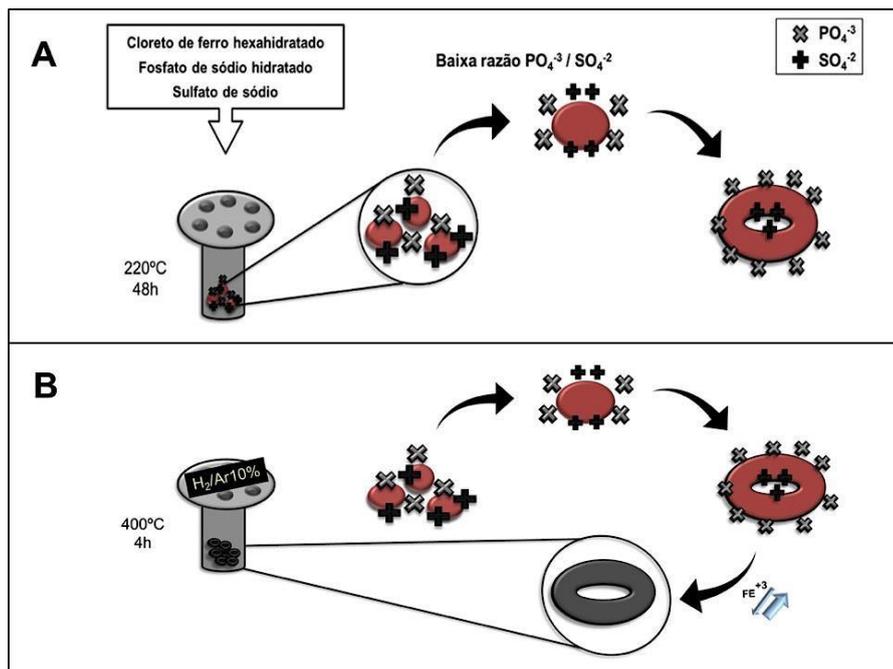
- Sintetizar as NPs VIPs a Fe@Fe₃O₄ por reação hidrotérmica
- Caracterizar as NPs VIPs com e sem meio de cultivo celular a partir das técnicas de MEV, DRX, DLS e Potencial Zeta
- Produzir os esferoides de HEK293 e SAOS2 utilizando placas de fundo U recobertas com agarose 1% e caracteriza-los utilizando o *software Image J*
- Expor as NPs VIPs aos modelos 2D e 3D de HEK293 e SAOS-2 em diferentes concentrações (20, 50, 70, 100, 500 µg/ml)
- Avaliar a citotoxicidade das NPs VIPs aos modelos celulares 2D e 3D a partir do ensaio de MTT

4. METODOLOGIA

4.1. Síntese das NPs

A síntese das NPs foi executada no Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas (CBPF) no Rio de Janeiro. A síntese das NPs é realizada em duas etapas: produção de nano-anéis de hematita ($\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$) e redução a ferro-magnetita ($\text{Fe@Fe}_3\text{O}_4$). A primeira etapa (Figura 7A) foi realizada mediante incubação em um reator hidrotérmico (este foi fabricado como descrito por GALEANO-VILLAR, 2019) de solução aquosa contendo 0,02 M de cloreto de ferro hexahidratado, $5,5 \times 10^{-4}$ M de sulfato de sódio e 3×10^{-4} M de fosfato de sódio hidratado, após a solução foi mantida a 220 °C durante 48 h no reator. A razão de íons fosfato e sulfato permite controlar o tamanho, a morfologia e a arquitetura das NPs trazendo um formato em anéis ou, até mesmo, em um cilindro. Mediante o tratamento térmico, a solução foi esfriada até temperatura ambiente, lavada e centrifugada 4 vezes com etanol. Em seguida, foi seca em uma estufa na temperatura de 60°C durante 12h, obtendo-se um pó vermelho. Os nano-anéis (Figura 7B) de $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$ obtidos na síntese hidrotérmica foi, então, reduzido à $\text{Fe@Fe}_3\text{O}_4$ para o qual são levados em um tratamento térmico a 400°C durante 30 min sob a presença de um fluxo constante de hidrogênio (H_2) e argônio (Ar) a uma concentração de 10%. Logo em seguida a este processo as NPs foram resfriadas a temperatura ambiente mantendo o fluxo de gás, as quais passam da cor avermelhada para a cor preta e respondem à presença de imã (GALEANO-VILLAR, 2019).

Figura 7: Síntese das nanopartículas de $\text{Fe@Fe}_3\text{O}_4$



A primeira etapa (A) da síntese de NPs consiste na formação de nano-anéis de hematita, ferro não magnético e a segunda etapa (B) consiste na redução dos nano-anéis de hematita a nano-anéis de magnetita, tornando-se NPs magnéticas.

4.2. Caracterização das NPs

Para avaliação da síntese das NPs foram utilizadas diferentes técnicas a fim de determinar as características físico-químicas das amostras. As NPs foram testadas em água, como um controle, e meio de cultivo celular *Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM HIGH)*, suplementado com 10 % de Soro Fetal Bovino (SFB) e 1 % de antibiótico Penicilina/Estreptomicina (PS) para que pudéssemos mimetizar o ambiente celular *in vivo*.

4.2.1 Difração de Raio X (DRX)

Os difratogramas foram medidos em uma faixa angular de 2θ compreendida entre 20° até 80° , com passo de $0,017^\circ$. Para a identificação e quantificação das fases cristalinas presentes nas amostras, os difratogramas foram refinados pelo método de *Rietveld* utilizando o pacote aberto *Full Prof*. Foram utilizados padrões disponíveis na base de dados de estrutura cristalina inorgânica (ou do inglês *Inorganic Crystal Structure Database, ICSD*). Estes padrões correspondem às fases de hematita ($\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$), magnetita (Fe_3O_4) e ferro metálico (Fe). As medidas de DRX nas partículas

foram realizadas utilizando um difratômetro de pó da marca *Panalytical*, modelo *X'PERT Pro*, disponível no Laboratório Multiusuário de raios-X do CBPF, RJ.

4.2.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Para a realização da técnica de MEV, as amostras foram diluídas em etanol e dispersas em banho ultrassônico durante 30 minutos. Em seguida, foi acrescentada uma gota da suspensão das NPs de Fe@Fe₃O₄ em grades de carbono. As micrografias foram realizadas utilizando o Jeol 7100 operado a 10kV, presente no Laboratório Multiusuário de Nanociência e Nanotecnologia (LABNANO) disponível no CBPF, RJ.

4.2.3 Espalhamento dinâmico de luz (*Dynamic Light Scattering* - DLS)

A técnica de DLS permite medir o diâmetro hidrodinâmico das NPs possibilitando determinar seu tamanho individual e seus agregados. Assim, sendo possível analisar se as NPs permaneciam ou não em escalas nanométricas. Para isso, as NPs foram colocadas em contato com 15 ml de água e, separadamente, em meio de cultivo durante 24 h. Passado o tempo, foram centrifugadas a 350g por 10 min a 25° C, retirou-se o sobrenadante e foram lavadas com água em ambas condições de tratamento. Em seguida, foram centrifugadas novamente, repetindo-se a lavagem, e o sobrenadante foi recolhido e mantido a temperatura ambiente para secagem. Para realizar as análises foram acrescentadas 5 ml de KCL 1 mM às NPs e, em seguida, em uma cubeta foi adicionado 1 ml da solução de KCL + as NPs. A dispersão dinâmica de luz foi realizada utilizando o equipamento *Brookhaven Instruments 90 Plus Particle Size Analyzer*, do Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas (CBPF).

4.2.4 Potencial Zeta

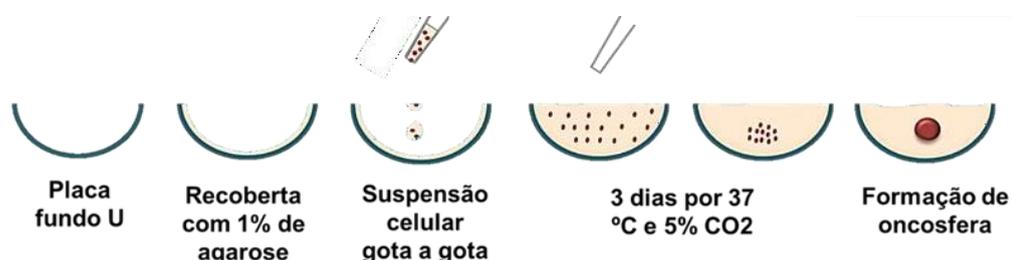
A técnica de Potencial Zeta permite identificar a adsorção proteica a partir da carga superficial presente nas NPs que estão em constante interação com as proteínas presentes no líquido de suspensão. As amostras foram preparadas como descrito na seção 4.2.3. As medidas foram realizadas no equipamento *Brookhaven Instruments 90 Plus Particle Size Analyzer*, do Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas (CBPF).

4.3. Produção dos esferoides de diferentes linhagens celulares humanas

Foram utilizadas células HEK-293 (ATCC ® CRL-1573™) como um controle de células não cancerígenas e SAOS-2 (ATCC® HTB-85™) como um controle de células cancerígenas, linhagens advindas de rim embrionário e osteossarcoma, respectivamente. A utilização de duas linhagens distintas foi necessária a fim de avaliar as diferenças celulares entre elas. As células foram mantidas em meio de cultivo *Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM HIGH)* suplementado com 10 % SFB e 1% de antibiótico contendo 10.000 UI/mL de Penicilina e 10.000 µg/mL de Estreptomicina (PS). As células foram incubadas a 37 °C, em atmosfera umedecida contendo 5 % de CO₂, tanto em cultivo de células em monocamada (2D) quanto em células tridimensionais (3D).

Para o preparo dos esferoides (Figura 8), foram utilizadas placas de fundo U de 96 poços com a superfície revestida com gel de agarose a 1 % (Sigma Aldrich, agarose tipo VII – N° A9045) para impedir a adesão das células à superfície da placa. As células foram cultivadas em diferentes números celulares (10000, 30000 e 50000 células/poço) em 200 µl/poço de meio *DMEM HIGHT* suplementado com 10 % de SFB e 1 % de PS. As células foram incubadas durante 72 h à 37 °C, em atmosfera umedecida contendo 5 % de CO₂ (SOUZA *et al.*, 2019). Todas as etapas de cultivo celular foram realizadas no Laboratório Multidisciplinar de Pesquisas Odontológicas (LAMP), Rio de Janeiro.

Figura 8: Formação dos esferoides de HEK-293 e SAOS-2 em diferentes quantidades celulares.



Os esferoides foram formados a partir de células 2D utilizando uma placa de fundo U com recobrimento de gel de agarose a 1%, adicionando a suspensão celular e deixadas durante 3 dias em incubação a 37 °C e 5% de CO₂ em atmosfera umidificada.

4.4. . Caracterização dos esferoides

4.4.1 Avaliação da morfologia e do diâmetro

Para avaliar e confirmar a morfologia, o diâmetro e a esfericidade dos esferoides em diferentes números celulares foram utilizadas micrografias obtidas mediante a técnica de microscopia ótica (LABOMED-TCM-400) e os diâmetros foram aferidos utilizando o *software IMAGE J*. Após aferição dos diâmetros, foi aplicado aos esferoides a fórmula de volume:

$$V = \frac{4}{3}\pi abc$$

Onde valores de **a**, **b** e **c** determinam as dimensões dos esferoides, **a** indicam a altura, **b** a largura e **c** a profundidade das esferas.

Além disso, para a avaliação da esfericidade dos esferoides foi calculada a razão entre os diâmetros **a** e **b**.

$$E = a/b$$

Quanto mais o resultado se aproxima a 1 a forma dos esferoides é mais próxima da esfericidade.

4.4.2 Ensaio de viabilidade celular (MTT)

O ensaio de MTT (3-(4,5-dimethylthiazolyl-2)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide) (Molecular Probes, Nº M6494) foi realizado a fim de avaliar a viabilidade das células HEK-293 e SAOS-2 após a produção dos esferoides. O MTT mostra a viabilidade celular proporcional à conversão do sal de tetrazólio (MTT) em cristais de formazan, passando da cor amarelada para violeta quando as células se mostram viáveis. Tais sais são dissolvidos em DMSO (Dimetilsulfóxido) (ISOFAR, Nº 258). Para realização do ensaio de viabilidade, ambos os tipos celulares foram cultivados em diferentes números celulares (10.000, 30.000 e 50.000 células/poço) e cultivados por 24 h em monocamada e 72 h para modelos tridimensionais. Após os tempos de cultivo mencionados acima, as células foram incubadas com o MTT (0,5 mg/ml) por 4 h a 37 °C em atmosfera umedecida contendo 5% de CO₂. A absorbância gerada após a incubação do MTT foi medida através do espectrofotômetro em um comprimento de onda (λ) de 590 nm. O controle positivo (+), células inviáveis, foi realizado

acrescentando 10 % de SDS (Dodecil sulfato de sódio) na solução de MTT, sendo o ensaio realizado como mencionado acima. Todos os testes com MTT foram realizados em quadruplicata. Para verificar a possível interferência das NPs de ferro com o ensaio de MTT foi realizado um controle com células expostas às NPs de ferro sem a adição do reagente de MTT no momento do ensaio. Os modelos celulares 2D e 3D ficaram expostos às NPs em um período de 24h e, em seguida, foi realizado o ensaio de MTT como mencionado.

4.5. Esferoides expostos às NPs VIPs

As linhagens celulares HEK-293 e SAOS-2 foram cultivadas em 10.000 células/poço em meio de cultivo DMEM HIGH suplementado com 10 % de SFB e 1 % de PS em um período de 24 h para células em monocamada e 72 h para células em cultivo tridimensional, incubado a 37 °C em atmosfera umedecida contendo 5 % de CO₂. Os modelos celulares foram expostos às NPs de Fe@Fe₃O₄ VIPs de diferentes concentrações (20, 50, 70, 100, 500 µg/ml) pelo período de 24 h em meio de cultivo (Figura 9). Após a exposição os esferoides passaram por avaliações de viabilidade utilizando a metodologia MTT.

Figura 9: Exposição das NPs de Fe@Fe₃O₄ VIPs aos esferoides.

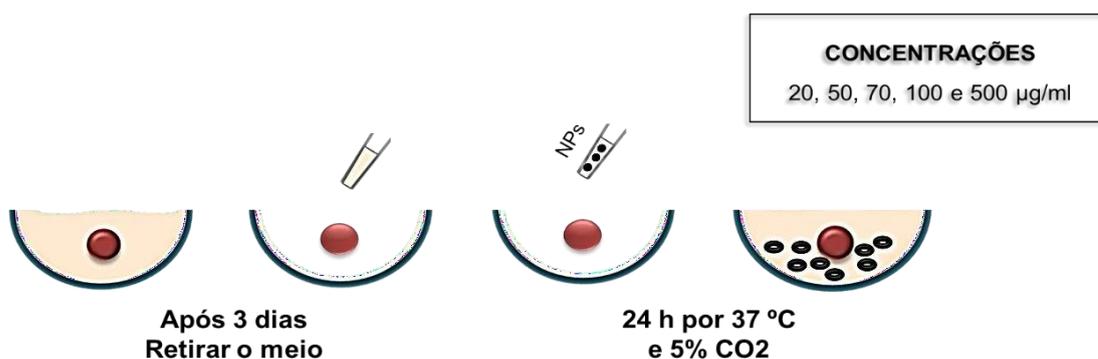


Ilustração da exposição direta das NPs VIPs em diferentes concentrações em um período de 24 h.

4.6. Análises Estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o teste *t de Student*. As diferenças foram definidas como estatisticamente significativas em $p < 0,05$ vs controle. Os resultados quantitativos foram descritos como média \pm desvio padrão das

repetições realizadas em quadruplicadas para cada experimento e, em seguida, das triplicatas experimentais independentes.

5 RESULTADOS

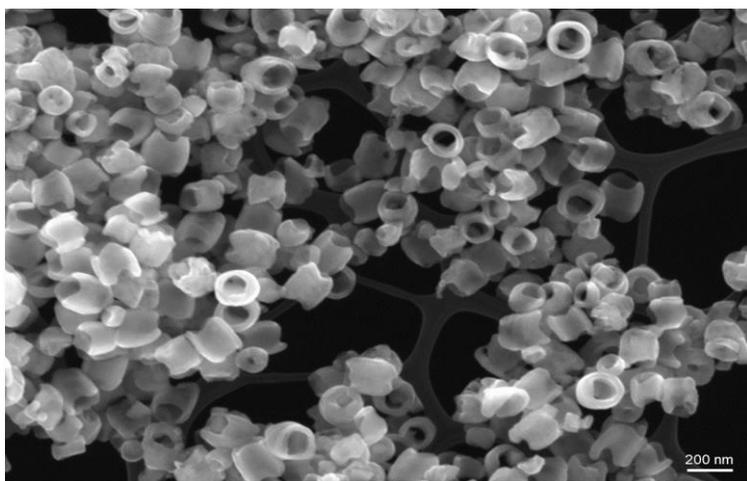
5.1 Caracterização das NPs

As NPs de $\text{Fe@Fe}_3\text{O}_4$ nanoestruturadas foram sintetizadas e caracterizadas utilizando as técnicas de MEV, DRX, DLS e Potencial Zeta confirmando a síntese do material.

5.1.1 Análise Morfológica das NPs de $\text{Fe@Fe}_3\text{O}_4$

A partir da micrografia obtida pela técnica de MEV, foi possível observar que as NPs de ferro-magnetita apresentaram uma morfologia em nano-anéis e tamanho no grau primário de escala nanométrica. Permitiu também visualizar a integridade dos anéis, o que possibilita a realização do seu efeito vórtex, responsável pelo comportamento magnético. Além disso, é possível observar as interações entre elas mostrando a formação de agregados nanoestruturados (Figura 10).

Figura 10: Micrografias de MEV das NPs VIPs de $\text{Fe@Fe}_3\text{O}_4$.

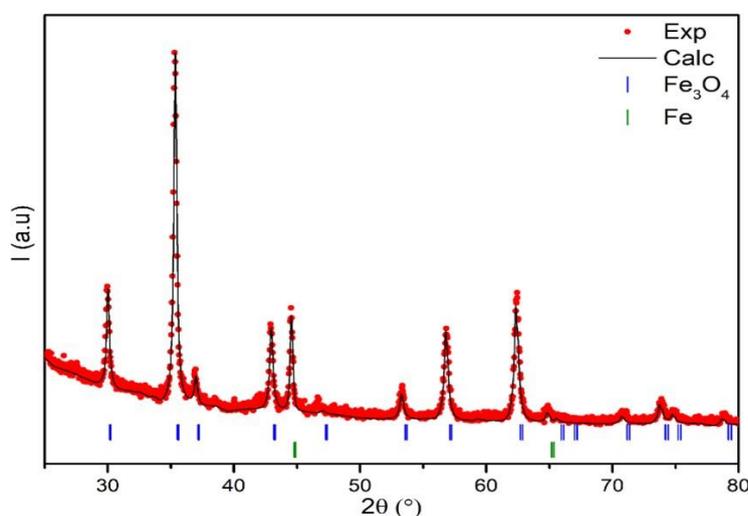


Micrografia da morfologia das NPs de ferro-magnetita com formato em nano-anéis onde elas se apresentam em agrupamentos em nanoescalas.

5.1.2 Análise Cristalográfica das NPs de $\text{Fe@Fe}_3\text{O}_4$

Com a técnica de DRX foi gerado um difratograma que permite visualizar um padrão cristalográfico, o qual é comparado com um banco de dados, possibilitando confirmar a composição do material e o quanto ele é cristalino. Com base no difratograma, podemos observar picos característicos de ferro (Fe) e magnetita (Fe_3O_4), confirmando a presença de ambas as fases cristalinas na nossa amostra. Ainda assim, foi possível determinar um alto grau de cristalinidade confirmado pela presença de picos estreitos. Que quanto mais estreitos os picos são, maior é o grau de cristalinidade do material testado (Figura 11).

Figura 11: Difratograma das NPs de $\text{Fe}@\text{Fe}_3\text{O}_4$.



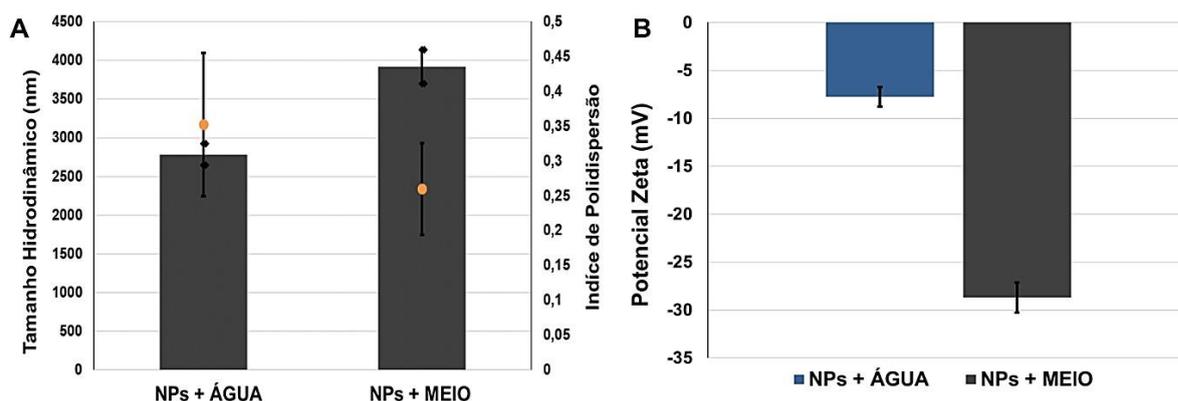
Difratograma do ferro-magnetita, indicado em pontos vermelhos os dados experimentais e na curva preta seu ajuste. Note que todos os picos foram corretamente ajustados. A posição dos picos padrões encontram-se em verde para o ferro-Fe e em azul para a magnetita- Fe_3O_4

5.1.3. Análise da estabilidade das NPs de $\text{Fe}@\text{Fe}_3\text{O}_4$ em meio de cultivo

A dispersão das NPs foi testada em água e meio de cultivo celular para verificar como as NPs de $\text{Fe}@\text{Fe}_3\text{O}_4$ se comportavam quando colocadas em suspensão. Foram utilizadas amostras suspensas em água servindo como controle e amostras suspensas em meio de cultivo para simular o microambiente das NPs *in vivo*. Como o meio de cultura tem a presença de proteínas, principalmente a albumina, são testadas a adsorção destas às NPs a fim de investigar a estabilidade coloidal das NPs. Essas condições foram avaliadas a partir das técnicas de DLS e Potencial Zeta.

Nas análises de DLS (figura 12A) quando observamos os resultados das amostras preparadas em água, observa-se um tamanho de 2782,81+/-139,57 nm e ao comparar estes resultados com as NPs preparadas em meio, o tamanho encontrado foi de 3921,79+/-218,83 nm. Estes dados revelam diferenças significativas do tamanho das NPs, relacionando-se este aumento a presença de proteínas adsorvidas a sua superfície quando preparadas com meio de cultura. A uniformidade do tamanho das NPs foi avaliada pelo índice de polidispersão. Os resultados devem apresentar valores próximos entre 0,0, e 1,0 ou seja, quanto menor os resultados obtidos, maior é a estabilidade do tamanho das NPs. De acordo com os resultados de polidispersão obtidos (Figura 12A), foram obtidos valores de 0,35+/-0,10 UA (unidade arbitrária) da partícula em água e valores de 0,26+/-0,06 UA da partícula em meio. Os dados mostram que as NPs em meio apresentam melhor uniformidade por exibir resultados menores que as NPs expostas a água. A informações obtidas neste teste mostram que a adsorção de proteína às NPs diminui os aglomerados e uniformiza os tamanhos. Com os resultados de Potencial zeta (Figura 12B) foram observados potenciais de -7,76+/-1,01 mV em água e -28,69+/-1,58 mV em meio de cultura. Ambos se mantiveram com resultados negativos e próximo ao valor de referência para NPs que é -30 mV, mostrando uma boa estabilização.

Figura 12: Comparação da estabilidade coloidal das NPs em contato com água e meio de cultivo.



Gráficos dos resultados de dispersão das NPs em água e meio de cultivo celular pelas técnicas de DLS e Potencial Zeta. Na figura A são mostrados os resultados obtidos através da técnica de DLS. A barra em escala cinza representa o tamanho hidrodinâmico sinalizado ao lado esquerdo do gráfico. Observe-se o aumento de tamanho das NPs em contato com meio de cultura, quando comparadas ao resultado das NPs em água. Ainda na figura A, ao lado direito do gráfico é avaliado o índice de polidispersão das NPs indicado pela bolinha laranja. As NPs em água apresentam menor dispersão devido ao seu maior

resultado, já as NPs em meio apresentaram menor resultado de dispersão, com isso as NPs em contato com meio se encontram mais dispersas. A figura B mostra a análise do Potencial Zeta com diferença significativa entre os resultados da comparação entre as amostras: água (azul) e meio (escala cinza). Quando as NPs estão em meio foi observado uma diminuição do Potencial Zeta, o que significa pouca aglomeração entre as NPs.

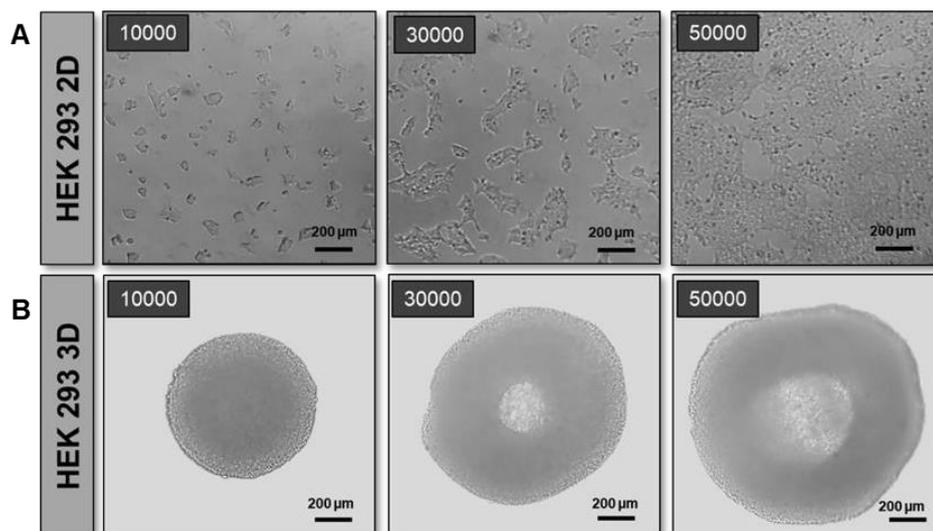
5.2 Caracterização dos esferoides

A produção dos esferoides foi realizada utilizando células em monocamadas de HEK-293 e SAOS-2 para avaliar a produção de modelos tridimensionais e assim serem caracterizadas. Através das micrografias obtidas com a técnica de microscopia óptica foi possível medir o diâmetro dos esferoides e, em seguida, aplicar a fórmula de volume para obtenção dos dados, assim como a fórmula de esfericidade.

5.2.1 Avaliação morfológica dos esferoides

Com as micrografias obtidas dos modelos celulares 2D (Figura 13A) e 3D (Figura 13B) foi possível comparar a diferença dos tipos de cultivo celular, assim como, observar modificações morfológicas entre elas. O modelo 2D se mantém espalhadas e aderidas às placas em que foram cultivadas, formando uma única camada celular. Ao contrário, os modelos 3D tendem a se unir formando um agregado tridimensional, o qual apresenta uma interação maior entre células, mimetizado de forma mais próxima o ambiente *in vivo*. Essa organização ocorre em função do uso da placa de fundo U recoberta com agarose a 1%, de modo que as células foram cultivadas possibilitando a interação entre células, desta forma possibilita a formação de uma estrutura tridimensional. Além disso, ao serem semeadas em números celulares diferentes e crescentes, elas demonstram um aumento gradativo do volume ocupado no espaço (Figura 13A e B), visivelmente, há um crescimento sugestivo do centro hipóxico demonstrados nos modelos de 30000 e 50000 células/poço (Figura 13B).

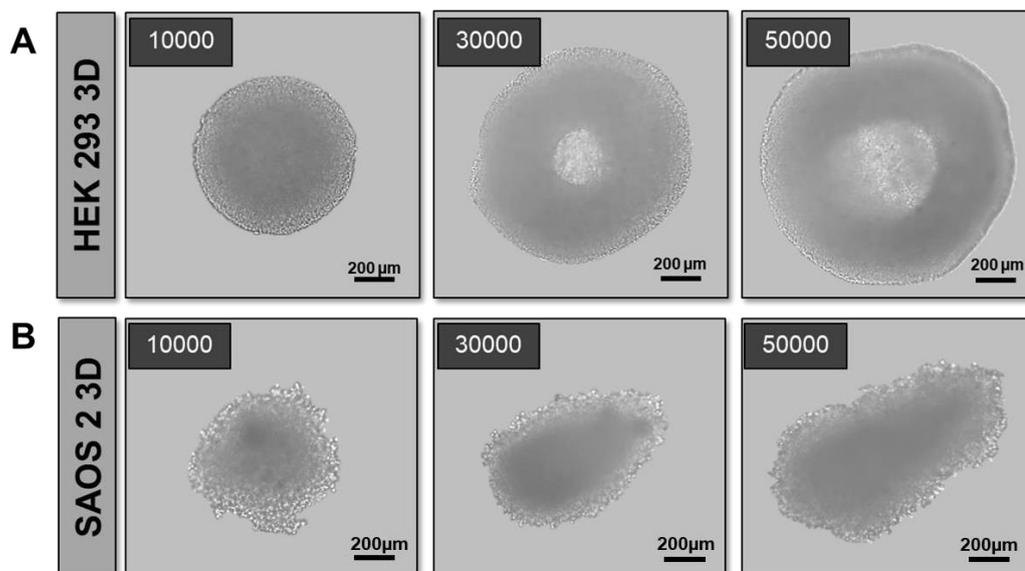
Figura 13: Comparação das células HEK293 de monocamada-2D (A) e esferoides-3D (B) visualizadas por micrografias ópticas.



Diferenciação das formas de cultivos onde em A indica as células em monocamada-2D que se apresentam individualizadas, em B indica os esferoides com agregado celular. Em A e B mostram números celulares crescentes.

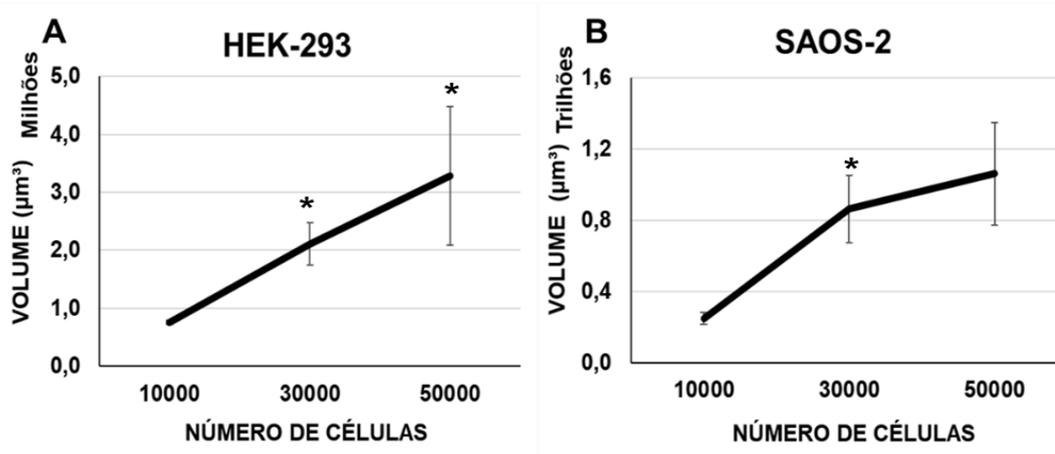
Foram também obtidas micrografias dos esferoides de linhagens celulares HEK293 e SAOS2 (Figura 14), possibilitando a determinação de escolha do tipo celular a ser utilizado no estudo, assim como, o número celular mais favorável para a exposição do teste de hipertermia magnética. A começar então, as visualizações dos esferoides de ambas as linhagens que apresentam um aumento de tamanho crescente com relação a densidade celular. Diante da avaliação morfológica e volumétrica dos esferoides, ao número celular de HEK-293 apresentou uma morfologia regular e esférica em todas as densidades (Figura 14A), com volume proporcional (Figura 14A) ao número de células, ou seja, quanto maior o número celular, maior o volume. Já os esferoides de SAOS2, apresentaram uma morfologia esférica apenas nos esferoides de 10000 células/poço, uma forma mais elipsoide nos demais (Figura 14B) e o volume proporcional ao número celular (Figura 15B).

Figura 14: Comparação dos esferoides de HEK293 (A) e SAOS2 (B) visualizadas por micrografias ópticas.



Micrografias comparativas da morfologia dos esferoides entre as linhagens HEK293 (A) que se apresentam com forma esférica em todas os esferoides e SAOS2 (B) que mostra um formato esférico apenas no esferoide de 10000 células/poço e elipsoide nos demais. Em esferoides de HEK293 apresentam centro hipóxico com do número celular (30000 e 50000 células/poço), já os esferoides de SAOS2 não apresentam.

Figura 15: Comparação do volume dos esferoides de HEK293 (A) e SAOS2 (B).



Gráficos mostram análise do crescimento volumétrico proporcional ao aumento do número celular em ambas as linhagens celulares. * $p < 0.05$ vs controle.

Desta forma, ao observar que os esferoides apresentaram morfologias distintas nas linhagens, foram realizadas avaliações de esfericidade para saber o quanto os esferoides são redondos, como modo de confirmação dos resultados anteriores. Os dados de esfericidade (Figura 16) obtidos mostraram que a razão dos raios das células

HEK293 apresentam valores mais próximos a 1,0 em todas os números celulares testados, ou seja, formato mais esférico (Figura 16A), assim como, mostraram menor variabilidade dos resultados obtidos nos esferoides de 10000 células/poço.

Quando a linhagem SAOS2 é comparada a HEK293, o resultado mostrado para os esferoides de 10000 células/poço é o que mais se aproxima de 1,0 e diminui em relação ao aumento do número celular (Figura 16B), corroborando os resultados mostrados nas micrografias, onde o aumento do número celular trouxe um formato mais elipsoide, ou seja, a não esfericidade dos esferoides de SAOS2. Mediante ao que foi dito, os esferoides de 10000 células/poço foram selecionados como o ideal para os experimentos a serem realizados com as NPs.

Figura 16: Análise da esfericidade dos esferoides das células HEK293 (A) e SAOS2 (B).

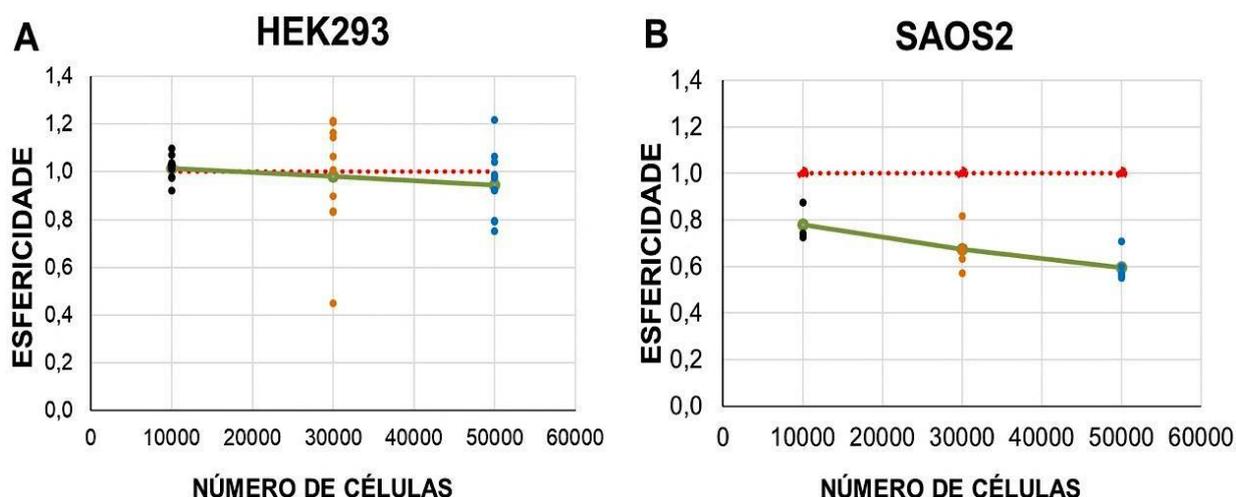


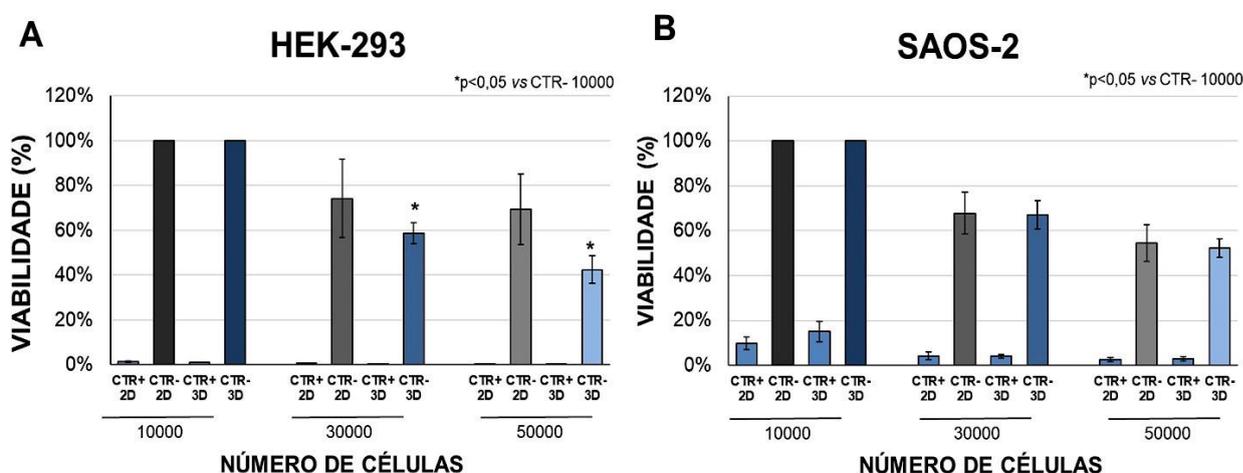
Gráfico de esfericidade dos esferoides HEK293 (A) que mostra maior esfericidade com valores mais próximo a 1,0 e menor variabilidade nos esferoides de 10000 células/poço e SAOS2 (B) mostra que apenas os esferoides de 10000 células/poço se aproximam da esfericidade. Onde a linha verde mostra a média da razão entre os raios dos esferoides e a linha pontilhada vermelha indica os valores de esfericidade.

5.2.2 Avaliação da viabilidade dos esferoides

Ainda em uma comparação entre as duas linhagens celulares, HEK293 e SAOS2, ao realizar o teste de viabilidade celular (MTT), os esferoides de HEK293 mostraram uma diminuição da viabilidade quando comparadas com as células em monocamada da mesma linhagem, apresentando uma queda expressiva da

viabilidade quando comparadas as células 2D. Em contrapartida, o teste de viabilidade em SAOS2 mostrou resultados que ambos os cultivos, 2D e 3D, não apresentaram diferença de viabilidade, porém apresentam uma diminuição à medida que aumenta o número de células (Figura 17). Mediante estes resultados, podemos confirmar a escolha dos esferoides de 10000 células/poço. Com os esferoides de 10000 células/poço há uma viabilidade significativa de 100% em ambas as linhagens celulares e formas de cultivo, comparado ao controle e os demais números celulares.

Figura 17: Comparação da viabilidade celular entre os esferoides de HEK293 (A) e SAOS2 (B).



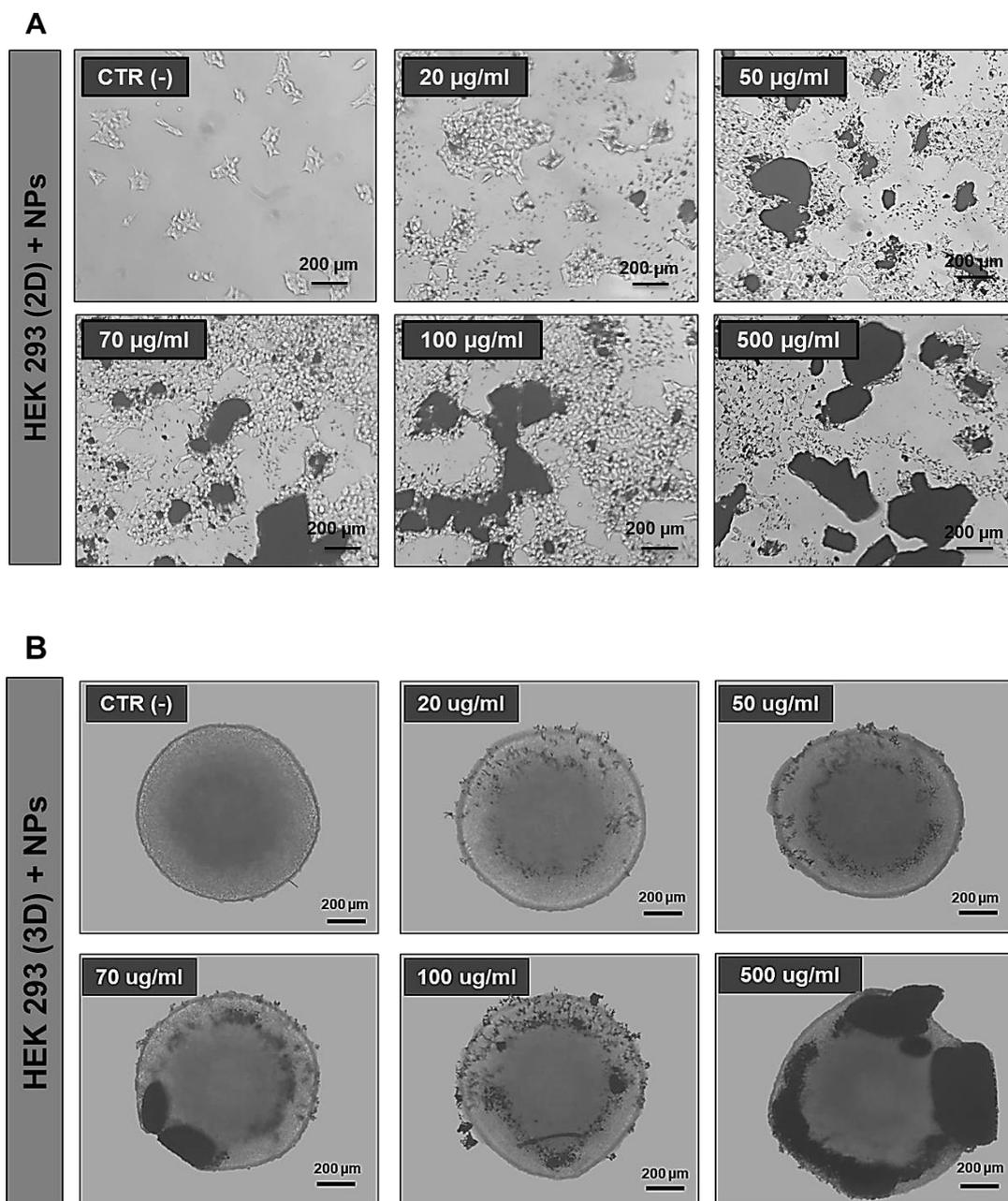
Os gráficos mostram a relação entre o número de células e a viabilidade. Na linhagem de HEK293 (A) se compara células em 2D (escalas de cinza) e 3D (escalas de azul) mostrando a viabilidade com diminuição expressiva apenas nas células 3D à medida que se aumento o número de células. Já na linhagem SAOS2 (B) a comparação entre 2D (escalas de cinza) e 3D (escalas de azul) não mostrou diferença de viabilidade entre os tipos de cultivo, mas apresentou decaimento relacionado ao aumento do número de células. Os resultados são a média de uma triplicata experimental independente. *p<0.05 vs controle.

5.3 Avaliação da interação das NPs de Fe@Fe₃O₄ nos esferoides

As micrografias obtidas dos modelos em monocamada e de esferoides de HEK-293 e SAOS-2 expostas às diferentes concentrações de NPs VIPs (20-50-70-100-500 µg/ml) mostraram internalização dose-dependente. As NPs se encontraram dispersas quando em contato com células em monocamada (Figura 18 A e 19 A), enquanto nos esferoides de células HEK293 se localizavam em agregados na periferia (Figura 18

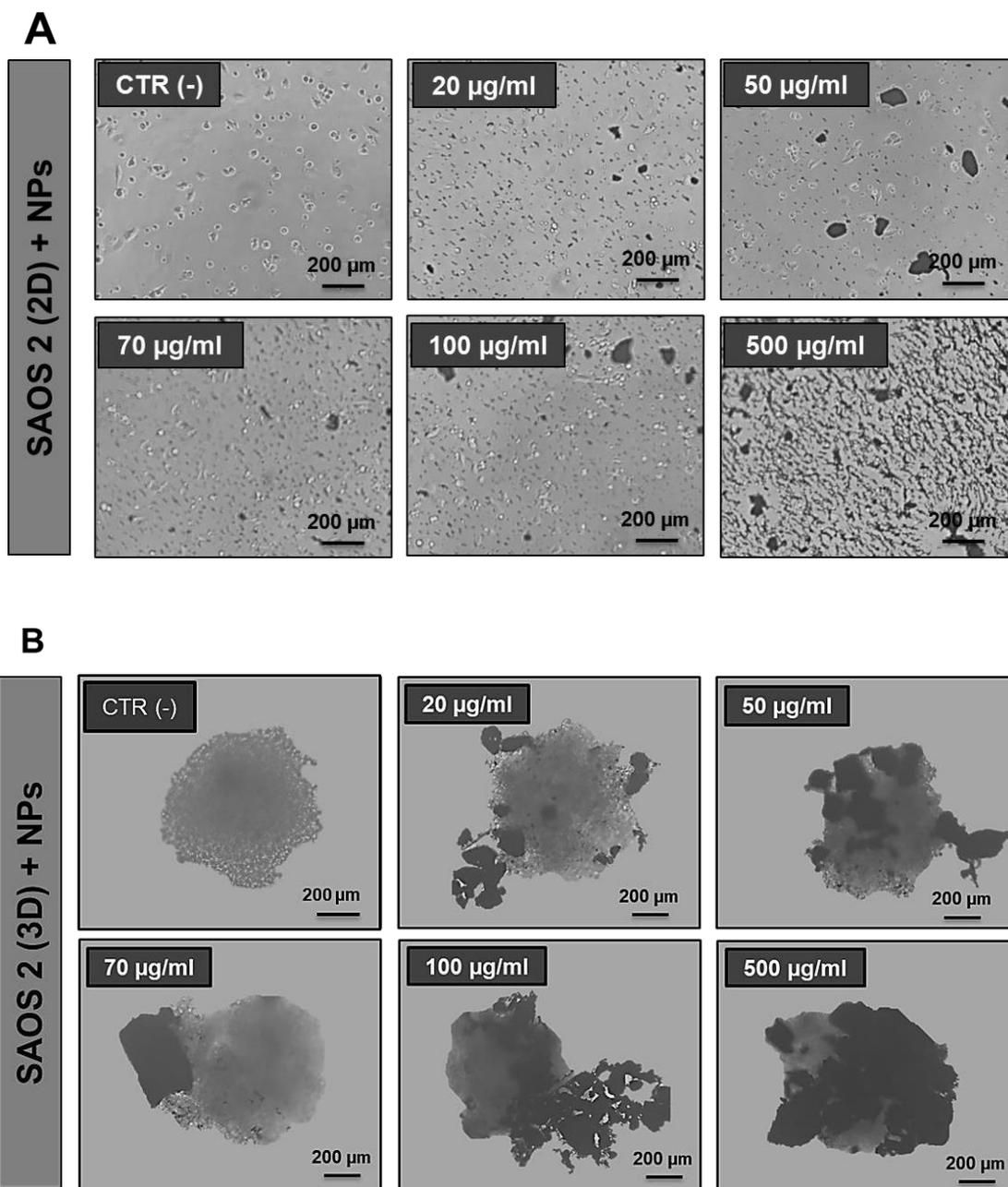
B) já nos esferoides de SAOS2 se agregavam ao seu redor de forma aleatória (Figura 19 B).

Figura 18: Comparação da internalização de células HEK-293 2D e 3D expostas às NPs VIPs



As NPs foram internalizadas de forma dose-dependente e encontravam-se dispersas em contato com as células em monocamada (A). Entretanto, nos esferoides (B), as NPs se apresentaram em agregados na periferia.

Figura 19: Comparação da internalização de células SAOS2 2D e 3D expostas às NPs VIPs



As NPs foram internalizadas de forma dose-dependente e encontravam-se dispersas em contato com as células em monocamada (A). Entretanto, nos esferoides (B), as NPs se apresentaram em agregados de forma aleatória.

5.4 Avaliação da viabilidade dos esferoides quando em contato com as NPs de Fe@Fe₃O₄

Para as etapas sucessivas foi necessário determinar a máxima concentração não citotóxica de NPs que será utilizada para realização dos ensaios de hipertermia magnética. Os modelos celulares 2D e 3D de células HEK293 e SAOS2 foram

expostos às concentrações crescentes de NPs de ferro VIPs (20-50-70-100-500 µg/ml) em um período de 24 horas. Foi mostrado que em nenhuma concentração exposta de NPs houve indução de morte celular quando comparadas com as células do controle positivo e negativo, determinando que a exposição não apresentou alteração significativa da viabilidade nos esferoides. Ainda, foi realizado o teste de absorvância junto ao ensaio de MTT utilizando um controle com a concentração de 100 µg/ml + DMSO, sem a presença dos sais de MTT para que pudéssemos identificar possíveis interferências de coloração das NPs. Não observamos interferência entre as NPs e o ensaio utilizando o MTT (Figura 20).

Figura 20: Citotoxicidade de NPs de ferro-magnetita após 24 horas de exposição em células HEK-293 e SAOS-2 2D e 3D avaliado com o teste de MTT.

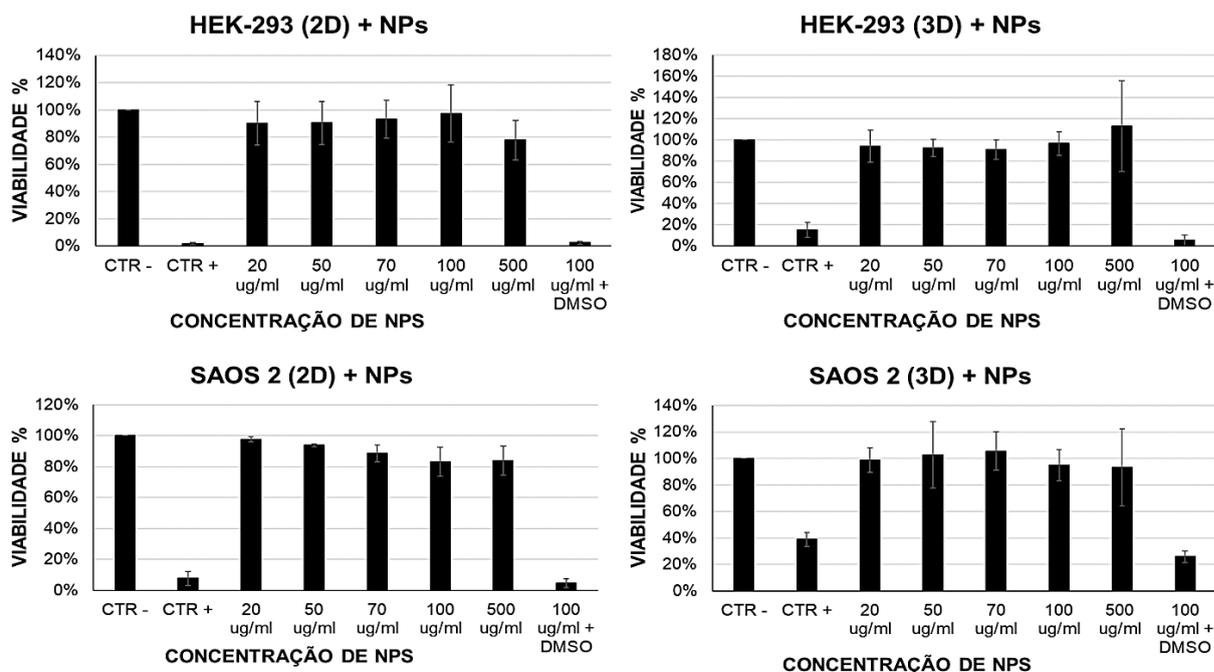


Gráfico da viabilidade celular das células HEK-293 e SAOS-2 com diferentes concentrações de NPs VIPs. Concentrações comparadas com o CTR - (células vivas), CTR + (células mortas) e a 100 µg/ml + DMSO por possíveis interferências com a coloração das NPs. Os resultados são a média da triplicata experimental. *p<0.05 vs controle.

6 DISCUSSÃO

O câncer é uma doença que apresenta uma alta taxa de mortalidade no mundo por decorrência da carência de tratamentos eficazes e específicos apenas às células

cancerosas, assim como diagnósticos tardios. A fim de definir uma nova abordagem terapêutica para o tratamento do câncer, a hipertermia magnética se tornou um grande destaque. Trata-se da técnica que utiliza NPs ferromagnéticas ou ferrimagnéticas, administradas aos tecidos tumorais e, conseqüentemente, internalizadas pelas células cancerosas para se obter um aquecimento controlado local. Desta forma, o objetivo final desta aplicação é a destruição dessas células em razão da maior sensibilidade a altas temperaturas, em comparação as células sadias que são mais resistentes. Neste estudo utilizamos NPs com um formato em anéis, pois apresentam maior e mais controlado aquecimento quando comparadas as NPs com formatos esféricos e avaliamos a possível toxicidade desta às células tumorais. Para esta avaliação utilizamos o modelo de cultivo tridimensional, os esferoides, pois melhor mimetiza o comportamento das células *in vivo*.

Inicialmente, as NPs utilizadas no estudo foram produzidas a partir de reações hidrotérmicas, técnica que permite a formação monitorada das mesmas, podendo chegar a altas temperaturas e a possibilidade de trabalhar com variedades de óxido de ferro (XIE *et al.*, 2018). Com essa metodologia foram obtidos nano-anéis de hematita, óxido de ferro não magnético, e em seguida, a redução a ferro-magnetita, formando nano-anéis magnéticos respondendo a presença de ímãs. Entretanto, para que as NPs sejam consideradas como parte de tratamento hipertérmico contra o câncer, elas devem possuir propriedades que permitam interações celulares e com o campo magnético. Sendo assim, devem apresentar absorção de energia para a produção de calor quando expostas ao campo magnético alternado, boa dispersão em soluções, serem internalizadas pelas células e baixa citotoxicidade (ICONARU *et al.*, 2012; HEREA *et al.*, 2018), permitindo um ambiente ideal para a aplicação da hipertermia magnética.

A síntese das NPs e a determinação das suas propriedades foram avaliadas a partir das técnicas de MEV e DRX. Ao observar as micrografias de MEV, podemos visualizar as NPs com um formato em nano-anéis mostrando integridade e interações entre elas. Diante disto, para que as NPs tenham seu efeito em um domínio de vórtex, elas precisam possuir um formato de anel completo (LIU *et al.*, 2019). Quando se compara às NPs esféricas, os nano-anéis apresentam uma magnetização muito mais controlada e conseqüentemente, o aquecimento (LIU *et al.*, 2019), o que nos deixa

motivados com resultados futuros de magnetização e tratamentos hipertérmicos. Inicialmente, as NPs precisam ter uma boa interação com as células, ou seja, serem capturadas por estas. Primeiramente, as NPs foram avaliadas em contato com meio de cultivo celular para melhor avaliação do seu potencial em meio similar ao biológico. Portanto, as análises feitas com DLS e Potencial Zeta mostraram que quando as NPs se encontram em contato com meio de cultivo elas tendem a aumentar seu tamanho devido à presença de proteínas adsorvidas. Desta forma, a boa dispersão e retração entre elas indicam que há a presença da formação de coroa proteica em sua superfície, principalmente a albumina. Com esses achados, as NPs passam a ser melhor reconhecida pelas células, apresentam boa estabilidade e melhor dispersão em meio, logo, corrobora com os resultados vistos por Fleddermann e colaboradores (FLEDDERMANN *et al.*, 2019).

A fim de avaliar a interação celular às NPs magnéticas, é imprescindível a realização de testes com linhagens celulares distintas e a definição da melhor forma de cultivo para todas as exposições. Em micrografias realizadas para a análise morfológica com o objetivo de diferenciar o cultivo, foi possível observar uma grande diferença entre as células 2D e 3D. Devido a forma em que elas são semeadas, o modelo 2D se apresenta em populações onde o contato célula-célula se dá pelas laterais e o contato célula matriz pela porção basal da célula. Por outro lado, o modelo 3D se organiza em agregados com ligações célula-célula ocorrendo em várias regiões do agrupamento celular não havendo interação com a matriz extracelular, desta forma, a esfera fica em suspensão no meio de cultivo. Com relação a estudos desenvolvidos com esse novo modelo celular, CHOI e colaboradores (2019) relatam que os modelos 3D estão mais próximas do comportamento *in vivo* com relação a conduta cancerígena mostrando resultados condizentes a realidade.

A análise das micrografias também permitiu observar um aumento do número celular, esse acontecimento é devido ao aumento de células cultivadas nos poços. Esse perfil foi visto tanto em modelos 2D quanto em 3D de células HEK293, corroborando os resultados de volume onde há um aumento crescente proporcional ao número celular. Nos modelos celulares 3D da linhagem HEK293, quando há um aumento no volume celular, maior é o aumento do centro hipóxico. Mas quando comparamos as duas linhagens utilizadas, HEK293 e SAOS, são mostrados

resultados distintos quanto ao centro hipóxico. Os esferoides de SAOS2 apresentam ausência do centro hipóxico devido a deformidades nas esferas celulares de 30000 e 50000 células/poço. Confirmando esse fato, o teste de esfericidade comparável entre as linhagens mostrou que quanto mais esférico, maior a probabilidade de se ter um centro hipóxico. Na literatura há diversos estudos realizados com cultivos tridimensionais, que mostram e confirmam que esse centro hipóxico é característico dos tecidos tumorais (LANGAN *et al.*, 2018; GODET *et al.*, 2019). É essa condição que leva a necrose de células e que, conseqüentemente, desencadeia a neovascularização tumoral *in vivo* levando a piora da doença, por decorrência do aumento da probabilidade de metástases tumorais (LANGAN *et al.*, 2018; GODET *et al.*, 2019; ROMA-RODRIGUES *et al.*, 2019). Nenhum estudo foi encontrado na literatura que mostrasse a realização dos modelos tridimensionais com células HEK-293 e pouco é descrito sobre as características dos modelos com células SAOS-2 para este modelo.

Com o tratamento de hipertermia magnética, é possível obter o aumento da temperatura utilizando NPs ferromagnéticas ou ferrimagnéticas para se ter como resultado a morte de células cancerosas a partir da aplicação de um campo magnético. Por este motivo, é de suma importância que todas as células que serão expostas a este tratamento estejam vivas, desta forma poderemos ter uma melhor comparação de morte celular e, com isso, a certeza de que a diminuição da viabilidade celular foi causada pelo tratamento submetido. E ao comparar a viabilidade das células HEK293 e SAOS2 mantidas em cultivo 2D e 3D foi possível confirmar os resultados da formação de centro hipóxico. A viabilidade das células HEK293 3D apresentou uma queda expressiva em comparação ao cultivo 2D, enquanto a linhagem SAOS2 apresentou a mesma viabilidade quando comparados os tipos de cultivo 2D e 3D. Além disso, quanto maior o número de células cultivadas, menor é a viabilidade dos esferoides. Dito isso, os achados mostram uma viabilidade de 100% quando as células foram cultivadas em 10000 células/poço. A partir desses resultados, para os testes de hipertermia, poderemos ter certeza de que as células de fato morreram devido ao tratamento hipertérmico.

Ao realizarmos a interação dos modelos celulares com as NPs para determinar a dose máxima não citotóxica, as imagens de interação mostram que as NPs visam

se infiltrar na borda dos esferoides. Esse sistema de cultivo apresenta uma provável internalização proporcional às doses de NPs a que são expostos, quanto maior a concentração de NPs, maior a quantidade incorporada aos esferoides. Podemos reparar que, além da internalização de ferro-magnetita, as mesmas se concentram na periferia dos esferoides não alcançando o centro. ABDOLAHINIA e colaboradores (2019) mostraram que as NPs não são internalizadas até o centro dos modelos celulares 3D devido a presença do meio hipóxico. No entanto, alguns estudos tem sido realizados a fim de melhorar a interação das NPs pelos esferoides, estes trabalhos mostraram que uma melhor interação das partículas está ligada à presença de cálcio e componentes da matriz extracelular (ABDOLAHINIA *et al.*, 2019; RAMOS-DOCAMPO *et al.*, 2019).

Em estudo realizado por LIU e seus colaboradores (2019) mostrou NPs de magnetita sendo utilizadas com um formato em nano-anéis sendo expostas aos modelos 2D de câncer mamário para implementação ao tratamento hipertérmico. E no presente estudo foi possível visualizar informações mais similares ao tecido *in vivo*, devido as interações que o modelo tridimensional proporciona. Os resultados obtidos pelo grupo mostraram que em várias concentrações de NPs, com um limite em 100 µg/ml, as células 2D se mantinham viáveis durante uma exposição de 24 horas. Com isso, não houve alterações significativas de morte celular, corroborando com os resultados vistos em nosso trabalho. Que, além das concentrações baixas de NPs, uma nova concentração também se torna possível para utilização na hipertermia magnética, a de 500 µg/ml devido ao estudo da interação com células tridimensionais. Inclusive, ao realizar testes com células de linhagens diferentes, as NPs apresentaram o mesmo comportamento com relação a viabilidade celular quando comparadas ao controle.

7 CONCLUSÃO

Este estudo mostrou que a técnica de síntese hidrotérmica das NPs seguida da redução em ferro-magnetita VIPs foi concluída com êxito, como confirmado pela caracterização utilizando as técnicas de MEV e DRX. Assim como as técnicas de DLS e Potencial Zeta que foi possível avaliar as interações com um meio similar ao biológico, tornando-as mais estáveis para o contato com os modelos celulares.

Os esferoides de HEK293 e SAOS2 mostraram uma melhor viabilidade e morfologia próxima a uma esfera em esferoides de 10000 células/poço, o que tornou este o modelo padrão para possíveis testes com hipertermia magnética.

Após a exposição dos esferoides durante 24 h às diferentes concentrações de NPs, os resultados de MTT mostrou que não há alteração significativa da viabilidade dos esferoides expostas a nenhuma das concentrações, quando comparadas ao controle. Isso indica que qualquer concentração pode ser utilizada para a aplicação do tratamento hipertérmico, inclusive a exposição da dose de 500 µg/ml.

Nossos resultados fornecem informações satisfatórias, onde as NPs VIPs não apontam indícios de citotoxicidade em células tridimensionais que, por sua vez, estão mais próximos ao comportamento *in vivo*. Com esses efeitos possibilita a escolha de diferentes doses para o tratamento de hipertermia magnética.

9 REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

ABDOLAHINIA, E. D. et al. Enhanced penetration and cytotoxicity of metformin and collagenase conjugated gold nanoparticles in breast cancer spheroids. **Life Sciences**, v. 231, n. April, p. 116545, 2019.

ABU-BAKR, A. F.; ZUBAREV, A. Subject Areas: Author for correspondence: Effect of interparticle interaction on magnetic hyperthermia: **homogeneous spatial distribution of the particles**. p. 1–11, 2019.

ADAMIANO, A. et al. Magnetic calcium phosphates nanocomposites for the intracellular hyperthermia of cancers of bone and brain. **Nanomedicine**, v. 14, n. 10, p. 1267–1289, 2019.

ALBERTS, B. et al. **Analisando células, moléculas e sistemas**. [s.l.: s.n.].

BAÑOBRE-LÓPEZ, M. et al. Magnetic nanoparticle-based hyperthermia for cancer treatment. **Reports of Practical Oncology and Radiotherapy**, v. 18, n. 6, p. 397–400, 2013.

BARROW, M. et al. SPIONs for cell labelling and tracking using MRI: Magnetite or maghemite? **Biomaterials Science**, v. 6, n. 1, p. 101–106, 2018.

BEIK, J. et al. Nanotechnology in hyperthermia cancer therapy: From fundamental principles to advanced applications. **Journal of Controlled Release**, v. 235, p. 205–221, 2016.

BERGENHEIM, F. et al. A fully defined 3D matrix for ex vivo expansion of human colonic organoids from biopsy tissue. **Biomaterials**, v. 262, n. June, p. 120248, 2020.

CASTIAUX, A. D. et al. Review of 3D cell culture with analysis in microfluidic systems. **Analytical Methods**, v. 11, n. 33, p. 4220–4232, 2019.

CEN, C. et al. Improving Magnetofection of Magnetic Polyethylenimine Nanoparticles into MG-63 Osteoblasts Using a Novel Uniform Magnetic Field. **Nanoscale Research Letters**, v. 14, 2019.

CHOI, J. W. et al. A cancer spheroid array chip for selecting effective drug. **Micromachines**, v. 10, n. 10, p. 1–15, 2019.

CO, J. Y. et al. Controlling Epithelial Polarity: A Human Enteroid Model for Host-Pathogen Interactions. **Cell Reports**, v. 26, n. 9, p. 2509- 2520.e4, 2019.

FARZIN, A. et al. Comparative evaluation of magnetic hyperthermia performance and biocompatibility of magnetite and novel Fe-doped hardystonite nanoparticles for potential bone cancer therapy. **Materials Science and Engineering C**, v. 98, p. 930–938, 2019.

FLEDDERMANN, J. et al. Distribution of sio 2 nanoparticles in 3D liver microtissues. **International Journal of Nanomedicine**, v. 14, p. 1411–1431, 2019.

GIUSTINI, A. J. et al. Magnetic Nanoparticle Hyperthermia in Cancer Treatment. **Nano Life**, v. 1, p. 1–23, 2013.

GODET, I. et al. Fate-mapping post-hypoxic tumor cells reveals a ROS-resistant phenotype that promotes metastasis. **Nature Communications**, v. 10, n. 1, p. 1–18, 2019.

GRASSET, F. et al. Magnetic nanoparticle design for medical diagnosis and therapy. **Journal of Materials Chemistry**, v. 14, n. 14, p. 2161–2175, 2004.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: The next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646–674, 2011.

HEREA, D. D. et al. Comparative effects of magnetic and water-based hyperthermia treatments on human osteosarcoma cells. **International Journal of Nanomedicine**, v. 13, p. 5743–5751, 2018.

IARC. **IARC**. Disponível em: <<https://gco.iarc.fr/>>.

ICONARU, S. L. et al. Synthesis and characterization of polysaccharide-maghemite composite nanoparticles and their antibacterial properties. **Nanoscale Research Letters**, v. 7, n. 1, p. 1–8, 2012.

LANGAN, L. M. et al. Spheroid size does not impact metabolism of the β -blocker propranolol in 3D intestinal fish model. **Frontiers in Pharmacology**, v. 9, n. AUG, p. 1–10, 2018.

LIU, X. et al. Ferrimagnetic Vortex Nanoring-Mediated Mild Magnetic Hyperthermia Imparts Potent Immunological Effect for Treating Cancer Metastasis. **ACS Nano**, v. 13, n. 8, p. 8811–8825, 2019.

LIU, X. L. et al. Magnetic Vortex Nanorings: A New Class of Hyperthermia Agent for Highly Efficient in Vivo Regression of Tumors. **Advanced Materials**, v. 27, n. 11, p. 1939–1944, 2015.

MAHMOUDI, K. et al. Magnetic hyperthermia therapy for the treatment of glioblastoma: a review of the therapy's history, efficacy and application in humans. **International Journal of Hyperthermia**, v. 34, n. 8, p. 1316–1328, 2018.

MONSERRAT, B.; VILLAR, G. artigo hipertermia magnética. [s.d.].

NEHOFF, H. et al. Nanomedicine for drug targeting: Strategies beyond the enhanced permeability and retention effect. **International Journal of Nanomedicine**, v. 9, n. 1, p. 2539–2555, 2014.

NIELSEN, O. S. et al. A future for hyperthermia in cancer treatment? **European Journal of Cancer**, v. 37, n. 13, p. 1587–1589, 2001.

OSSEIRAN, S. et al. Longitudinal monitoring of cancer cell subpopulations in monolayers, 3D spheroids, and xenografts using the photoconvertible dye DiR. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–10, 2019.

RAMOS-DOCAMPO, M. A. et al. Microswimmers with Heat Delivery Capacity for 3D Cell Spheroid Penetration. **ACS Nano**, v. 13, n. 10, p. 12192–12205, 2019.

ROMA-RODRIGUES, C. et al. Targeting tumor microenvironment for cancer therapy. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 4, 2019.

SÁNCHEZ-CABEZAS, S. et al. Combining magnetic hyperthermia and dual T_1/T_2 MR imaging using highly versatile iron oxide nanoparticles. **Dalton Transactions**, 2019.

SOUZA, W. et al. The two faces of titanium dioxide nanoparticles bio-camouflage in 3D bone spheroids. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–14, 2019.

TIETZE, S. et al. Spheroid Culture of Mesenchymal Stromal Cells Results in Morphological Properties Appropriate for Improved Microcirculation. **Advanced Science**, v. 6, n. 8, 2019.

XIE, W. et al. Shape-, size- and structure-controlled synthesis and biocompatibility of iron oxide nanoparticles for magnetic theranostics. **Theranostics**, v. 8, n. 12, p. 3284–3307, 2018.

ZANONI, M. et al. 3D tumor spheroid models for in vitro therapeutic screening: A systematic approach to enhance the biological relevance of data obtained. **Scientific Reports**, v. 6, n. November 2015, p. 1–11, 2016.