

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE QUÍMICA DE SÃO CARLOS

LARISSA DANIELA DIAS RAFAEL

Nanopartículas Biomiméticas Carregadas com Doxorrubicina para Tratamento do Câncer de  
Pâncreas e Pulmão

São Carlos

2025

LARISSA DANIELA DIAS RAFAEL

Nanopartículas Biomiméticas Carregadas com Doxorrubicina para Tratamento do Câncer de  
Pâncreas e Pulmão

Dissertação apresentada ao Instituto de Química de São Carlos  
da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos para  
obtenção do Trabalho de Conclusão de Curso

Área de Concentração: Física da Matéria Condensada

Orientador: Prof. Dr. Valtencir Zucolotto

São Carlos

2025

### Dedicatória

Dedico este trabalho, com todo o meu carinho, às pessoas que caminharam comigo e tornaram essa jornada possível e mais leve.

Aos meus pais, Claudete e Laércio, por serem meu alicerce, por cada palavra de incentivo, cada gesto de amor e por acreditarem em mim até nos momentos em que eu duvidei. Vocês são meu exemplo e minha força. Obrigada por apoiarem meus sonhos, e embarcarem comigo em todas as decisões que eu tomo.

Ao meu irmão Leandro, pela parceria de vida, pelas conversas que acalmam e pela presença constante, mesmo nos silêncios das rotinas agitadas.

À minha família, que sempre torceu por mim, em especial ao meu primo Renan, cuja ausência é sentida todos os dias. Que essa conquista também seja sua, onde quer que esteja. Sua memória me inspira a seguir com coragem e amor.

Às minhas amigas, Isabela, Beatriz, Mariana, Alini, Marília, Lívia e Bruna por tornarem os dias mais leves com risadas, apoio, cafés e abraços, vocês foram luz nos momentos mais desafiadores.

E ao grupo de pesquisa GNANO, por me acolher, me inspirar e me mostrar que ciência também se faz com paixão, amizade e trabalho em equipe.

A todos vocês, meu amor e minha eterna gratidão.

## RESUMO

O câncer, uma das principais causas de morte em todo o mundo, é caracterizado pelo crescimento descontrolado de células anormais e pela sua capacidade de invadir tecidos e formar metástases. Apesar dos avanços terapêuticos, muitos tipos de câncer ainda apresentam alta taxa de mortalidade, principalmente devido à resistência aos tratamentos convencionais. Nesse cenário, estratégias baseadas em nanotecnologia têm ganhado destaque por oferecerem maior especificidade e eficácia. Neste estudo, investigamos a citotoxicidade de nanopartículas de hidroxiapatita carregadas com doxorubicina (HA-DOX) desenvolvidas pelo grupo GNANO, um sistema ainda não testado *in vitro*. O primeiro modelo experimental adotado foi o câncer de pâncreas, utilizando a linhagem tumoral PANC-1. No entanto, os ensaios de viabilidade celular (MTT) indicaram baixa eficácia citotóxica nas células tumorais pancreáticas, além de efeitos adversos em células saudáveis, o que limitou o potencial da formulação nesse contexto. Diante desses resultados e levando em consideração a experiência prévia do grupo de pesquisa com câncer de pulmão, o estudo foi redirecionado para essa neoplasia, adotando a linhagem A549 como modelo. O câncer de pulmão é uma das formas mais letais de câncer, com elevada incidência, diagnóstico tardio e baixa resposta aos tratamentos atuais. Nesse novo modelo, a avaliação da citotoxicidade das nanopartículas HA-DOX mostrou-se promissora, configurando-se como uma das principais contribuições deste estudo. Com base nesses resultados, buscamos aprimorar o sistema por meio do desenvolvimento de nanopartículas biomiméticas, revestidas com membranas celulares específicas. Essa estratégia visou aumentar a seletividade tumoral, melhorar a biocompatibilidade, prolongar o tempo de circulação no organismo e reduzir a ativação do sistema imune. A eficácia dessas nanopartículas foi avaliada em ensaios *in vitro* com células tumorais pulmonares, observando parâmetros como viabilidade celular, indução de apoptose e internalização das partículas. A segurança desse sistema também foi validada por meio de testes com células pulmonares saudáveis.

## ABSTRACT

Cancer, one of the leading causes of death worldwide, is characterized by the uncontrolled growth of abnormal cells and their ability to invade tissues and form metastases. Despite therapeutic advances, many types of cancer still present high mortality rates, mainly due to resistance to conventional treatments. In this context, nanotechnology-based strategies have gained prominence for offering greater specificity and efficacy. In this study, we investigated the cytotoxicity of hydroxyapatite nanoparticles loaded with doxorubicin (HA-DOX), developed by the GNANO group—a system not yet tested *in vitro*. The first experimental model adopted was pancreatic cancer, using the PANC-1 tumor cell line. However, cell viability assays (MTT) indicated low cytotoxic efficacy in pancreatic tumor cells, in addition to adverse effects in healthy cells, which limited the potential of the formulation in this context. Given these results and considering the research group's previous experience with lung cancer, the study was redirected to this neoplasm, adopting the A549 cell line as a model. Lung cancer is one of the most lethal forms of cancer, with high incidence, late diagnosis, and poor response to current treatments. In this new model, the cytotoxicity evaluation of HA-DOX nanoparticles proved promising, representing one of the main contributions of this study. Based on these results, we aimed to improve the system through the development of biomimetic nanoparticles coated with specific cell membranes. This strategy aimed to increase tumor selectivity, improve biocompatibility, prolong circulation time in the body, and reduce immune system activation. The efficacy of these nanoparticles was evaluated in *in vitro* assays using lung tumor cells, assessing parameters such as cell viability, apoptosis induction, and particle internalization. The safety of this system was also validated through tests with healthy lung cells.

## SUMÁRIO

### **1. INTRODUÇÃO**

- 1.1. Câncer de Pâncreas
- 1.2. Câncer de Pulmão
- 1.3. Tratamentos Convencionais
- 1.4. Tratamentos Alternativos
- 1.5. Nanopartículas para Terapia do Câncer
- 1.6. Nanosistemas Biomiméticos
- 1.7. Justificativa

### **2. OBJETIVOS**

- 2.1. Objetivos gerais
- 2.2. Objetivos Específicos

### **3. METODOLOGIA**

- 3.1. Linhagens Celulares
  - 3.1.1. *Cultivo de linhagem celular*
- 3.2. Síntese das Nanopartículas de HA
- 3.3. Extração de Membranas Celulares (MBs)
  - 3.3.1. *Recobrimento das nanopartículas HA-DOX com as membranas celulares*
- 3.4. Caracterização das nanopartículas HA-DOX revestidas com membrana
  - 3.4.1. *Espalhamento dinâmico de luz (DLS) e potencial Zeta (ZP)*
  - 3.4.2. *Análise de Rastreamento de Nanopartículas (NTA)*
  - 3.4.3. *Quantificação de proteína das vesículas de MBs*
- 3.5. Análise da atividade antitumoral das nanopartículas.
  - 3.5.1. *Viabilidade Celular pelo método MTT*
  - 3.5.2. *Citometria de fluxo*

### **4. RESULTADOS E DISCUSSÕES**

- 4.1. Extração da membrana celular da linhagem PANC-1
  - 4.1.1. *Espalhamento dinâmico de luz (DLS) e potencial Zeta (ZP)*
  - 4.1.2. *Curva de Calibração da proteína BCA*
- 4.2. Extração da membrana celular da linhagem A549
  - 4.2.1. *Espalhamento dinâmico de luz (DLS) e potencial Zeta (ZP)*
  - 4.2.2. *Curva de Calibração da proteína BCA*

4.3. Recobrimento das nanopartículas HA-DOX com as membranas celulares da PANC-1 e A549

4.4. Caracterização das nanopartículas de HA-DOX revestidas com membrana da linhagem PANC-1

4.4.1. *Espalhamento dinâmico de luz (DLS) e potencial zeta (ZP)*

4.4.2. *Análise de Rastreamento de Nanopartículas (NTA)*

4.5. Caracterização das nanopartículas de HA-DOX revestidas com membrana da linhagem A549

4.5.1. *Espalhamento dinâmico de luz (DLS) e potencial zeta (ZP)*

4.5.2. *Análise de Rastreamento de Nanopartículas (NTA)*

4.6. Análise da atividade antitumoral das nanopartículas na linhagem PANC-1

4.6.1. *Viabilidade Celular pelo método MTT*

4.7. Análise da atividade antitumoral das nanopartículas na linhagem A549.

4.7.1. *Viabilidade Celular pelo método MTT*

4.7.2. *Citometria de Fluxo*

## **5. CONCLUSÕES**

## **6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1.Câncer de Pâncreas

O câncer de pâncreas, particularmente o adenocarcinoma ductal pancreático (PDAC), é uma das neoplasias mais letais da atualidade. Embora represente aproximadamente 3% de todos os casos de câncer, ele é responsável por cerca de 7% das mortes relacionadas à doença, destacando sua elevada taxa de mortalidade (WENZEL et al., 2025). A taxa de sobrevida em cinco anos permanece inferior a 15%, principalmente devido ao diagnóstico tardio, progressão agressiva e resistência aos tratamentos disponíveis (SHERPALLY; MANNE, 2025).

O diagnóstico precoce é raro, uma vez que os sintomas geralmente surgem em estágios avançados. Consequentemente, mais de 80% dos casos são detectados quando já há envolvimento metastático ou localmente avançado, limitando as opções terapêuticas curativas (WENZEL et al., 2025). Os principais fatores de risco incluem idade avançada, sexo masculino, tabagismo, consumo excessivo de álcool, obesidade, diabetes mellitus, pancreatite crônica e histórico familiar da doença (MUKUND et al., 2024). Essa baixa taxa de sobrevida está diretamente relacionada a fatores como diagnóstico tardio, resistência intrínseca aos tratamentos convencionais, alta capacidade de metastatização e uma microestrutura tumoral complexa, caracterizada por um estroma denso e uma vascularização deficiente.(BOIX-MONTESINOS et al., 2021; RAHIB et al., 2014).

Do ponto de vista molecular, mutações nos genes KRAS, TP53, CDKN2A e SMAD4 são frequentemente observadas e desempenham um papel crucial na carcinogênese pancreática (YING et al., 2016). Em resposta à complexidade biológica do PDAC, pesquisas recentes têm focado no desenvolvimento de terapias direcionadas, como os inibidores da mutação KRAS-G12C, bem como imunoterapias personalizadas, incluindo vacinas baseadas em neoantígenos e células CAR-T (SARFRAZ; ANWAR, 2024; TIRPE et al., 2024). Além disso, ferramentas de inteligência artificial vêm sendo exploradas para melhorar o diagnóstico precoce e a estratificação prognóstica dos pacientes (MUKUND et al., 2024).

Apesar desses avanços promissores, o câncer de pâncreas ainda representa um dos maiores desafios da oncologia moderna, exigindo contínuos investimentos em pesquisa para a descoberta de biomarcadores precoces, estratégias terapêuticas mais eficazes e melhores desfechos clínicos

### 1.2.Câncer de Pulmão



O câncer de pulmão é uma das principais causas de mortalidade relacionada ao câncer em todo o mundo, representando cerca de 18% de todas as mortes por neoplasias malignas, segundo dados da Organização Mundial da Saúde (OMS) (WHO, 2020). Em 2022, foram registrados aproximadamente 2,48 milhões de novos casos e 1,8 milhão de óbitos relacionados à doença, consolidando-a como o câncer mais diagnosticado e a principal causa de morte por câncer (GUO et al., 2024). O câncer de pulmão é uma neoplasia maligna caracterizada pelo crescimento desordenado e autônomo de células epiteliais no tecido pulmonar, frequentemente associado à capacidade de invasão local e formação de metástases à distância. Ele é amplamente reconhecido por sua heterogeneidade clínica, molecular e histopatológica, o que impacta diretamente na abordagem diagnóstica e terapêutica (HERBST et al., 2018). Suas características clínicas e moleculares variam de acordo com o tipo histológico, o que influencia diretamente no comportamento biológico do tumor, na resposta ao tratamento e no prognóstico (DUMA; SANTANA-DAVILA; MOLINA, 2019).

Apresenta-se, na maioria das vezes, de forma assintomática em seus estágios iniciais. Quando os sintomas surgem, são geralmente inespecíficos, como tosse persistente, dor torácica, dispneia e perda de peso, o que dificulta o diagnóstico precoce (HIRSCH et al., 2017). A detecção geralmente ocorre em estágios avançados da doença, o que contribui para o seu alto índice de mortalidade. Do ponto de vista molecular, diversas alterações genéticas são observadas, como mutações em *KRAS*, *EGFR*, *ALK*, entre outras, que têm se tornado alvos terapêuticos importantes na abordagem personalizada da doença (LADANYI; PETERSON, 2020).

Do ponto de vista histológico, o câncer de pulmão é geralmente classificado em dois grandes grupos: o carcinoma de células não pequenas (NSCLC – *non-small cell lung cancer*) e o carcinoma de pequenas células (SCLC – *small cell lung cancer*). O NSCLC representa aproximadamente 85% dos casos e inclui subtipos como o adenocarcinoma, o carcinoma de células escamosas e o carcinoma de grandes células. Já o SCLC, responsável por cerca de 15% dos casos, apresenta crescimento mais agressivo e maior potencial metastático (TRAVIS et al., 2015). O NSCLC compreende subtipos como o adenocarcinoma, frequentemente localizado nas regiões periféricas dos pulmões e associado a mutações em genes como *EGFR* e *ALK*; o carcinoma de células escamosas, geralmente central e relacionado ao tabagismo; e o carcinoma de grandes células, menos comum e mais indiferenciado (HERBST et al., 2018).

A agressividade biológica, a heterogeneidade tumoral e a propensão à metástase precoce conferem ao câncer de pulmão um dos piores prognósticos entre os cânceres sólidos, com taxa de sobrevida em 5 anos inferior a 20% em estágios avançados (AMERICAN CANCER

SOCIETY, 2023). Fatores de risco bem estabelecidos para o câncer de pulmão incluem o tabagismo, que está presente em cerca de 85% dos casos, exposição a poluentes ambientais e ocupacionais, além de predisposição genética (SIEGEL et al., 2023). O diagnóstico precoce ainda representa um desafio, uma vez que os sintomas costumam surgir apenas em estágios avançados da doença.

### 1.3. Tratamentos Convencionais

O câncer de pâncreas e o câncer de pulmão estão entre as principais causas de mortalidade por neoplasias malignas no mundo, caracterizados por alta letalidade e baixa taxa de sobrevida a longo prazo, especialmente quando diagnosticados em estágios avançados (GUO et al., 2024). Os tratamentos convencionais continuam sendo os pilares principais do manejo oncológico, com variações dependendo do estágio da doença, tipo histológico e condição clínica do paciente.

O adenocarcinoma ductal pancreático representa mais de 90% dos casos de câncer pancreático. Em pacientes com doença localizada e ressecável, a cirurgia que geralmente é o procedimento de *whipple*, é o tratamento de escolha, frequentemente seguida de quimioterapia adjuvante com agentes como gemcitabina ou FOLFIRINOX (CONROY et al., 2011; ETTINGER et al., 2021). Para tumores localmente avançados ou metastáticos, a quimioterapia paliativa com FOLFIRINOX ou gemcitabina combinada com nab-paclitaxel tem demonstrado aumento da sobrevida mediana em comparação à gemcitabina isolada (CONROY et al., 2011; VON HOFF et al., 2013).

A radioterapia também é utilizada em contextos específicos, especialmente para controle local da doença em casos não ressecáveis. A radioterapia estereotáxica (SBRT) tem sido avaliada por sua capacidade de reduzir o volume tumoral com menor toxicidade, embora sua eficácia definitiva ainda seja debatida (GILLEN et al., 2010).

O câncer de pulmão que representa um dos principais desafios terapêuticos da oncologia moderna, devido à sua elevada incidência, agressividade e frequência de diagnóstico em estágios avançados. O manejo terapêutico dessa neoplasia depende principalmente do tipo de tumor, podendo ser carcinoma de não pequenas células (NSCLC) ou carcinoma de pequenas células (SCLC), além disso o do estágio da doença também é um fator determinante. Os tratamentos convencionais incluem cirurgia, quimioterapia e radioterapia, sendo utilizados isoladamente ou em combinação, conforme a extensão do tumor e as condições clínicas do paciente (HERBST et al., 2018; DUMA et al., 2019). A cirurgia é a abordagem preferencial

para pacientes com NSCLC em estágios iniciais (I e II), sendo a lobectomia pulmonar o procedimento mais indicado, com maior taxa de cura quando combinada com linfadenectomia (HOWINGTON et al., 2013). Em estágios mais avançados, a cirurgia pode ser utilizada em associação com quimioterapia adjuvante ou neoadjuvante (PETERS et al., 2012).

A quimioterapia sistêmica é um dos pilares no tratamento do câncer de pulmão, especialmente em estágios localmente avançados ou metastáticos. Nos casos de NSCLC, os esquemas quimioterápicos mais comuns envolvem combinações de derivados da platina, como cisplatina ou carboplatina, com agentes como paclitaxel, docetaxel, pemetrexede ou gemcitabina, a depender do subtipo histológico (NCCN, 2024; SCAGLIOTTI et al., 2008). Para o SCLC, que possui alta taxa de crescimento e resposta inicial à quimioterapia, o regime padrão consiste na combinação de cisplatina ou carboplatina com etoposídeo (ØTERLIND, 2001).

A radioterapia é frequentemente empregada como tratamento para pacientes inoperáveis ou como complemento à quimioterapia, principalmente em SCLC limitado, onde a combinação quimiorradioterápica demonstrou aumento na sobrevida (GOMEZ et al., 2019). Em estágios avançados, a radioterapia também exerce papel paliativo, aliviando sintomas como dor óssea, obstrução brônquica e metástases cerebrais.

Apesar do surgimento de terapias-alvo e imunoterapias nos últimos anos, os tratamentos convencionais continuam sendo amplamente utilizados, sobretudo em pacientes que não apresentam mutações acionáveis ou não são elegíveis para novas abordagens terapêuticas. A compreensão detalhada dos esquemas tradicionais é, portanto, essencial para um planejamento terapêutico eficaz e individualizado.

#### 1.4. Tratamentos Alternativos

O câncer de pâncreas e o câncer de pulmão figuram entre os tipos mais agressivos e letais de neoplasias malignas, representando um grande desafio clínico devido à detecção tardia, rápida progressão tumoral e resposta limitada aos tratamentos convencionais. Segundo dados do *American Cancer Society*, a taxa de sobrevida em cinco anos permanece abaixo de 11% para o câncer de pâncreas e cerca de 23% para o câncer de pulmão, refletindo a necessidade urgente por novas abordagens terapêuticas (SIEGEL et al., 2023).

Nesse contexto, terapias alternativas e complementares vêm sendo cada vez mais investigadas como estratégias adjuvantes. Fitoterápicos, compostos naturais e práticas da medicina tradicional chinesa, como a acupuntura, têm demonstrado efeitos promissores tanto na atividade antitumoral quanto no alívio de sintomas associados ao tratamento oncológico,

incluindo dor, náuseas e fadiga (ANDREWS, 2009; KAY GARCIA et al., 2013; REN et al., 2019).

Além disso, o manejo da dor é uma prioridade no cuidado paliativo de pacientes com câncer avançado. Abordagens integrativas como acupuntura, estimulação nervosa elétrica transcutânea (TENS), e técnicas mente-corpo (como meditação e relaxamento guiado) têm sido empregadas como coadjuvantes aos analgésicos convencionais, com resultados positivos na redução da dor crônica e na melhora da qualidade de vida (FACTS, 2013; MAINDET et al., 2019) .

Outra frente de inovação terapêutica é o uso de nanotecnologia na medicina oncológica. As nanopartículas oferecem vantagens únicas, como a entrega seletiva de fármacos diretamente ao microambiente tumoral, aumento da eficácia terapêutica e redução dos efeitos colaterais sistêmicos. No câncer de pâncreas, nanopartículas carregadas com curcumina, gemcitabina ou ácido betulínico têm mostrado potencial para melhorar a absorção e a biodisponibilidade desses compostos (BISHAYEE; KAMAL, 2019; MATUO et al., 2010). No câncer de pulmão, lipossomas, dendrímeros e nanopartículas poliméricas vêm sendo investigadas como veículos para fármacos quimioterápicos, imunoterapias e agentes fotodinâmicos (PEER et al., 2007).

Essas abordagens emergentes, quando integradas ao tratamento convencional, apontam para um modelo mais holístico e personalizado de cuidado oncológico, que busca não apenas combater o tumor, mas também mitigar o sofrimento físico e emocional do paciente.

### 1.5. Nanopartículas para Terapia do Câncer

Apesar dos avanços na detecção precoce e nas terapias convencionais, muitas dessas abordagens ainda enfrentam limitações significativas, incluindo baixa seletividade, efeitos colaterais sistêmicos e resistência tumoral, principalmente quando há metástase. Nesse cenário, a nanotecnologia tem emergido como uma estratégia promissora para superar essas barreiras, oferecendo soluções inovadoras para o diagnóstico e tratamento do câncer.

As nanopartículas (NPs) são estruturas com dimensões entre 1 e 100 nanômetros, capazes de transportar agentes terapêuticos de forma controlada e direcionada. Sua aplicação na oncologia tem se destacado especialmente na entrega seletiva de fármacos, melhoria da biodisponibilidade, redução da toxicidade sistêmica e potencial para liberação controlada de medicamentos (BOBO et al., 2016; PELAZ et al., 2017). Entre os tipos mais estudados estão os lipossomas, nanopartículas poliméricas, nanocápsulas, dendrímeros e nanopartículas metálicas, como as de ouro e prata.

Um dos principais mecanismos que favorecem o uso de nanopartículas no tratamento do câncer é o chamado efeito de permeabilidade e retenção aumentada (EPR), que permite o acúmulo preferencial dessas partículas em tecidos tumorais devido à vascularização anormal e à drenagem linfática deficiente característica dos tumores sólidos (MAEDA; NAKAMURA; FANG, 2013). Além disso, o desenvolvimento de nanopartículas funcionalizadas com anticorpos, peptídeos ou ligantes específicos tem permitido o direcionamento ativo aos receptores superexpressos em células tumorais, ampliando a eficácia terapêutica (PEER et al., 2007).

Diversos sistemas baseados em nanopartículas já foram aprovados para uso clínico, como o Doxil® (doxorubicina lipossomal) e o Abraxane® (paclitaxel ligado à albumina), demonstrando benefícios significativos no tratamento de câncer de mama, ovário, pulmão e pâncreas (KASIMIR-BAUER et al., 2020). Além disso, novas abordagens vêm sendo desenvolvidas, como nanopartículas para entrega de RNA mensageiro (mRNA), sistemas para terapia fotodinâmica, e nanoplataformas multifuncionais que combinam diagnóstico e terapia (nanotheranostics).

Portanto, o uso de nanopartículas no câncer representa uma fronteira promissora na oncologia moderna, com potencial para transformar paradigmas de tratamento e oferecer terapias mais eficazes, seguras e personalizadas para os pacientes.

#### 1.6. Nanosistemas Biomiméticos

A nanotecnologia tem se destacado como uma ferramenta revolucionária na oncologia, permitindo o desenvolvimento de sistemas de entrega de fármacos altamente direcionados, capazes de melhorar a eficácia terapêutica e minimizar efeitos colaterais. Um dos avanços mais promissores nesse campo é o uso de nanopartículas biomiméticas, isso é, nanopartículas recobertas com membranas celulares naturais, como de glóbulos vermelhos, plaquetas, células cancerígenas ou imunológicas (FANG et al., 2018). Essas membranas oferecem uma camuflagem biológica, conferindo às nanopartículas propriedades únicas de biocompatibilidade, evasão do sistema imunológico e direcionamento específico, características altamente desejáveis no tratamento do câncer.

Os sistemas biomiméticos são inspirados nos mecanismos naturais de interação celular e permitem que as nanopartículas herdem proteínas, receptores e outras moléculas de superfície da célula original. Por exemplo, nanopartículas revestidas com membranas de glóbulos vermelhos demonstraram prolongada circulação sanguínea e menor reconhecimento por

macrófagos, enquanto aquelas recobertas com membranas de células tumorais são capazes de realizar *homing* tumoral, ou seja, reconhecer e se acumular preferencialmente em tecidos cancerígenos por meio da homotopia celular (GAO et al., 2016; LIU et al., 2019). As nanopartículas de membrana híbrida, construídas a partir da fusão de diferentes tipos celulares, permitem a combinação de múltiplas funcionalidades, como o direcionamento específico e a modulação do sistema imunológico, ampliando significativamente o potencial terapêutico (WANG et al., 2022). Esses sistemas podem ser carregados com quimioterápicos, agentes fotodinâmicos, RNA de interferência (siRNA) ou até mesmo anticorpos, configurando plataformas versáteis para terapias combinadas.

Combinando as vantagens da nanotecnologia com a sofisticação biológica das membranas naturais, as nanopartículas biomiméticas representam uma fronteira promissora para o tratamento de diversos tipos de câncer, oferecendo melhor desempenho terapêutico, alta especificidade e baixa toxicidade sistêmica.

### 1.7. Justificativa

O câncer de pâncreas e o câncer de pulmão estão entre as neoplasias malignas mais agressivas, apresentando altas taxas de mortalidade e baixa sobrevida global, especialmente quando diagnosticados em estágios avançados (SUNG et al., 2021). As terapias convencionais, como a quimioterapia sistêmica, seguem sendo amplamente empregadas, mas são limitadas por sua baixa seletividade, efeitos colaterais significativos e desenvolvimento frequente de resistência por parte das células tumorais (VASAN; BASELGA; HYMAN, 2019). Nesse cenário, a nanotecnologia tem emergido como uma abordagem inovadora, permitindo a liberação controlada e direcionada de fármacos antineoplásicos, com o objetivo de aumentar a eficácia terapêutica e minimizar a toxicidade sistêmica (PEER et al., 2007; SHI et al., 2017). Estudos demonstram que nanopartículas funcionalizadas podem melhorar a internalização celular, promover acúmulo em tecidos tumorais e superar mecanismos de resistência, tornando-se uma alternativa promissora no tratamento de cânceres de difícil manejo (WILHELM, et al., 2016).

Este estudo utilizou nanopartículas de hidroxiapatita (HA) já sintetizadas e caracterizadas pelo grupo de pesquisa, funcionalizadas com o fármaco doxorrubicina (DOX), um dos agentes quimioterápicos mais potentes e amplamente empregados contra diversos tipos de câncer. A doxorrubicina atua inibindo a topoisomerase II e gerando espécies reativas de oxigênio, levando à morte celular por apoptose. No entanto, seu uso clínico é severamente limitado por efeitos

colaterais, principalmente cardiotoxicidade cumulativa (MINOTTI et al., 2004; TACAR; SRIAMORNSAK; DASS, 2013) .

Dentre os diversos tipos de nanopartículas, as baseadas HA têm ganhado destaque devido à sua biocompatibilidade, biodegradabilidade e capacidade de carregar e liberar fármacos de forma controlada (BEH et al., 2021). A HA,  $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$ , é um biomaterial cerâmico amplamente explorado na nanomedicina devido à sua notável semelhança estrutural com a matriz do tecido ósseo (SADAT-SHOJAI et al., 2013; SHI et al., 2021). Sua elevada capacidade de adsorver e liberar moléculas terapêuticas de forma controlada, aliada à baixa toxicidade, torna a HA uma excelente candidata para a construção de nanocarreadores. Além disso, nanopartículas de HA apresentam comportamento pH-responsivo, sendo degradadas em íons cálcio e fosfato sob condições fracamente ácidas. Essa característica favorece o escape das nanopartículas de compartimentos endolisossômicos após a endocitose, contribuindo para uma maior biodisponibilidade intracelular dos fármacos transportados (KHALIFEHZADEH; ARAMI, 2020).

Para potencializar ainda mais a seletividade e a evasão da resposta imune, o sistema nanoparticulado será recoberto com membranas biomiméticas, como as de células tumorais, que é uma estratégia emergente na nanotecnologia conhecida como nanopartículas biomiméticas. Esse tipo de recobrimento permite que as nanopartículas herdem propriedades da célula original, como a expressão de proteínas de superfície, promovendo longa circulação no sangue, menor reconhecimento por macrófagos e, no caso de membranas tumorais, direcionamento homólogo ao tecido canceroso por meio da homotipia celular (FANG et al., 2018; LIU et al., 2019).

Portanto, a proposta de utilização de nanopartículas de HA carregadas com DOX e recobertas com membranas biomiméticas se justifica pela possibilidade de reunir, em um único sistema, liberação controlada do fármaco, direcionamento ativo ao tumor e redução dos efeitos colaterais sistêmicos. Esta estratégia representa uma abordagem inovadora e potencialmente mais eficaz para o tratamento de cânceres agressivos como os de pulmão e pâncreas, contribuindo para o avanço da nanomedicina personalizada.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivos Gerais**

Avaliar o potencial terapêutico das nanopartículas à base de HA carregadas com DOX para o tratamento do câncer de pâncreas e de pulmão, por meio de ensaios *in vitro*. Além disso,

busca-se investigar como essas nanopartículas se comportam após o revestimento com membranas celulares derivadas de células de câncer de pâncreas e pulmão, analisando possíveis ganhos em eficácia e seletividade tumoral.

## 2.2. Objetivos Específicos

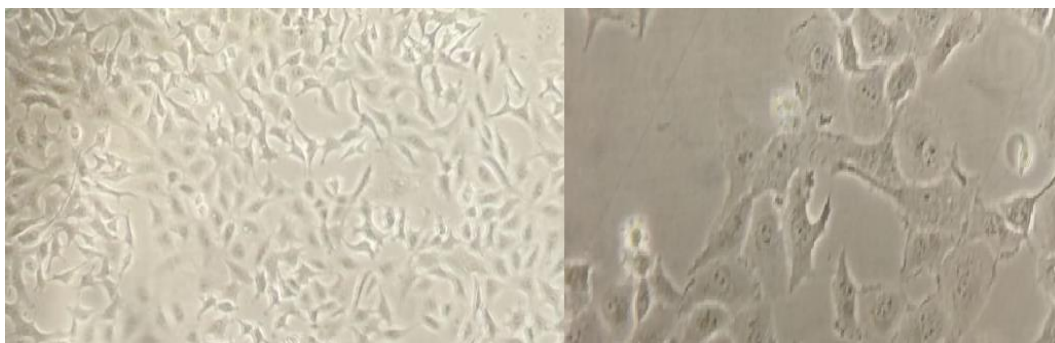
- Cultivo de células tumoral de câncer de pâncreas (linhagem celular PANC-1);
- Cultivo de células tumoral de câncer de pulmão (linhagem celular A549);
- Isolamento e caracterização de membrana plasmática;
- Revestimento das nanopartículas com membranas celulares;
- Caracterização das nanopartículas revestidas com membrana celular;
- Avaliação da viabilidade celular dos nanosistemas em células tumorais (PANC-1) e células não tumorais (HEPA-RG);
- Avaliação da viabilidade celular dos nanosistemas em células tumorais (A549) e células não tumorais (MRC-5).

## 3. METODOLOGIA

### 3.1. Linhagens Celulares

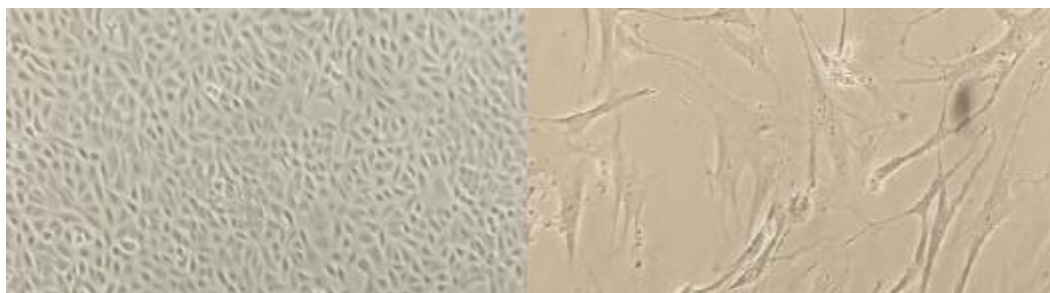
Para a realização deste estudo, foram usadas as seguintes linhagens celulares:

- Linhagem de carcinoma pancreático de origem ductal: PANC-1, **Figura 1**;
- Linhagem hepática humana: HepaRG, **Figura 1**;
- Linhagem de carcinoma pulmonar epitelial: A549, **Figura 2**;
- Linhagem celular diplóide de fibroblastos, obtidas do tecido pulmonar: MRC-5, **Figura 2**.



**Figura 1.** Linhagem PANC-1 e HepaRG, respectivamente, em diferentes aumentos. **Fonte:** Acervo pessoal da autora.





**Figura 2.** Linhagem A549 e MRC-5, respetivamente. **Fonte:** Acervo pessoal da autora.

### 3.1.1. *Cultivo de linhagem celular*

As linhagens celulares foram mantidas em meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM 1 ×, Vitrocel) com antibióticos, para evitar contaminações, suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco, Invitrogen) e 1% de glutamina, mantidas a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub>.

Para a realização do repique celular, as células foram cultivadas em frascos de cultura de tamanho médio. O protocolo consistiu inicialmente na remoção do meio de cultura, seguida por uma lavagem com 5 mL de PBS (*Phosphate Buffered Saline*). Em seguida, foram adicionados 3 mL de solução de tripsina-EDTA (250 mg, Vitrocel), e os frascos foram incubados por 3 minutos a 37 °C para promover o desprendimento das células aderidas. Após esse período, a tripsina foi inativada pela adição de 3 mL de meio DMEM 1×. O procedimento de repique foi realizado duas vezes por semana. Quando as células permaneciam em cultivo por 3 dias, adicionavam-se 2 mL da suspensão celular em um novo frasco contendo 10 mL de DMEM. Para cultivos de 4 dias, utilizavam-se 1 mL da suspensão celular em 11 mL de DMEM. Esse protocolo foi adotado com o objetivo de manter uma confluência adequada das células, garantindo condições ideais para sua manutenção e posterior utilização nos ensaios.

### 3.2. Síntese das Nanopartículas da HA

As nanopartículas de HA foram sintetizadas seguindo protocolos de síntese bem definidos e já utilizados no grupo (MACHADO et al., 2022; MACHADO et al.; 2024). Foram empregadas como fontes precursoras de íons Ca<sup>2+</sup> e fosfato, respectivamente, soluções aquosas de Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O (solução 1) e (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (solução 2) com valores de pH próximos de 10 ajustados pela adição de NH<sub>4</sub>OH. A solução 2 foi vertida rapidamente na solução 1 e a mistura resultante foi mantida sob agitação a temperatura ambiente por 24 horas para permitir a completa cristalização da fase hexagonal da HA. A fim de se remover espécies residuais provenientes dos reagentes de partida, as suspensões de nanopartículas foram lavadas 6 vezes

com H<sub>2</sub>O e 1 vez com etanol por centrifugação a 8000 rpm por 3 minutos sendo, posteriormente, secas em estufa a 80 °C/12 h ou liofilizadas, e moídas em almofariz de ágata. Em seguida, as amostras foram submetidas a tratamentos térmicos a 400-450 °C por 4 horas em forno convencional e em atmosfera ambiente. Por fim, as nanopartículas foram funcionalizadas com íons citrato com o objetivo de estabilizar as nanopartículas em forma de suspensões, e a DOX foi finalmente imobilizada nas nanopartículas de HA ao suspendê-las em soluções aquosas contendo concentrações pré-estabelecidas do fármaco, e permanecendo sob agitação por 24 h. Posteriormente, os materiais carregados foram lavados por centrifugação para remover o excesso do fármaco não carregados sendo, então, os *pellets* ressuspensos nos meios de interesse para conduzir as caracterizações físico-químicas.

### 3.3.Extração de Membranas Celulares (MBs)

As MBs provenientes de linhagens de PANC-1 e A549 foram isoladas e purificadas por meio de ultracentrifugação. Em resumo, o meio de cultura, DMEM 1x, foi descartado e a garrafa de cultura foi lavada com 5 mL de PBS, em seguida para que as células soltassem da garrafa, foi realizada uma raspagem com um rodo de cultura, garantindo que o PBS estivesse no local da raspagem. Para confirmar que as células estavam soltas, observou-se no microscópio. O conteúdo da raspagem foi colocado em um falcon de 15 mL em gelo. O mesmo procedimento foi realizado para 3 garrafas grandes de extração.

Em seguida, os tubos falcon foram lavados três vezes com PBS por centrifugação, e subsequentemente lisadas por incubação em tampão hipotônico durante 20 minutos a 4 °C. As suspensões celulares lisadas foram então centrifugadas, ressuspensas em novo tampão e homogeneizadas. Após homogeneização, uma centrifugação a 10.000 g por 10 minutos a 4 °C foi realizada para remoção de detritos celulares. O sobrenadante obtido foi submetido a ultracentrifugação a 100.000 g por 2 horas, a 4 °C, utilizando uma ultracentrífuga Optima MAX-XP (Beckman Coulter, EUA). O *pellet* contendo as membranas foi ressuspensado em 1 mL de PBS contendo inibidor de protease completo (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemanha) e armazenado a -80 °C até o uso. Tal protocolo foi otimizado para que a extração fosse eficiente, e que o pellet obtido fosse majoritariamente de membranas.

#### 3.3.1. Recobrimento das nanopartículas HA-DOX com as MBs

Após a extração, para o procedimento de recobrimento das nanopartículas de HA-DOX com as MBs das respectivas linhagens, PANC-1 e A549, foi utilizado o método de ultrassom.

Para a MBs da linhagem PANC-1, 20  $\mu$ L das MBs, ressuspensas em água, e 20  $\mu$ L das NPs-HA-DOX de concentração 1  $\mu$ g/mL, foram sonicadas separadamente em um banho ultrassônico por 10 min a 4 °C e 37 Hz com 80% de potência (Elmasonic P). Em seguida, foram colocados no mesmo *ependorf*, totalizando 40  $\mu$ L da solução. Já para as MBs da linhagem A549, o procedimento foi realizado utilizando 250  $\mu$ L de NPs na concentração de 200  $\mu$ g/mL, com 25  $\mu$ L das MBs diluídas em 225  $\mu$ L de água. As amostras foram sonicadas separadamente e depois misturadas em um banho ultrassônico por 10 min a 4 °C e 37 Hz com 80% de potência (Elmasonic P), totalizando 500  $\mu$ L de volume final. No final desta etapa, originaram-se as amostras HA-DOX-MB.

### 3.4. Caracterização das nanopartículas HA-DOX revestidas com membrana

#### 3.4.1. Espalhamento dinâmico de luz (DLS) e potencial Zeta (ZP)

As medidas de tamanho, e ZP das nanopartículas foram conduzidas em equipamento Malvern Spectrometer Nano-ZS (Malvern Instruments, UK). As medidas foram realizadas antes e após o recobrimento com as MBs. Como parâmetros, o meio dispersante foi a água e o material foi proteína. O diâmetro foi entendido como uma média do diâmetro hidrodinâmico, isso foi determinado pela relação de Stokes-Einstein. Os ZP foram determinados por meio de medidas de mobilidade eletroforética. O procedimento foi o mesmo para as linhagens celulares PANC- e A549.

#### 3.4.2. Análise de Rastreamento de Nanopartículas (NTA)

A caracterização das NPs-HA com as membranas, foram realizadas por meio da técnica de Análise de Rastreamento de Nanopartículas (NTA, do inglês *Nanoparticle Tracking Analysis*), utilizando um equipamento NS300 NANOSIGHT, que combina dispersão de luz com rastreamento por vídeo. Essa técnica permite a determinação do tamanho hidrodinâmico, distribuição de tamanhos e concentração de partículas em suspensão, com base no princípio do movimento Browniano das partículas.

Inicialmente, foram utilizadas apenas MBs para caracterização. Para isso, foram usados 10  $\mu$ L de membranas e 990  $\mu$ L de água para realizar a leitura no equipamento. As NPs-HA-DOX-MB foram analisadas na mesma concentração em que foi realizado o recobrimento. Mediram-se também as NPs-HA-DOX sem as MBs, para fins de comparação. Ao realizar a análise no equipamento, um dos principais aspectos a serem considerados é a concentração de partículas no equipamento. Caso a população seja muito elevada, será necessário realizar uma diluição (1/10, 1/100, 1/1000). Outros parâmetros importantes são o *Screen Gain* e *Camera Level* para

realizar o ajuste fino, o primeiro ajusta a luminosidade, enquanto o segundo interfere na altura da câmera.

Durante a análise, um feixe de laser foi direcionado à amostra, promovendo a dispersão da luz pelas partículas presentes na suspensão. A movimentação dessas partículas foi registrada por uma câmera sensível acoplada ao sistema. O software do equipamento rastreou o deslocamento das partículas ao longo do tempo e calculou o coeficiente de difusão de cada uma com base na análise do deslocamento médio quadrático. O cálculo do tamanho hidrodinâmico das partículas foi realizado utilizando por meio da equação de Stokes-Einstein, considerando a temperatura e viscosidade do meio. A partir desses dados, foi possível gerar uma distribuição de tamanho por número e volume, bem como a concentração total de partículas (em partículas/mL).

### 3.4.3. Quantificação de proteína das vesículas de MBs

As proteínas de MBs presentes foram quantificadas por ensaios colorimétricos utilizando o *kit* QuantiPro BCA (Sigma-Aldrich), com o objetivo de determinar a concentração proteica das amostras. O ensaio baseia-se na construção de uma curva de calibração da proteína (BCA). O método empregado segue o princípio da reação de Bradford (Sigma nº catálogo B6916), utilizando como padrão albumina (2 mg/mL) diluída em PBS. A curva de calibração, **Tabela 1**, foi montada em uma placa de 96 poços, mantidas em temperatura ambiente. Com os poços da curva de calibração já preparados, as amostras de MBs foram descongeladas, e adicionou-se um *ependorff* de inibidor de protease (IP). Tanto para a linhagem PANC-1, quanto para A549, foram preparadas cinco amostras de MB extraídas. Cada poço teve 25 µL de amostra e 200 µL da solução reveladora, sendo todos realizados em duplicata. A placa foi incubada por 30 minutos à temperatura ambiente, protegida da luz. A leitura foi realizada em fluorímetro, medindo-se a absorbância em 562 nm.

	Padrão (µg/mL)	p/ 100µL (volume final)	PBS (µL)
<b>1</b>	0	0	100
<b>2</b>	25	1,25	98,75
<b>3</b>	125	6,25	93,75
<b>4</b>	250	12,5	87,5
<b>5</b>	500	25	75
<b>6</b>	750	37,5	62,5

<b>7</b>	1000	50	50
<b>8</b>	1500	75	25
<b>9</b>	2000	100	0

**Tabela 1.** Curva de calibração da proteína (BCA).

### 3.5. Análise da atividade antitumoral das nanopartículas

#### 3.5.1. Viabilidade Celular pelo método MTT

A atividade tumoral das nanopartículas biomiméticas foi avaliada por adição das partículas à cultura de células tumoral PANC-1 e A549, e não tumoral Hepa-RG e MRC-5. As células foram removidas da superfície das garrafas com uso de tripsina 0,05 % e lavadas em meio completo, seguindo-se o preparo de uma suspensão  $2 \times 10^5$  cel/mL. Para os ensaios de citotoxicidade, as células foram distribuídas em uma placa de cultura de poliestireno de fundo chato. Após 48 h de incubação, as partículas em suspensão, bem como restos celulares, foram removidas por lavagem delicada dos alvéolos com meio de cultura à 37 °C. As células vivas aderidas à placa foram então incubadas com uma solução de MTT (brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il] -2,5-difeniltetrazólio), por 2 h à 37 °C sob tensão de 5% de CO<sub>2</sub>. Em seguida, o sobrenadante foi removido e os cristais de formazan, formados no interior das células em atividade, foram solubilizados com dimetilsulfóxido (DMSO), para leitura em espectrofotômetro à 570 nm.

Cada ensaio de viabilidade celular foi realizado em triplicata e em três ocasiões independentes para cada linhagem celular. Essa abordagem visou garantir a reprodutibilidade dos resultados e permitir uma análise mais robusta e comparativa entre os dados obtidos, aumentando a confiabilidade estatística do experimento.

#### 3.5.2. Citometria de fluxo

A internalização das DOX livre, das NPs de HA-DOX e HA-DOX-MB com recobrimento de MB da A549 foi avaliada por citometria de fluxo, com base na fluorescência da DOX. As análises foram realizadas com foco exclusivo na proporção 1:1 (nanopartículas: membranas), a fim de padronizar as comparações e reduzir variações. No dia anterior ao experimento, foram plaqueadas 100.000 células por poço ( $1 \times 10^5$  células/mL) em placas de 12 poços, adicionando-se 1 mL por poço. Para o tratamento celular, foram misturados 315 µL da suspensão nanopartícula-membrana com 2185 µL de meio de cultura, de modo a atingir a concentração final de 25,2 µg/mL de HA e 5 µg/mL de DOX. As células foram tratadas com 1 mL de cada condição experimental por poço, em triplicata, e incubadas por 4 horas a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub>.

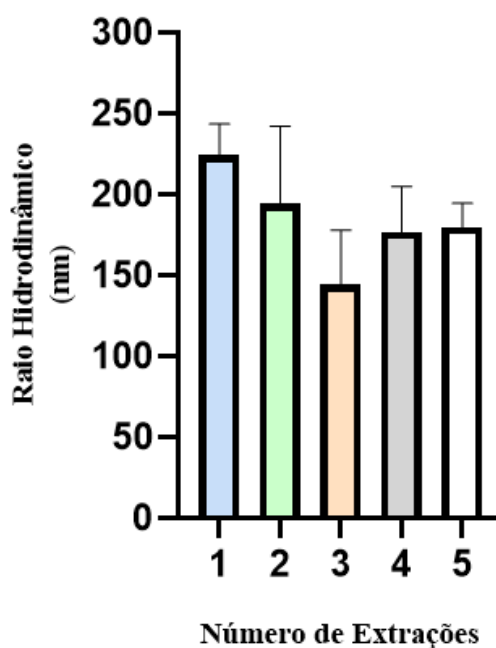
Após a incubação, as células foram lavadas duas vezes com PBS, tripsinizadas com 500 µL de tripsina por poço, e a reação foi inativada com 500 µL de meio de cultura. O conteúdo de cada poço foi coletado, centrifugado a 1000 rpm por 10 minutos a 4 °C, e o *pellet* celular foi ressuspenso em 400 µL de tampão de corrida. As amostras foram mantidas em gelo até o momento da análise leitura. A análise foi realizada em citômetro de fluxo, monitorando a fluorescência da doxorubicina por excitação em 488 nm e detecção no canal FL2, permitindo a avaliação quantitativa da internalização das nanopartículas pelas células.

#### 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

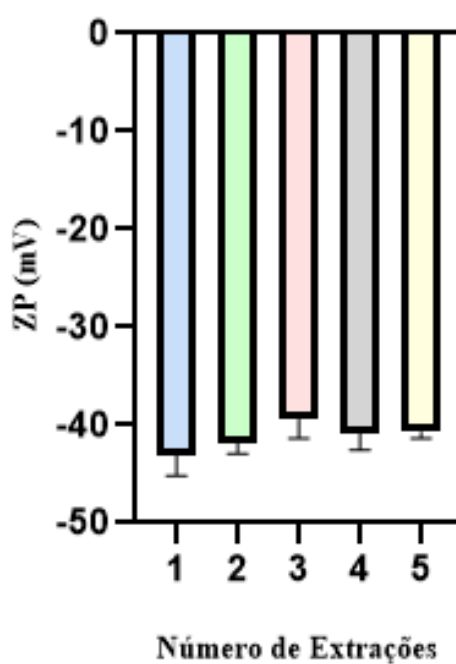
##### 4.1.Extração da Membrana Celular da linhagem PANC-1

##### 4.1.1. Espalhamento dinâmico de luz (DLS) e potencial Zeta (ZP)

Os raios hidrodinâmicos das amostras foram determinados por meio da técnica de DLS. Os resultados indicaram que as MBs extraídas apresentaram tamanhos na faixa de 140 a 220 nm, conforme ilustrado na **Figura 3**. Além disso, o ZP das MBs foi avaliado com o objetivo de caracterizar a carga superficial das partículas. Conforme ilustrado na **Figura 4**, todas as MBs extraídas apresentaram valores negativos de ZP, variando entre -35 mV e -40 mV. Esses valores indicam a predominância de cargas negativas na superfície das vesículas, o que está diretamente relacionado à presença de grupos funcionais aniônicos, como fosfatos e carboxilas, provenientes dos fosfolipídios e proteínas da membrana celular. Tal característica é típica de sistemas lipídicos e contribui para a estabilidade coloidal das nanopartículas, além de influenciar suas interações eletrostáticas com a superfície celular e o microambiente tumoral (HONARY; ZAHIR, 2013).



**Figura 3.** Raio Hidrodinâmico das MBs da linhagem PANC-1.

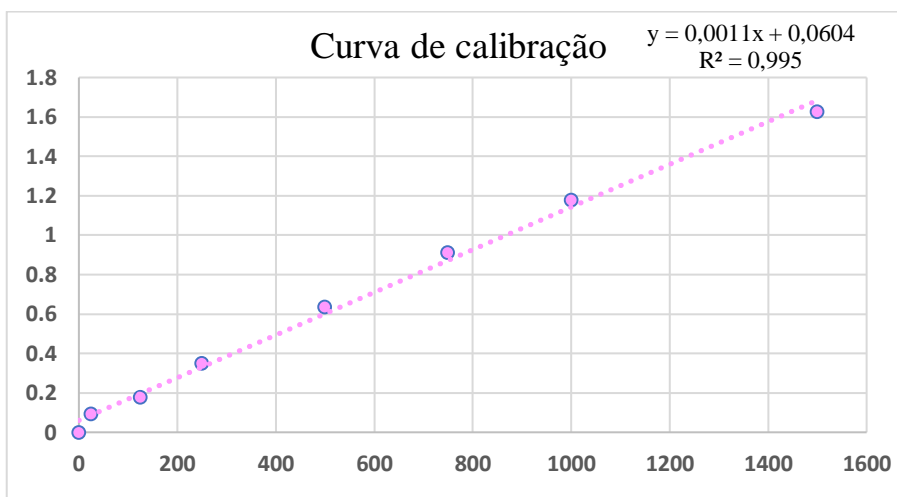


**Figura 4.** ZP das MBs da linhagem PANC-1.

#### 4.1.2. Curva de Calibração da proteína BCA

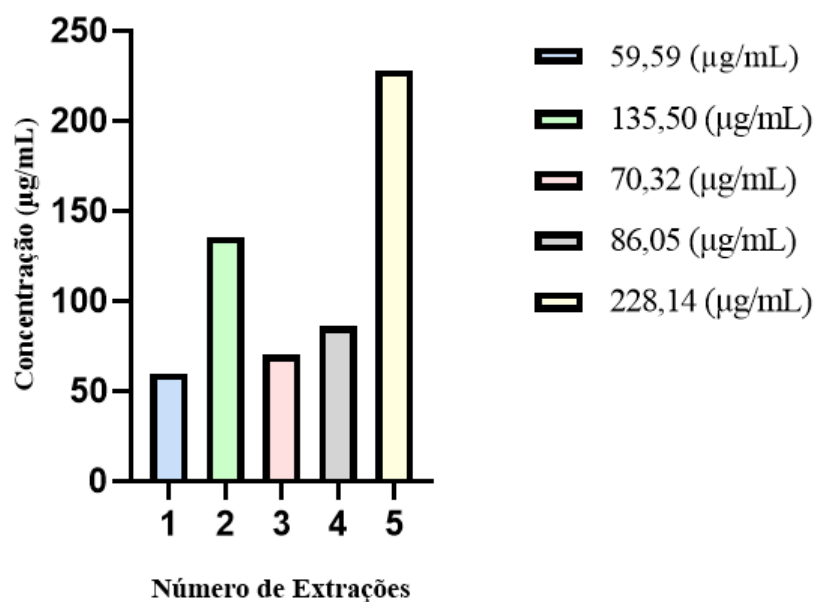
A quantificação de proteínas totais das membranas extraídas foi realizada utilizando o método BCA (*Bicinchoninic Acid*), que se baseia na formação de um complexo colorido entre as proteínas e o reagente BCA, cuja absorbância é proporcional à concentração de proteínas. Para a construção da curva de calibração, **Figura 5**, foram utilizadas concentrações conhecidas de albumina sérica bovina (BSA) como padrão. A equação da reta obtida a partir da curva de

calibração foi  $y = 0,0011x + 0,0604$ , onde  $y$  representa a absorbância e  $x$  a concentração de proteínas em  $\mu\text{g/mL}$ . O coeficiente de determinação ( $R^2 = 0,995$ ) indica uma excelente correlação linear entre os dados, confirmando a precisão do método.



**Figura 5:** Calibração de Proteínas por concentração de BCA.

A partir da curva de calibração, foi determinada a concentração de proteínas nas amostras analisadas. A **Figura 6**, mostra a concentração de proteínas em cada amostra analisada, se referindo a cada uma das extrações realizadas, levando em consideração que são extrações independentes, tendo como média a concentração de  $116 \pm 53 \mu\text{g/mL}$ .



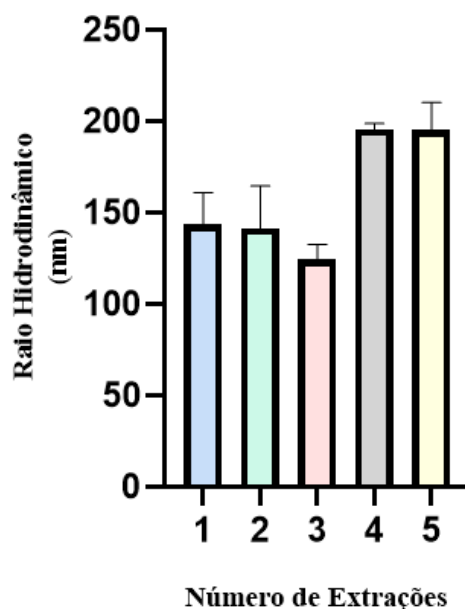
**Figura 6:** Concentração de proteínas em cada amostra de MB da linhagem PANC-1.

#### 4.2.Extração da membrana celular da linhagem A549

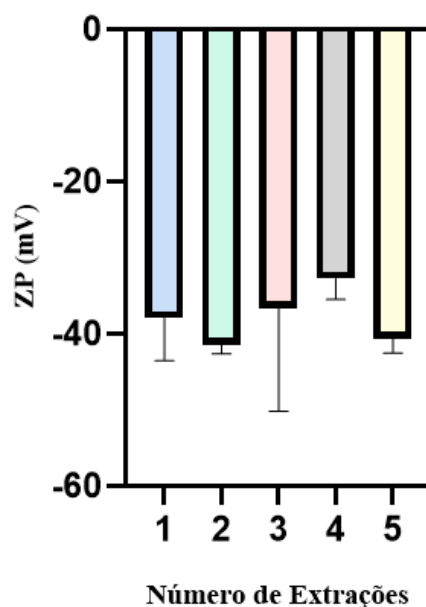
##### 4.2.1. Espalhamento dinâmico de luz (DLS) e potencial Zeta (ZP)



Após cinco extrações de MBs, os raios hidrodinâmicos das amostras foram determinados por meio da técnica de DLS. Assim, os resultados indicaram que as MBs extraídas apresentaram tamanhos na faixa de 120 a 200 nm, conforme ilustrado na **Figura 7**. O ZP das membranas foi medido para avaliar a carga superficial das partículas. Conforme apresentado na **Figura 8**, todas as membranas extraídas exibiram um ZP negativo, com valores variando entre -30 e -45 mV.



**Figura 7.** Raio Hidrodinâmico das MBs da linhagem A549.

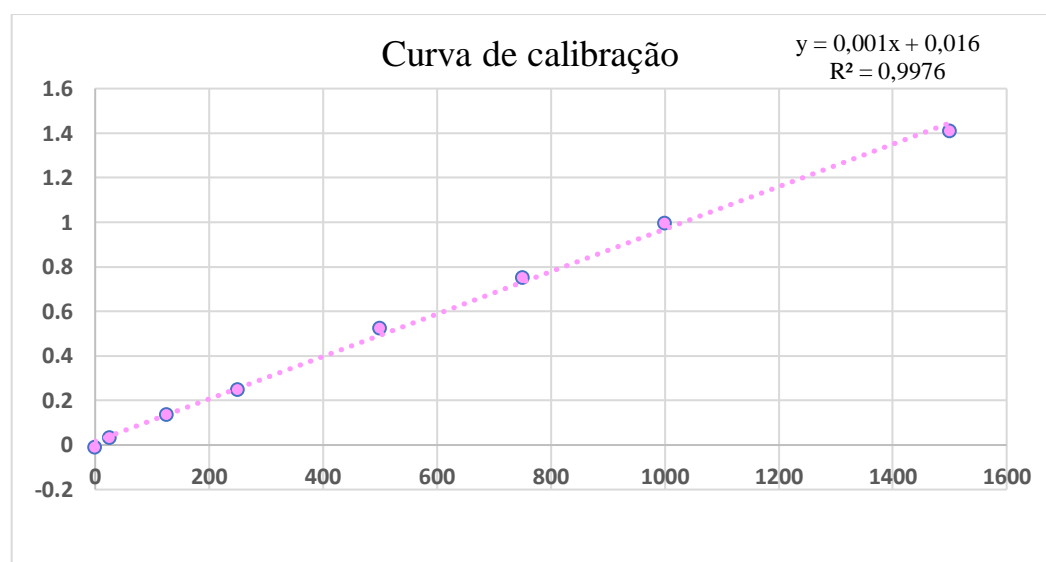


**Figura 8.** ZP das MBs da linhagem A549.

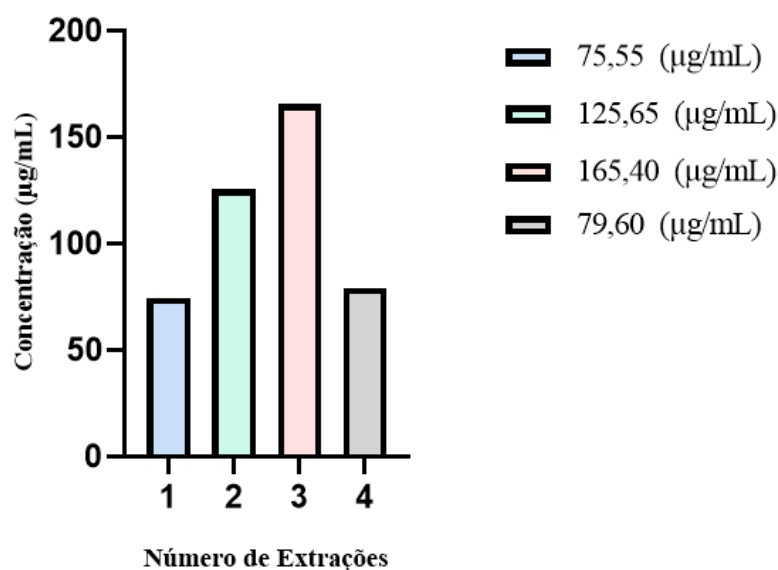
#### 4.2.2. Curva de Calibração da Proteína BCA

A quantificação das proteínas totais presentes nas MBs extraídas foi realizada utilizando o método do ácido bicinonínico (BCA), que se baseia na formação de um complexo cromofórico entre os grupos peptídicos das proteínas e o reagente BCA, cuja absorbância é proporcional à concentração proteica. Para construção da curva padrão (**Figura 9**), foram empregadas soluções com concentrações conhecidas de albumina sérica bovina (BSA). A equação da reta obtida foi  $y = 0,001x + 0,016$ , em que  $y$  corresponde à absorbância e  $x$  à concentração de proteínas em  $\mu\text{g/mL}$ . O coeficiente de determinação ( $R^2 = 0,997$ ) demonstrou alta correlação linear, evidenciando a confiabilidade do método.

A partir dessa curva, determinou-se que a concentração de proteínas nas amostras, **Figura 10**, com uma média de  $111,30 \pm 34,225 \mu\text{g/mL}$ .



**Figura 9:** Calibração de Proteínas por concentração de BCA.

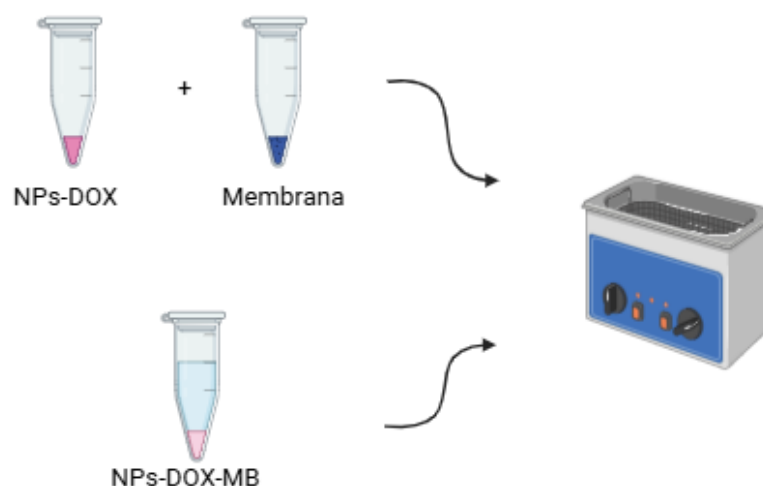


**Figura 10:** Concentração de proteínas em cada amostra de MB da linhagem A549.

#### 4.3. Recobrimento das nanopartículas HA-DOX com as membranas celulares da PANC-1 e A549

As nanopartículas de HA foram sintetizadas com base em protocolos previamente padronizados pelo grupo de pesquisa, utilizando soluções aquosas de  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  e  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ , com o pH ajustado para 10 por meio da adição de  $\text{NH}_4\text{OH}$ . A adição rápida da solução fosfatada à solução contendo cálcio, seguida de agitação contínua por 24 horas à temperatura ambiente, favoreceu a formação e cristalização da fase hexagonal da hidroxiapatita, que é a forma estrutural desejada por sua alta biocompatibilidade e semelhança com a matriz óssea mineral. Após a etapa de síntese, as nanopartículas foram submetidas a um processo rigoroso de purificação, com seis lavagens em água e uma em etanol, realizadas por centrifugação a 8000 rpm por 3 minutos. A secagem foi conduzida a 80 °C por 12 horas ou por liofilização, garantindo a remoção completa de solventes.

Para melhorar a estabilidade coloidal e preparar as partículas para a adsorção do fármaco, as nanopartículas foram funcionalizadas com íons citrato, o que também contribui para a dispersão em meio aquoso. A imobilização da DOX foi realizada por incubação das nanopartículas em solução aquosa do fármaco, sob agitação por até 24 horas, permitindo a adsorção da molécula anticancerígena na superfície da HA funcionalizada. Em seguida, as partículas foram lavadas por centrifugação para remover o excesso de fármaco não ligado, e os pellets resultantes foram ressuspensos em meio apropriado para as análises físico-químicas subsequentes. A estratégia de funcionalização com citrato e posterior adsorção de DOX mostrou-se eficiente na produção de nanopartículas estáveis e com potencial para liberação controlada do fármaco, conforme relatado em estudos prévios que destacam a afinidade de grupos carboxilato por superfícies de HA e sua capacidade de modular a interação com fármacos catiônicos. As membranas extraídas foram utilizadas para recobrimento as NPs de HA-DOX. A técnica empregada foi a de ultrassom, conforme descrito na **Figura 11**. Os tubos *eppendorf* contendo as amostras separadas foram submetidos ao ultrassom por 10 minutos. Em seguida, as amostras foram reunidas e submetidas a um novo ciclo de banho ultrassônico por mais 10 minutos. Após esse processo, as nanopartículas recobertas foram caracterizadas. O mesmo procedimento foi aplicado às duas linhagens celulares, PANC-1 e A549.

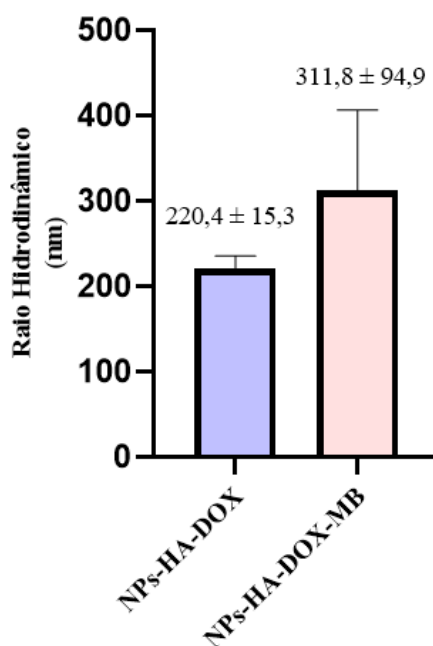


**Figura 11** : Recobrimento das NPs com MB por ultrasson. **Fonte:** Realizado pela autora no BioRender.

#### 4.4.Caracterização das nanopartículas de HA-DOX revestidas com membrana da linhagem PANC-1

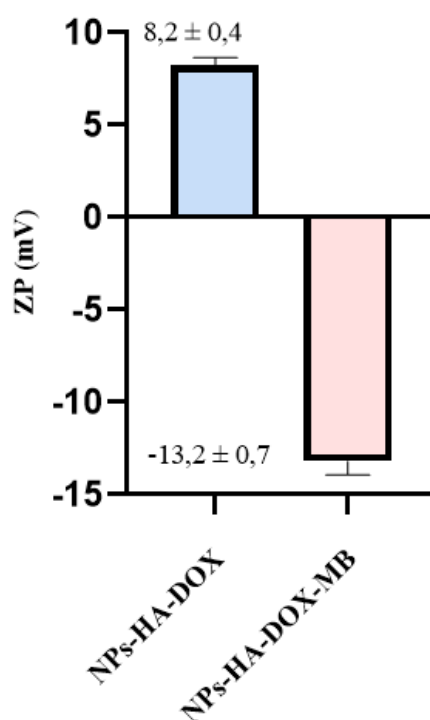
##### 4.4.1. Espalhamento dinâmico de luz (DLS) e potencial zeta (ZP)

A caracterização das MBs, das nanopartículas de HA-DOX e HA-DOX-MB, foram realizadas por meio de DLS e ZP. As nanopartículas de HA-DOX apresentaram um raio hidrodinâmico médio de 225 nm. Após o revestimento com MBs observou-se um aumento significativo no raio hidrodinâmico, que passou para a faixa de 250 a 300 nm, **Figura 12**, indicando a formação de uma camada superficial adicional ao redor das nanopartículas.



**Figura 12:** Raio Hidrodinâmico das NPs de HA-DOX e HA-DOX-MB da linhagem PANC-1.

Em relação ao ZP, as nanopartículas de HA-DOX sem revestimento apresentaram valores positivos. Após o revestimento com membranas, o ZP tornou-se mais negativo, na faixa de -15 mV, **Figura 13**. A mudança no ZP observada após o revestimento das NPs- HA funcionalizadas com citrato e carregadas DOX, pode ser explicada pelas alterações na composição química da superfície das partículas. Inicialmente, as NPs-HA-DOX apresentaram um ZP positivo, o que pode estar relacionado à presença de grupos catiônicos residuais na superfície da hidroxiapatita, como íons cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ), e aos grupos amina protonáveis da doxorubicina, que conferem carga positiva em pH fisiológico. Entretanto, após o revestimento com MB, a superfície exposta das nanopartículas passou a refletir predominantemente os componentes da membrana. As membranas celulares são ricas em fosfolipídios aniônicos, proteínas com grupos carboxílicos e sulfatados, que conferem uma carga superficial negativa às vesículas. Como o ZP mede a carga elétrica da camada mais externa da nanopartícula, o revestimento biomimético resulta em uma inversão do sinal do ZP, que passa a ser negativo (HONARY; ZAHIR, 2013). Essa alteração confirma a eficiência do processo de recobrimento e é consistente com o comportamento esperado de sistemas biomiméticos baseados em membranas celulares.



**Figura 13:** ZP das NPs de HA-DOX e HA-DOX-MB da linhagem PANC-1.

#### 4.4.2. *Análise de Rastreamento de Nanopartículas (NTA)*

A caracterização das amostras foi realizada por meio da técnica de NTA, com o objetivo de avaliar o diâmetro hidrodinâmico médio e a concentração das vesículas derivadas de MB, bem como das nanopartículas funcionalizadas e revestidas com MB. Na **Tabela 2**, é apresentada a análise das vesículas derivadas das MB da linhagem PANC-1. Observa-se uma distribuição de tamanho homogênea, com diâmetro médio característico de vesículas extracelulares, e concentração adequada para posterior aplicação no revestimento de nanopartículas. Esses dados indicam que o protocolo de extração e homogeneização das membranas foi eficiente, resultando em vesículas com perfil adequado de dispersão coloidal.

	<b>Extração 1</b>	<b>Extração 2</b>	<b>Extração 3</b>	<b>Extração 4</b>	<b>Extração 5</b>
<b>Tamanho (nm)</b>	215,6 ± 18,5	229,0 ± 8,5	226,7 ± 11,7	220,2 ± 12,3	217,4 ± 11,7
<b>Concentração (partículas/mL)</b>	5,6x10 <sup>8</sup> ± 2,8x10 <sup>7</sup>	2,8x10 <sup>11</sup> ± 1,3x10 <sup>10</sup>	2,3x10 <sup>11</sup> ± 1,3x10 <sup>10</sup>	2,1x10 <sup>11</sup> ± 1,5x10 <sup>10</sup>	5,6x10 <sup>8</sup> ± 1,8x10 <sup>7</sup>

**Tabela 2.** Concentração e tamanho das MB de PANC-1.

Na **Tabela 3**, é mostrada a análise das membranas extraídas da linhagem A549. De modo semelhante ao observado para PANC-1, as vesículas apresentaram distribuição unimodal de tamanhos e concentração compatível com a obtenção de um revestimento biomimético eficiente. A comparação entre as duas linhagens revela variações sutis no perfil de tamanho, possivelmente atribuídas à composição lipídica e proteica específica de cada tipo celular.

	<b>Extração 1</b>	<b>Extração 2</b>	<b>Extração 3</b>	<b>Extração 4</b>
<b>Tamanho (nm)</b>	198,8 ± 2,9	221,7 ± 7,1	211,3 ± 4,0	193,5 ± 1,4
<b>Concentração (partículas/mL)</b>	1,4x10 <sup>11</sup> ± 4,6x10 <sup>9</sup>	1,6x10 <sup>11</sup> ± 6,8x10 <sup>9</sup>	1,2x10 <sup>11</sup> ± 3,3x10 <sup>9</sup>	1,1x10 <sup>11</sup> ± 3,9x10 <sup>9</sup>

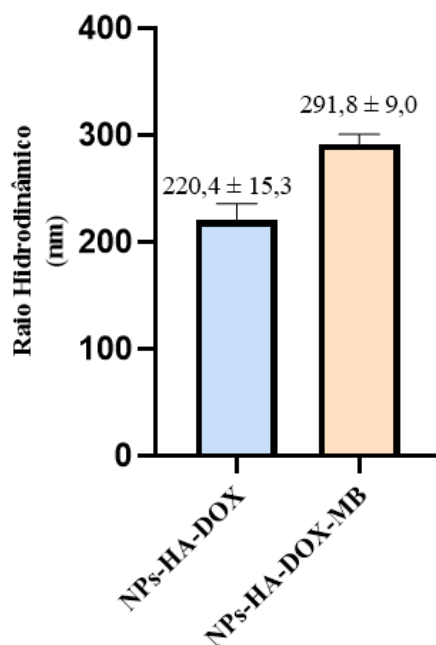
**Tabela 3.** Concentração e tamanho das MB de A549.

#### 4.5.Caracterização das nanopartículas de HA-DOX revestidas com membrana da linhagem A549

##### 4.5.1. Espalhamento dinâmico de luz (DLS) e potencial zeta (ZP)

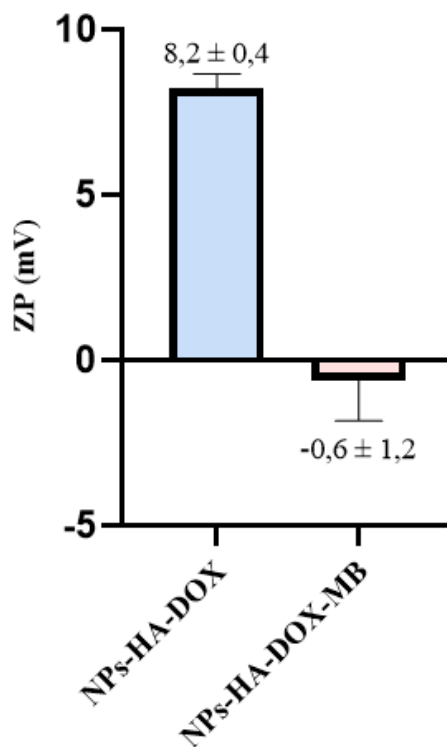
A técnica de DLS foi empregada para determinar o raio hidrodinâmico das NPs-HA-DOX, antes e após o revestimento com MB da linhagem A549, NPs-HA-DOX-MB. Essa análise é fundamental para confirmar a formação da camada de membrana sobre as nanopartículas e avaliar sua estabilidade coloidal. As NPs-HA-DOX apresentaram um raio hidrodinâmico médio de 220,4 ± 15,34 nm. Após o processo de revestimento com membranas celulares, observou-se um aumento significativo no tamanho médio, com as NPs-HA-DOX-MB atingindo

291,8  $\pm$  8,98 nm. Esse aumento de aproximadamente 70 nm é consistente com a presença de uma camada adicional de material biológico envolvendo a superfície da nanopartícula, **Figura 14**. A redução no desvio padrão após o revestimento também sugere uma maior uniformidade na distribuição de tamanhos das partículas revestidas.



**Figura 14:** Raio Hidrodinâmico das NPs de HA-DOX e HA-DOX-MB da linhagem A549.

Para a realização do ZP, as medições foram realizadas tanto para as NPs-HA-DOX quanto para as mesmas partículas após o revestimento com MBs da linhagem A549 (NPs-HA-DOX-MB). As NPs-HA-DOX apresentaram um ZP positivo de  $+8,21 \pm 0,44$  mV, valor coerente com a presença de íons cálcio na superfície da hidroxiapatita e com os grupos amina protonáveis da DOX. Esse resultado sugere uma superfície com predominância de cargas positivas, típica de sistemas não revestidos e potencialmente mais suscetíveis à agregação em meio fisiológico. Após o revestimento com MBs, o ZP das NPs-HA-DOX-MB foi de  $-0,60 \pm 1,23$  mV, indicando uma redução significativa da carga superficial positiva, **Figura 15**. No entanto, o valor obtido não atingiu os níveis negativos observados em outros sistemas biomiméticos, o que pode ser atribuído à utilização de uma quantidade dez vezes menor de MBs durante o processo de revestimento, o que justificaria um valor de ZP próximo da neutralidade.



**Figura 15:** ZP das NPs de HA-DOX e HA-DOX-MB da linhagem A549.

#### 4.5.2. *Análise de Rastreamento de Nanopartículas (NTA)*

Inicialmente, os dados de DLS mostraram um aumento no diâmetro hidrodinâmico médio das nanopartículas após o revestimento, o que sugere a formação de uma camada externa na superfície das partículas. Esse aumento de tamanho foi confirmado pela análise de NTA, que, por rastrear partículas individualmente, apresentou um perfil de distribuição mais refinado e menos influenciado por partículas maiores, validando a homogeneidade do revestimento. A **Tabela 4** apresenta o perfil obtido para as nanopartículas de HA-DOX e posteriormente revestidas com membranas da linhagem A549. A análise por NTA revela um aumento esperado no diâmetro médio das partículas em relação às HA-DOX não revestidas, o que confirma a formação do revestimento membranoso na superfície. Esses resultados demonstram o sucesso na extração das membranas celulares e na incorporação eficiente do revestimento às nanopartículas, confirmando os dados das outras caracterizações. Portanto, o conjunto de dados obtidos pelas três técnicas (DLS, ZP, NTA) demonstra de forma complementar que o revestimento com membranas foi eficaz, promovendo um aumento controlado no tamanho das nanopartículas e alterando suas propriedades de superfície de maneira compatível com a presença da membrana biológica.



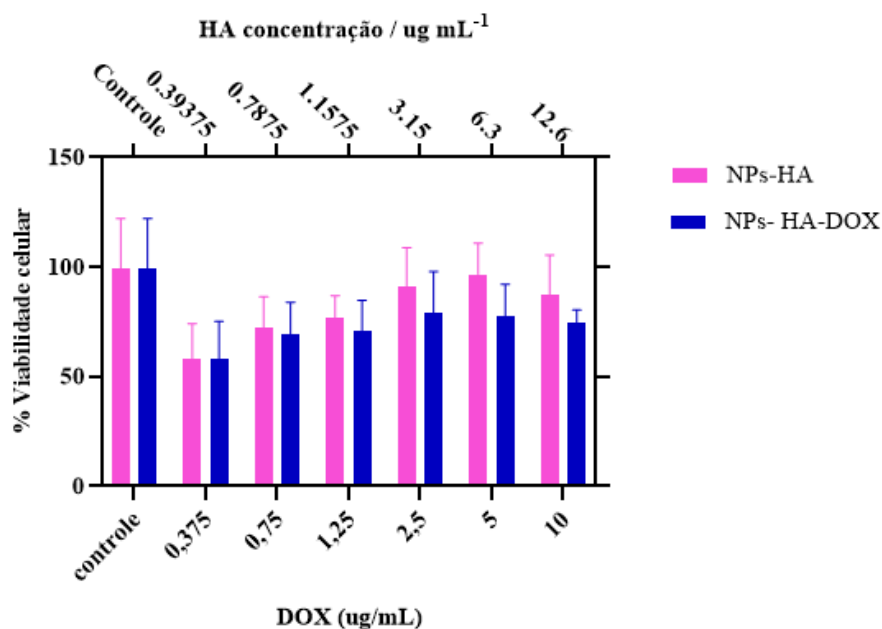
	HA-DOX	HA-DOX-MB
<b>Tamanho (nm)</b>	227,7 ± 4,6	265,3 ± 2,6
<b>Concentração (partículas/mL)</b>	1,1x10 <sup>9</sup> ± 7,1x10 <sup>7</sup>	1,6x10 <sup>9</sup> ± 1,1x10 <sup>8</sup>

**Tabela 4.** Concentração e tamanho de HA-DOX e HA-DOX-MB.

#### 4.6. Análise da atividade antitumoral das nanopartículas na linhagem PANC-1

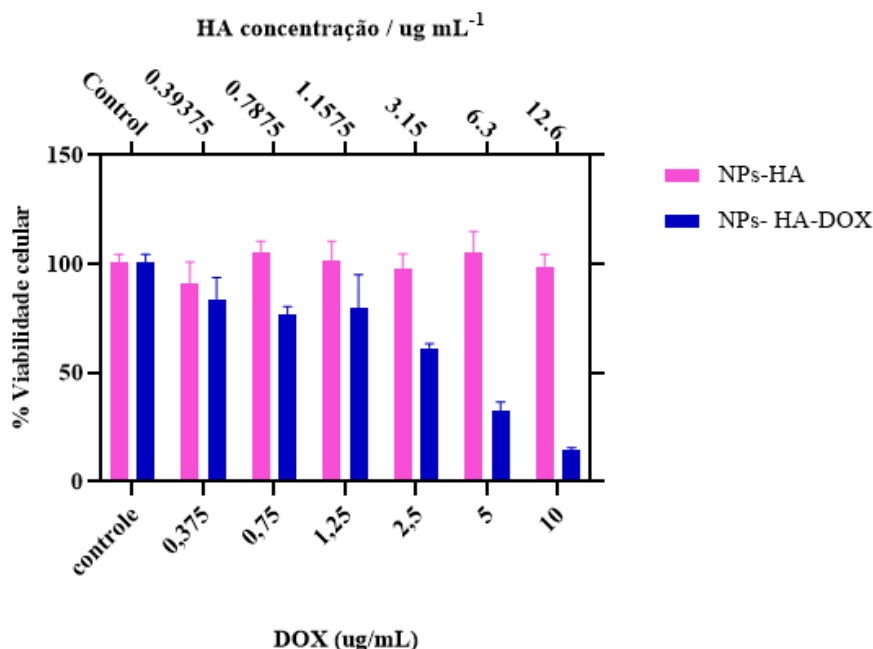
##### 4.6.1. Viabilidade Celular pelo método MTT

O teste de MTT foi realizado para avaliar a viabilidade celular após exposição a diferentes concentrações de nanopartículas puras (HA) e nanopartículas carregadas com o fármaco (HA-DOX). Esse ensaio é amplamente utilizado para medir a atividade metabólica das células, refletindo sua viabilidade e capacidade proliferativa. Ao se variar as concentrações das nanopartículas, tanto na forma pura quanto associadas ao fármaco, observou-se uma leve redução na viabilidade da linhagem celular tumoral PANC-1, conforme demonstrado na **Figura 16**. No entanto, essa diminuição não foi estatisticamente significativa, indicando que, nas condições testadas, o tratamento não exerceu um efeito citotóxico eficaz sobre as células tumorais, que mantiveram níveis elevados de viabilidade.



**Figura 16.** Teste de MTT da linhagem PANC-1 variando concentração.

Entretanto, na linhagem celular saudável HepaRG, foi possível observar uma variação na concentração celular conforme aumentava a concentração do fármaco, sugerindo que houve uma redução clara na viabilidade, **Figura 17**.



**Figura 17.** Teste de MTT da linhagem HepaRG variando concentração.

Os resultados obtidos demonstram que, na linhagem celular saudável HepaRG, houve uma diminuição perceptível na densidade celular com o aumento da concentração de DOX, sugerindo uma redução significativa na viabilidade celular. Esse comportamento indica que o tratamento influenciou negativamente a população de células hepáticas, possivelmente por mecanismos de toxicidade direta ou modulação da proliferação. A DOX é um agente quimioterápico amplamente conhecido por sua ação citotóxica mediada por intercalamento de DNA, inibição da topoisomerase II e geração de espécies reativas de oxigênio (ROS), que afetam não apenas células tumorais, mas também células normais com alta atividade metabólica (CARVALHO et al., 2009; MINOTTI et al., 2004). Por outro lado, nas células tumorais PANC-1, os mesmos tratamentos com DOX, seja na forma livre ou associada às nanopartículas, não promoveram uma redução expressiva na viabilidade celular. Esse resultado sugere que, para as concentrações e tempos de exposição avaliados, as células PANC-1 demonstraram uma resposta resistente ao fármaco, o que é coerente com diversos estudos que apontam o câncer de pâncreas como um dos tipos tumorais mais refratários à quimioterapia convencional (AMRUTKAR; GLADHAUG, 2017; NEUZILLET et al., 2015).

A diferença de resposta entre as duas linhagens pode ser atribuída a vários fatores, incluindo diferenças no metabolismo celular, na expressão de transportadores de efluxo como a P-glicoproteína (MDR1), e na ativação de vias de reparo de DNA ou de resistência ao estresse oxidativo (GOTTESMAN; FOJO; BATES, 2002). Células HepaRG, por exemplo, embora sejam diferenciadas e metabolicamente ativas, ainda retêm características sensíveis a agentes tóxicos, o que explica sua resposta dose-dependente à DOX. Já as células PANC-1 são conhecidas por apresentar fenótipos altamente resistentes, mesmo frente a agentes como gemcitabina ou doxorrubicina, o que limita a eficácia de abordagens terapêuticas tradicionais (SPRINGFELD et al., 2019). Tudo isso reforça a necessidade de desenvolver estratégias de liberação direcionada e sistemas de entrega mais seletivos, capazes de superar os mecanismos de resistência presentes em tumores pancreáticos. Além disso, a avaliação de citotoxicidade em linhagens saudáveis, como a HepaRG, é fundamental para compreender os possíveis efeitos colaterais da formulação, mesmo em concentrações consideradas terapêuticas.

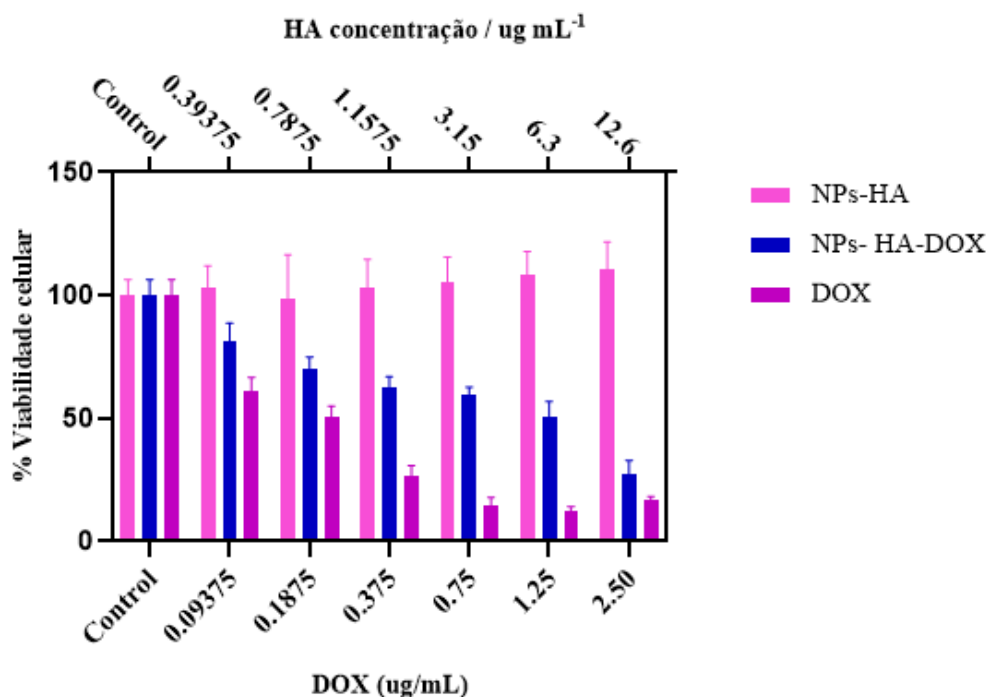
#### 4.7. Análise da atividade antitumoral das nanopartículas na linhagem A549.

##### 4.7.1. Viabilidade Celular pelo método MTT

A viabilidade celular foi avaliada por meio do ensaio de MTT, para a linhagem A549, após 72 horas de incubação com diferentes concentrações de DOX livre, HA e nanopartículas de HA-DOX). Os resultados obtidos estão apresentados na **Figura 18**, expressos como porcentagem em relação ao controle negativo (células não tratadas). As amostras tratadas com HA apresentaram viabilidades próximas ou superiores a 90% em todas as concentrações testadas, o que indica baixa citotoxicidade do nanocarreador em sua forma não carregada. Esse resultado confirma a biocompatibilidade da matriz de hidroxiapatita funcionalizada com citrato, tornando-a adequada como plataforma de liberação. Em contraste, a DOX induziu uma redução significativa da viabilidade celular de maneira dose-dependente. A partir da concentração de 0,375 µg/mL, já se observa uma queda acentuada da viabilidade celular, o que evidencia a potente atividade citotóxica do fármaco.

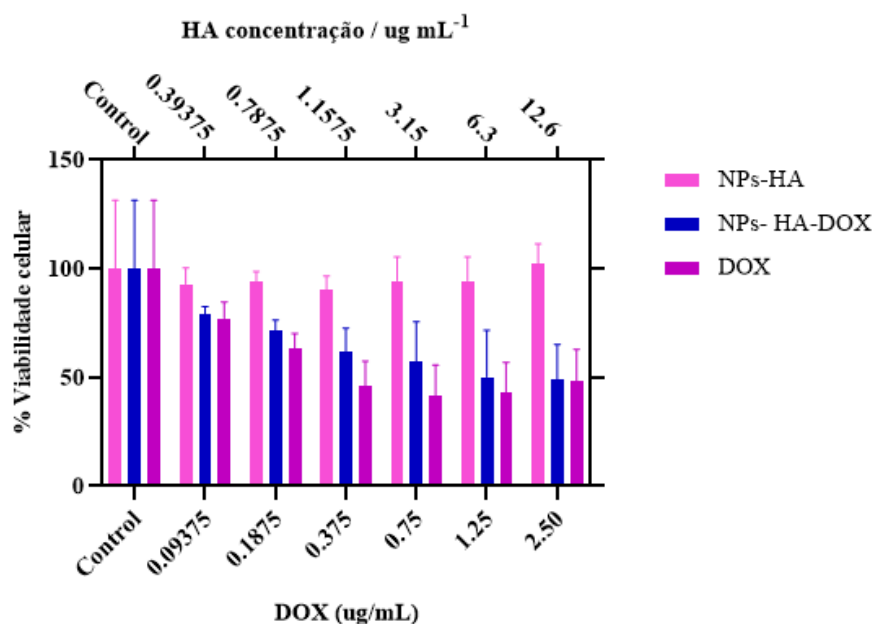
As nanopartículas HA-DOX também promoveram redução da viabilidade celular, com perfil semelhante ao da DOX livre, porém de forma ligeiramente mais gradual. Em todas as concentrações, as NPs-HA-DOX apresentaram maior citotoxicidade do que HA isolada e viabilidade comparável à da DOX livre, o que indica que o fármaco manteve sua atividade mesmo após o processo de adsorção na superfície das nanopartículas. Em algumas concentrações intermediárias (como 0,375 e 0,75 µg/mL de DOX), nota-se que a citotoxicidade

do sistema nanoestruturado é discretamente inferior à da DOX livre, o que pode estar relacionado à liberação controlada do fármaco ou a uma taxa de internalização ligeiramente mais lenta.



**Figura 18.** Teste de MTT na linhagem A549 variando concentração.

A **Figura 19**, mostra o resultado de MTT da linhagem MRC-5, percebe-se que as nanopartículas de HA funcionalizadas com citrato (HA-Cit) não afetaram significativamente a viabilidade celular, mantendo valores próximos a 100% em todas as concentrações testadas. Por outro lado, a DOX livre e as nanopartículas HA -DOX apresentaram efeitos citotóxicos leves e semelhantes, com viabilidades variando entre 50% e 70% ao longo das concentrações. Isso indica que, mesmo em células saudáveis, o fármaco mantém sua toxicidade característica, enquanto a incorporação em nanopartículas não atenua significativamente esse efeito neste modelo.



**Figura 19.** Teste de MTT na linhagem MRC-5 variando concentração.

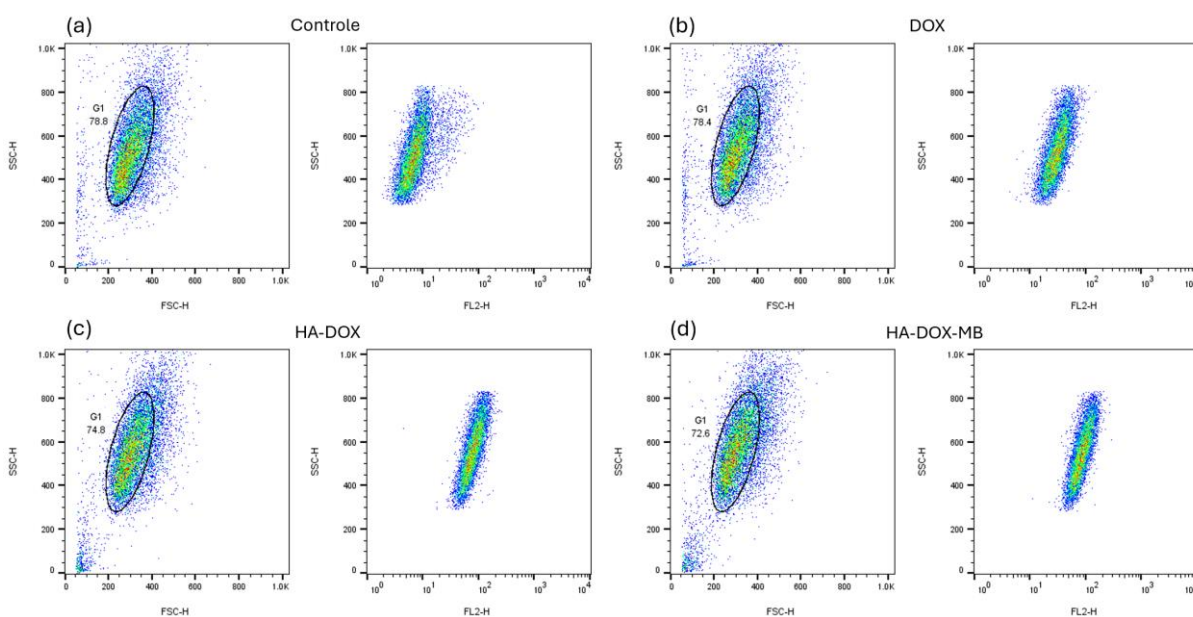
#### 4.7.2. Citometria de fluxo

Antes de iniciar os ensaios de viabilidade celular, optou-se por investigar preliminarmente se o revestimento com membranas celulares influenciaria significativamente o processo de internalização das nanopartículas, em comparação à formulação não revestida (NP<sub>s</sub>-HA-DOX). Além disso, buscou-se confirmar a capacidade de internalização das nanopartículas, com e sem membrana, por células da linhagem A549. A **Figura 20(a–d)** apresenta os *dot plots* obtidos por citometria de fluxo, ilustrando a estratégia de *gating* adotada e a detecção da fluorescência da doxorubicina no canal FL2-H. Em **Figura 20(e)** são mostrados os histogramas de fluorescência correspondentes, e **Figura 20(f)** apresenta as médias geométricas extraídas dessas distribuições. Em todas as amostras tratadas com doxorubicina, observou-se um aumento expressivo na intensidade de fluorescência em relação ao controle negativo, indicando internalização eficiente do fármaco pelas células A549.

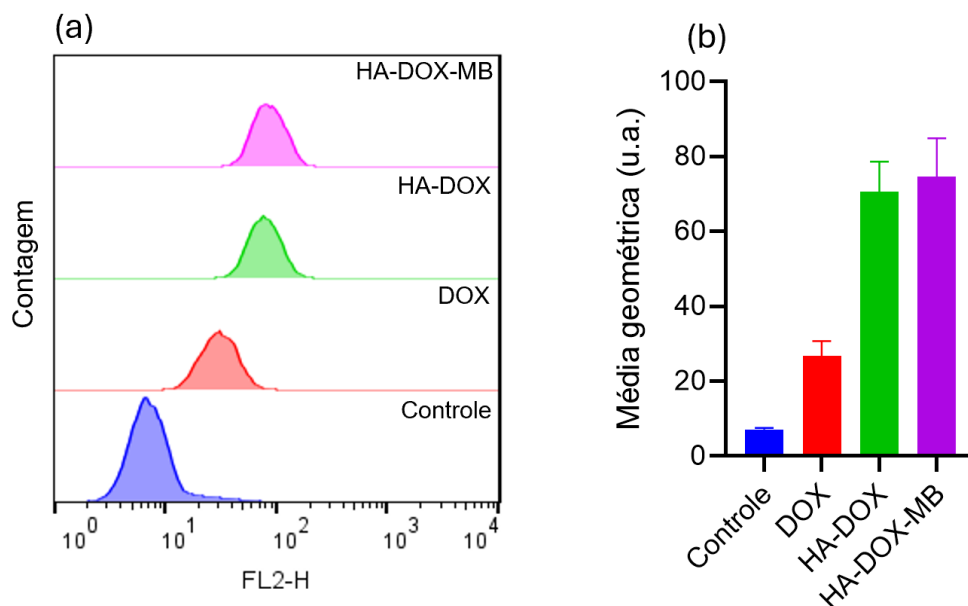
As formulações NP<sub>s</sub>-HA-DOX e NP<sub>s</sub>-HA-DOX-MB apresentaram intensidades de fluorescência superiores à doxorubicina livre, sugerindo que a associação do fármaco à superfície das nanopartículas favorece sua internalização, possivelmente por mecanismos de endocitose ou devido ao aumento no tempo de retenção intracelular. No entanto, não foi observada uma diferença estatisticamente significativa entre as formulações com e sem revestimento de membrana. Embora se esperasse que o recobrimento com membranas tumorais promovesse maior internalização em células do mesmo tipo (efeito homotípico), esse comportamento pode ter sido atenuado por diversos fatores. Uma possível explicação é a

necessidade de otimização do processo de revestimento, visando aumentar a densidade e funcionalidade das membranas na superfície das nanopartículas. Além disso, a alta capacidade de internalização intrínseca das NPs-HA-DOX pode ter mascarado eventuais benefícios adicionais conferidos pelo revestimento.

Para elucidar esse ponto, experimentos futuros estão planejados com células normais da linhagem MRC-5, com o objetivo de avaliar se o recobrimento com membranas tumorais pode reduzir a internalização em células saudáveis — o que indicaria seletividade mediada por reconhecimento homotípico. No entanto, contratempos técnicos relacionados à manutenção da linhagem MRC-5 exigiram a aquisição de um novo lote e o reestabelecimento do banco celular, inviabilizando a execução desses ensaios no período atual. Essas análises estão previstas para etapas futuras, em conjunto com testes de internalização em tempos variados de incubação e análises complementares por microscopia confocal. Com base nos dados obtidos nesta etapa, que confirmam a internalização efetiva das formulações, é possível dar continuidade aos ensaios de viabilidade celular para avaliar o desempenho citotóxico das nanopartículas desenvolvidas.



**Figura 20.** Análise por citometria de fluxo das células A549. Para cada amostra, são apresentados dois *dot plots*: dispersão lateral (SSC-H) versus dispersão frontal (FSC-H), mostrando a estratégia de *gating* para seleção da população celular, e SSC-H versus fluorescência no canal FL2-H, com o *gating* aplicado, para avaliação da internalização da DOX com base na emissão de fluorescência. (a) Controle (somente células). (b) Células incubadas com DOX livre (5 µg/mL). (c) Células incubadas com HA-DOX (25,2 µg/mL de NPs contendo 5 µg/mL de DOX). (d) Células incubadas com HA-DOX-MB (25,2 µg/mL de NPs contendo 5 µg/mL de DOX). Tempo de incubação: 4 horas.



**Figura 21.** (a) Histogramas obtidos por citometria de fluxo de células A549 incubadas com DOX livre (5  $\mu\text{g/mL}$ ), HA-DOX e HA-DOX-MB (25,2  $\mu\text{g/mL}$  de NPs contendo 5  $\mu\text{g/mL}$  de DOX) por 4 horas, monitorando a emissão da DOX no canal FL2-H. (b) Quantificação das intensidades médias de fluorescência (média geométrica).

## 5. CONCLUSÃO

Neste estudo, membranas celulares derivadas das linhagens tumorais PANC-1 e A549 foram extraídas com sucesso e reconstituídas na forma de vesículas. As vesículas foram devidamente caracterizadas, confirmando a eficácia do procedimento de obtenção. Nanopartículas de HA carregadas com DOX foram então recobertas com essas membranas, e suas caracterizações também foram realizadas.

Inicialmente, verificou-se que as nanopartículas HA-DOX não apresentaram toxicidade satisfatória frente à linhagem PANC-1, segundo o ensaio de MTT. Além disso, observou-se uma toxicidade maior em células HepaRG (modelo saudável), sugerindo que a linhagem tumoral pancreática possui mecanismos de resistência que limitam a ação das nanopartículas. Diante disso, decidiu-se redirecionar o foco para o câncer de pulmão, utilizando a linhagem A549.

Os ensaios de MTT e de citotoxicidade revelaram um desempenho promissor das HA-DOX na linhagem A549, evidenciando seu potencial para aplicação no tratamento do câncer de pulmão. Adicionalmente, ensaios de internalização por citometria de fluxo demonstraram que a DOX conjugada à superfície das nanopartículas apresentou maior internalização celular em comparação com o fármaco livre. No entanto, não foram observadas variações significativas na internalização celular após o recobrimento com membranas tumorais.

Devido a contratempos experimentais e à troca de linhagem celular ao longo do projeto, ensaios adicionais são necessários para uma compreensão mais abrangente do sistema e sua otimização. Em especial, sugere-se a realização de experimentos de internalização utilizando células normais (MRC-5) para verificar se, mesmo sem aumento da internalização nas células tumorais, o recobrimento é capaz de reduzir a captação pelas células normais, o que indicaria um efeito de reconhecimento homotípico conferido pelo sistema biomimético.

Uma vez confirmada essa seletividade, os próximos passos incluem a realização de ensaios de viabilidade celular pelo MTT e microscopia confocal, além de caracterizações complementares como microscopia eletrônica e espectroscopias vibracionais, a fim de elucidar de forma mais completa a estrutura, funcionalidade e desempenho terapêutico das nanopartículas desenvolvidas.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA

AMERICAN CANCER SOCIETY. *Cancer Facts & Figures 2023*. Atlanta: American Cancer Society, 2023.

AMRUTKAR, Manoj; GLADHAUG, Ivar P. Pancreatic cancer chemoresistance to gemcitabine. *Cancers*, [S. l.], v. 9, n. 11, p. 1–23, 2017. DOI: 10.3390/cancers9110157.

ANDREWS, G. J. Complementary and Alternative Medicine. **International Encyclopedia of Human Geography: Volume 1-12**, [S. l.], v. 1–12, p. V2-234-V2-238, 2009. DOI: 10.1016/B978-008044910-4.00325-4.

BEH, Chaw Yee; PRAJNAMITRA, Ray Putra; CHEN, Li Lun; HSIEH, Patrick Ching Ho. Advances in biomimetic nanoparticles for targeted cancer therapy and diagnosis. *Molecules*, [S. l.], v. 26, n. 16, 2021. DOI: 10.3390/molecules26165052.

BISHAYEE, Anupam; KAMAL, Mohammad Amjad. Special issue: Current vision on target enzymes for cancer therapy. *Seminars in Cancer Biology*, [S. l.], v. 56, n. November 2018, p. iii–v, 2019. DOI: 10.1016/j.semcancer.2018.11.010.

BOBO, Daniel; ROBINSON, Kye J.; ISLAM, Jiaul; THURECHT, Kristofer J.; CORRIE, Simon R. Nanoparticle-Based Medicines: A Review of FDA-Approved Materials and Clinical Trials to Date. *Pharmaceutical Research*, [S. l.], v. 33, n. 10, p. 2373–2387, 2016. DOI: 10.1007/s11095-016-1958-5. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s11095-016-1958-5>.

BOIX-MONTESINOS, Paz; SORIANO-TERUEL, Paula M.; ARMIÑÁN, Ana; ORZÁEZ, Mar; VICENT, María J. The past, present, and future of breast cancer models for nanomedicine development. *Advanced Drug Delivery Reviews*, [S. l.], v. 173, p. 306–330, 2021. DOI: 10.1016/j.addr.2021.03.018.

CARVALHO, Cristina; SANTOS, Renato; CARDOSO, Susana; CORREIA, Sonia; OLIVEIRA, Paulo; SANTOS, Maria; MOREIRA, Paula. Doxorubicin: The Good, the Bad and the Ugly Effect. *Current Medicinal Chemistry*, [S. l.], v. 16, n. 25, p. 3267–3285, 2009. DOI: 10.2174/092986709788803312.

CONROY, Thierry et al. FOLFIRINOX versus Gemcitabine for Metastatic Pancreatic Cancer. *New England Journal of Medicine*, [S. l.], v. 364, n. 19, p. 1817–1825, 2011. DOI: 10.1056/nejmoa1011923.



- DUMA, Narjust; SANTANA-DAVILA, Rafael; MOLINA, Julian R. Non-Small Cell Lung Cancer: Epidemiology, Screening, Diagnosis, and Treatment. **Mayo Clinic Proceedings**, [S. l.], v. 94, n. 8, p. 1623–1640, 2019. DOI: 10.1016/j.mayocp.2019.01.013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.mayocp.2019.01.013>.
- ETTINGER, David S. et al. Non-small cell lung cancer, Version 2.2021 featured updates to the NCCN guidelines. **JNCCN Journal of the National Comprehensive Cancer Network**, [S. l.], v. 19, n. 3, p. 254–266, 2021. DOI: 10.6004/jnccn.2021.0013.
- FACTS, Lung Cancer. Testing for lung cancer in people at high risk. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, [S. l.], v. 63, n. 2, p. 118–119, 2013. DOI: 10.3322/caac.21177.
- FANG, Ronnie H.; KROLL, Ashley V.; GAO, Weiwei; ZHANG, Liangfang. Cell Membrane Coating Nanotechnology. **Advanced Materials**, [S. l.], v. 30, n. 23, p. 1–34, 2018. DOI: 10.1002/adma.201706759.
- GAO, Changyong; LIN, Zhihua; JURADO-SÁNCHEZ, Beatriz; LIN, Xiankun; WU, Zhiguang; HE, Qiang. Stem Cell Membrane-Coated Nanogels for Highly Efficient In Vivo Tumor Targeted Drug Delivery. **Small (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)**, [S. l.], v. 12, n. 30, p. 4056–4062, 2016. DOI: 10.1002/smll.201600624.
- GILLEN, Sonja; SCHUSTER, Tibor; BÜSCHENFELDE, Christian Meyer Zum; FRIESS, Helmut; KLEEFF, Jörg. Preoperative/neoadjuvant therapy in pancreatic cancer: A systematic review and meta-analysis of response and resection percentages. **PLoS Medicine**, [S. l.], v. 7, n. 4, p. 1–15, 2010. DOI: 10.1371/journal.pmed.1000267.
- GOMEZ, Daniel R. et al. The Use of Radiation Therapy for the Treatment of Malignant Pleural Mesothelioma: Expert Opinion from the National Cancer Institute Thoracic Malignancy Steering Committee, International Association for the Study of Lung Cancer, and Mesothelioma Applied Re. **Journal of Thoracic Oncology**, [S. l.], v. 14, n. 7, p. 1172–1183, 2019. DOI: 10.1016/j.jtho.2019.03.030. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jtho.2019.03.030>.
- GOTTESMAN, Michael M.; FOJO, Tito; BATES, Susan E. Multidrug resistance in cancer: Role of ATP-dependent transporters. **Nature Reviews Cancer**, [S. l.], v. 2, n. 1, p. 48–58, 2002. DOI: 10.1038/nrc706.
- GUO, Lanwei; ZHU, Chenxin; CAI, Lin; ZHANG, Xinglong; FANG, Yi; CHEN, Hongda; YANG, Haiyan. Global burden of lung cancer in 2022 and projected burden in 2050. **Chinese Medical Journal**, [S. l.], v. 93, n. July, p. 102693, 2024. DOI: 10.1097/CM9.0000000000003268. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.canep.2024.102693>.
- HONARY, S.; ZAHIR, F. Effect of Zeta Potential on the Properties of Nano-Drug Delivery Systems - A Review (Part 1). **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, [S. l.], v. 12, n. 2, p. 255–264, 2013.
- HOWINGTON, John A.; BLUM, Matthew G.; CHANG, Andrew C.; BALEKIAN, Alex A.; MURTHY, Sudish C. Treatment of stage I and II non-small cell lung cancer: Diagnosis and management of lung cancer, 3rd ed: American college of chest physicians evidence-based clinical practice guidelines. **Chest**, [S. l.], v. 143, n. 5 SUPPL, p. e278S–e313S, 2013. DOI: 10.1378/chest.12-2359. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1378/chest.12-2359>.
- KASIMIR-BAUER, Sabine; KEUP, Corinna; HOFFMANN, Oliver; HAUCH, Siegfried; KIMMIG, Rainer; BITTNER, Ann Kathrin. Circulating Tumor Cells Expressing the Prostate Specific Membrane Antigen (PSMA) Indicate Worse Outcome in Primary, Non-Metastatic Triple-Negative Breast Cancer. **Frontiers in Oncology**, [S. l.], v. 10, n. September, p. 1–12, 2020. DOI: 10.3389/fonc.2020.01658.
- KAY GARCIA, M.; MCQUADE, Jennifer; HADDAD, Robin; PATEL, Sonya; LEE, Richard; YANG, Peiying; LYNN PALMER, J.; COHEN, Lorenzo. Systematic review of acupuncture in cancer care: A synthesis of the evidence. **Journal of Clinical Oncology**, [S. l.], v. 31, n. 7, p. 952–960, 2013.

DOI: 10.1200/JCO.2012.43.5818.

KHALIFEHZADEH, Razieh; ARAMI, Hamed. Biodegradable calcium phosphate nanoparticles for cancer therapy. **Advances in Colloid and Interface Science**, [S. l.], v. 279, p. 102157, 2020. DOI: 10.1016/j.cis.2020.102157. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cis.2020.102157>.

LIU, Yao; LUO, Jingshan; CHEN, Xiaojia; LIU, Wei; CHEN, Tongkai. **Cell Membrane Coating Technology: A Promising Strategy for Biomedical Applications**. [s.l.] : Springer Singapore, 2019. v. 11 DOI: 10.1007/s40820-019-0330-9. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s40820-019-0330-9>.

MACHADO, T. R. *et al.* Amorphous calcium phosphate nanoparticles allow fingerprint detection via self-activated luminescence. **Chemical Engineering Journal** **443**, (2022).

MACHADO, T. R. *et al.* Tailoring the structure and self-activated photoluminescence of carbonated amorphous calcium phosphate nanoparticles for bioimaging applications. **J Mater Chem B** (2024) doi:10.1039/d3tb02915h.

MAEDA, Hiroshi; NAKAMURA, Hideaki; FANG, Jun. The EPR effect for macromolecular drug delivery to solid tumors: Improvement of tumor uptake, lowering of systemic toxicity, and distinct tumor imaging in vivo. **Advanced Drug Delivery Reviews**, [S. l.], v. 65, n. 1, p. 71–79, 2013. DOI: 10.1016/j.addr.2012.10.002. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2012.10.002>.

MAINDET, Caroline; BURNOD, Alexis; MINELLO, Christian; GEORGE, Brigitte; ALLANO, Gilles; LEMAIRE, Antoine. Strategies of complementary and integrative therapies in cancer-related pain—attaining exhaustive cancer pain management. **Supportive Care in Cancer**, [S. l.], v. 27, n. 8, p. 3119–3132, 2019. DOI: 10.1007/s00520-019-04829-7.

MATUO, Renata; SOUSA, Fabrício Garmus; ESCARGUEIL, Alexandre E.; SOARES, Daniele G.; GRIVICICH, Ivana; SAFFI, Jenifer; LARSEN, Annette K.; HENRIQUES, João Antonio Pêgas. DNA repair pathways involved in repair of lesions induced by 5-fluorouracil and its active metabolite FdUMP. **Biochemical Pharmacology**, [S. l.], v. 79, n. 2, p. 147–153, 2010. DOI: 10.1016/j.bcp.2009.08.016.

MINOTTI, Giorgio; MENNA, Pierantonio; SALVATORELLI, Emanuela; CAIRO, Gaetano; GIANNI, Luca. Anthracyclines: Molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. **Pharmacological Reviews**, [S. l.], v. 56, n. 2, p. 185–229, 2004. DOI: 10.1124/pr.56.2.6. Disponível em: <https://doi.org/10.1124/pr.56.2.6>.

MUKUND, Ashwin; AFRIDI, Muhammad Ali; KAROLAK, Aleksandra; PARK, Margaret A.; PERMUTH, Jennifer B.; RASOOL, Ghulam. Pancreatic Ductal Adenocarcinoma (PDAC): A Review of Recent Advancements Enabled by Artificial Intelligence. **Cancers**, [S. l.], v. 16, n. 12, p. 1–23, 2024. DOI: 10.3390/cancers16122240.

NEUZILLET, Cindy; TIJERAS-RABALLAND, Annemiläi; BOURGET, Philippe; CROS, Jérôme; COUVELARD, Anne; SAUVANET, Alain; VULLIERME, Marie Pierre; TOURNIGAND, Christophe; HAMMEL, Pascal. State of the art and future directions of pancreatic ductal adenocarcinoma therapy. **Pharmacology and Therapeutics**, [S. l.], v. 155, p. 80–104, 2015. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2015.08.006. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pharmthera.2015.08.006>.

ØTERLIND, K. Chemotherapy in small cell lung cancer. **European Respiratory Journal**, [S. l.], v. 18, n. 6, p. 1026–1043, 2001. DOI: 10.1183/09031936.01.00266101.

PEER, Dan; KARP, Jeffrey M.; HONG, Seungpyo; FAROKHZAD, Omid C.; MARGALIT, Rimona; LANGER, Robert. Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy. **Nature Nanotechnology**, [S. l.], v. 2, n. 12, p. 751–760, 2007. DOI: 10.1038/nnano.2007.387.

PELAZ, Beatriz et al. Diverse Applications of Nanomedicine. **ACS Nano**, [S. l.], v. 11, n. 3, p. 2313–2381, 2017. DOI: 10.1021/acsnano.6b06040.

PETERS, S.; ADJEI, A. A.; GRIDELLI, C.; RECK, M.; KERR, K.; FELIP, E. Metastatic non-small-cell lung cancer (NSCLC): ESMO clinical practice guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. **Annals of Oncology**, [S. l.], v. 23, n. SUPPL. 7, p. vii56–vii64, 2012. DOI: 10.1093/annonc/mds226. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1093/annonc/mds226>.

RAHIB, Lola; SMITH, Benjamin D.; AIZENBERG, Rhonda; ROSENZWEIG, Allison B.; FLESHMAN, Julie M.; MATRISIAN, Lynn M. Projecting cancer incidence and deaths to 2030: The unexpected burden of thyroid, liver, and pancreas cancers in the united states. **Cancer Research**, [S. l.], v. 74, n. 11, p. 2913–2921, 2014. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-14-0155.

REN, Yulin; CARCACHE DE BLANCO, Esperanza J.; FUCHS, James R.; SOEJARTO, Djaja D.; BURDETTE, Joanna E.; SWANSON, Steven M.; KINGHORN, A. Douglas; MATA, Rachel; TIMMERMAN, Barbara. Potential Anticancer Agents Characterized from Selected Tropical Plants. **J. Nat. Prod.**, [S. l.], v. 82, p. 43, 2019. DOI: 10.1021/acs.jnatprod.9b00018. Disponível em: <https://pubs.acs.org/sharingguidelines>.

SADAT-SHOJAI, Mehdi; KHORASANI, Mohammad Taghi; DINPANAH-KHOSHDARGI, Ehsan; JAMSHIDI, Ahmad. Synthesis methods for nanosized hydroxyapatite with diverse structures. **Acta Biomaterialia**, [S. l.], v. 9, n. 8, p. 7591–7621, 2013. DOI: 10.1016/j.actbio.2013.04.012. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2013.04.012>.

SARFRAZ, Zouina; ANWAR, Junaid. Navigating the future of pancreatic cancer treatment: Systematic review insights from immunotherapy clinical trials. **Journal of Clinical Oncology**, [S. l.], v. 42, n. 23\_suppl, p. 68–68, 2024. DOI: 10.1200/jco.2024.42.23\_suppl.68.

SHERPALLY, Deepak; MANNE, Ashish. Advancing Immunotherapy in Pancreatic Cancer: A Brief Review of Emerging Adoptive Cell Therapies. **Cancers**, [S. l.], v. 17, n. 4, p. 0–15, 2025. DOI: 10.3390/cancers17040589.

SHI, Hui; ZHOU, Ziqi; LI, Wuda; FAN, Yuan; LI, Zhihua; WEI, Junchao. Hydroxyapatite based materials for bone tissue engineering: A brief and comprehensive introduction. **Crystals**, [S. l.], v. 11, n. 2, p. 1–18, 2021. DOI: 10.3390/cryst11020149.

SHI, Jinjun; KANTOFF, Philip W.; WOOSTER, Richard; FAROKHZAD, Omid C. Cancer nanomedicine: Progress, challenges and opportunities. **Nature Reviews Cancer**, [S. l.], v. 17, n. 1, p. 20–37, 2017. DOI: 10.1038/nrc.2016.108. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/nrc.2016.108>.

SIEGEL, Rebecca L.; MILLER, Kimberly D.; WAGLE, Nikita Sandeep; JEMAL, Ahmedin. Cancer statistics, 2023. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, [S. l.], v. 73, n. 1, p. 17–48, 2023. DOI: 10.3322/caac.21763.

SPRINGFELD, Christoph; JÄGER, Dirk; BÜCHLER, Markus W.; STROBEL, Oliver; HACKERT, Thilo; PALMER, Daniel H.; NEOPTOLEMOS, John P. Chemotherapy for pancreatic cancer. **Presse Medicale**, [S. l.], v. 48, n. 3P2, p. e159–e174, 2019. DOI: 10.1016/j.lpm.2019.02.025. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.lpm.2019.02.025>.

STEFAN WILHELM, ANTHONY J. TAVARES, QIN DAI, SEIICHI OHTA, JULIE AUDET, Harold F. Dvorak and Warren C. W. Chan. Analysis of nanoparticle delivery to tumours. **NATURE REVIEWS Materials**, [S. l.], v. 16, n. 3, p. 1–12, 2016.

SUNG, Hyuna; FERLAY, Jacques; SIEGEL, Rebecca L.; LAVERSANNE, Mathieu; SOERJOMATARAM, Isabelle; JEMAL, Ahmedin; BRAY, Freddie. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, [S. l.], v. 71, n. 3, p. 209–249, 2021. DOI: 10.3322/caac.21660.

TACAR, Oktay; SRIAMORNSAK, Pornsak; DASS, Crispin R. Doxorubicin: An update on anticancer

molecular action, toxicity and novel drug delivery systems. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, [S. l.], v. 65, n. 2, p. 157–170, 2013. DOI: 10.1111/j.2042-7158.2012.01567.x.

TIRPE, Alexandru; STREIANU, Cristian; ISACHESKU, Ekaterina; SIMON, Ioan; BERINDAN-NEAGOE, Ioana. The road to overcome pancreatic cancer: Where are we? **Heliyon**, [S. l.], v. 10, n. 19, p. e38196, 2024. DOI: 10.1016/j.heliyon.2024.e38196. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e38196>.

TRAVIS, William D. et al. The 2015 World Health Organization Classification of Lung Tumors: Impact of Genetic, Clinical and Radiologic Advances since the 2004 Classification. **Journal of Thoracic Oncology**, [S. l.], v. 10, n. 9, p. 1243–1260, 2015. DOI: 10.1097/JTO.0000000000000630. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1097/JTO.0000000000000630>.

VASAN, Neil; BASELGA, José; HYMAN, David M. A view on drug resistance in cancer. **Nature**, [S. l.], v. 575, n. 7782, p. 299–309, 2019. DOI: 10.1038/s41586-019-1730-1. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/s41586-019-1730-1>.

VON HOFF, Daniel D. et al. Increased Survival in Pancreatic Cancer with nab-Paclitaxel plus Gemcitabine. **New England Journal of Medicine**, [S. l.], v. 369, n. 18, p. 1691–1703, 2013. DOI: 10.1056/nejmoa1304369.

WANG, Xuan; HUA, Peng; HE, Chengwei; CHEN, Meiwang. Non-apoptotic cell death-based cancer therapy: Molecular mechanism, pharmacological modulators, and nanomedicine. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, [S. l.], v. 12, n. 9, p. 3567–3593, 2022. DOI: 10.1016/j.apsb.2022.03.020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2022.03.020>.

WENZEL, Patrick; MOGLER, Carolin; GÖRGÜLÜ, Kıvanç; ALGÜL, Hana. Pancreatic Cancer: Current Concepts, Trends, and Future Directions. **Turkish Journal of Gastroenterology**, [S. l.], v. 36, n. 2, p. 69–81, 2025. DOI: 10.5152/tjg.2024.24544.

YING, Haoqiang; DEY, Prasenjit; YAO, Wantong; KIMMELMAN, Alec C.; DRAETTA, Giulio F.; MAITRA, Anirban; DEPINHO, Ronald A. Genetics and biology of pancreatic ductal adenocarcinoma. **Genes and Development**, [S. l.], v. 30, n. 4, p. 355–385, 2016. DOI: 10.1101/gad.275776.115.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. *Cancer Fact Sheet*. Geneva: WHO, 2020. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>. Acesso em: 12 abr. 2025.