

BIOTRANS

Programa de Pós-Graduação em
Biomedicina Translacional

Mestrado e Doutorado



CLAUDIANE SANTOS MAXIMIANO DA SILVA

**HIPERTERMIA MAGNÉTICA AUTORREGULADA INDUZIDA POR
NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS:
VALIDAÇÃO BIOLÓGICA *IN VITRO* PARA ABORDAGEM TERAPÊUTICA
ONCOLÓGICA**

Duque de Caxias

2025

CLAUDIANE SANTOS MAXIMIANO DA SILVA

HIPERTERMIA MAGNÉTICA AUTORREGULADA INDUZIDA POR
NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS:
VALIDAÇÃO BIOLÓGICA *IN VITRO* PARA ABORDAGEM TERAPÊUTICA
ONCOLÓGICA

Dissertação apresentada ao Programa de Biomedicina Translacional, da Universidade do Grande Rio, como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciências Biomédicas.

Orientadora: Dra. Sara Gemini Piperni

Coorientador: Dr. Marcel Guimarães Martins

Duque de Caxias

2025

BIOTRANS

Programa de Pós-Graduação em Biomedicina Translacional

Mestrado e Doutorado



UNIGRANRIO Atya



ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO

Às 09:30 horas, do dia 31 de março de 2025, o Programa de Pós-Graduação em Biomedicina Translacional, realizou sessão de Defesa da Dissertação versando sobre o projeto intitulado "Hipertermia magnética autorregulada induzida por nanopartículas magnéticas: validação biológica in vitro para abordagem terapêutica oncológica", de autoria de Claudiane Santos Maximiano da Silva, aluna do Mestrado Acadêmico, sob orientação da Professora Sara Gemini Pipemi e do Professor Marcel Guimarães Martins. A sessão foi aberta pelo Prof. Celso Barbosa de Sant'Anna Filho, presidente da Comissão, que nos termos regimentais convocou os demais Membros da Comissão Examinadora: Profa. Priscilla vanessa finotelli e Prof. Victor do Valle Pereira Midlej. Em seguida, passou à palavra a candidata para apresentação de seu trabalho. Após a apresentação, a candidata foi arguida pelos examinadores e suas respostas foram consideradas Satisfatórias.

O presidente declarou a mestranda Claudiane Santos Maximiano da Silva Aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Biomédicas, de acordo como o Regulamento do Programa de Pós-Graduação em Biomedicina Translacional do convênio tripartite entre UNIGRANRIO, INMETRO e UERJ. Nada mais havendo a tratar, o Presidente encerrou a sessão, em que foi lavrada a presente ata, que será assinada pelos Membros da Comissão Examinadora.

Duque de Caxias, 31 de março de 2025.

Prof. Dr. Celso Barbosa de Sant'Anna Filho
Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia - INMETRO
Presidente da banca

Profa. Dra. Priscilla vanessa finotelli
Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ

Prof. Dr. Victor do Valle Pereira Midlej
Fundação Oswaldo Cruz - FIOCRUZ/IOC

Prof. Dr. Sergian Vianna Cardozo
Coordenador Geral
Programa de Pós-Graduação em Medicina Translacional - BIOTRANS

Prof. Dr. Sergian Vianna Cardozo
Coordenador do PPG em Biomedicina
Translacional - BIOTRANS
UNIGRANRIO

BIOTRANS

Programa de Pós-Graduação em Biomedicina Translacional

Mestrado e Doutorado



(I) *Aprovada com Ressalvas e Modificações*

Comentários:

NÃO SE APLICA.

Presidente:

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UNIGRANRIO – NÚCLEO DE COORDENAÇÃO DE BIBLIOTECAS

S586h Silva, Claudiane Santos Maximiano da.

Hipertermia magnética autorregulada induzida por nanopartículas magnéticas: validação biológica *in vitro* para abordagem terapêutica oncológica / Claudiane Santos Maximiano da Silva. – Duque de Caxias, Rio de Janeiro, 2025.

75 f.: il.

Orientadora: Dra. Sara Gemini Piperni.

Coorientador: Dr. Marcel Guimarães Martins.

Dissertação (mestrado) – Universidade do Grande Rio “Prof. José de Souza Herdy”, Escola de Ciência da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Biomedicina Translacional, Rio de Janeiro, 2025.

1. Corona proteica. 2. Danos celulares irreversíveis. 3. Nanotecnologia biomédica. I. Piperni, Sara Gemini. II. Martins, Marcel Guimarães. III. Título. IV. Universidade do Grande Rio “Prof. José de Souza Herdy”.

CDD: 610

Rodrigo de Oliveira Brainer CRB-7: 6814

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Jeová, meu Deus, por me conceder força, sabedoria e perseverança para trilhar este caminho, permitindo-me superar desafios e seguir em frente.

À minha mãe, Claudia Weler dos Santos, meu mais profundo e incondicional agradecimento. Obrigada por todo amor, apoio e dedicação ao longo da minha vida, por cada esforço feito para que eu pudesse chegar até aqui e por ser meu porto seguro em todos os momentos. Sem você, nada disso seria possível.

Ao meu namorado, Marco Aurélio Santos de Souza Filho, por estar sempre ao meu lado, incentivando-me a acreditar no meu potencial, celebrando cada conquista e me dando forças nos momentos difíceis. Sua torcida, apoio e confiança foram essenciais nessa jornada.

Aos meus orientadores, Professores Sara Gemini Piperni e Marcel Guimarães Martins, minha gratidão pela oportunidade, confiança, atenção e por compartilharem tanto conhecimento ao longo dessa trajetória. Vocês são verdadeiros exemplos de profissionais que me inspiram a cada dia.

À minha orientadora, Professora Sara Gemini Piperni, um agradecimento especial. Obrigada por acreditar em mim desde o início, por me permitir seguir o caminho da pesquisa científica e por ser mais do que uma orientadora: uma amiga e mentora. Seus ensinamentos diários, seu apoio incondicional e sua capacidade de me guiar mesmo nos momentos mais difíceis foram fundamentais para meu crescimento acadêmico e pessoal. Serei eternamente grata por tudo que aprendi com você.

Ao Victor Midlej, meu sincero agradecimento por todo o conhecimento compartilhado e por sempre me guiar pelo caminho certo na pesquisa. Sua paciência, apoio e incentivo fizeram uma enorme diferença na minha trajetória. Além de um excelente profissional, tornou-se um grande amigo, e sou imensamente grata por isso.

Aos grupos de pesquisa do Laben e Fiocruz (LBE), minha gratidão por toda a ajuda ao longo dessa jornada. O companheirismo e as amizades construídas nesses ambientes me acompanharão para sempre. Agradeço especialmente a Heshiley, Alana, Rafaela, Mariana, Thiago, Thamires, Julliana, Manu, Maria Carolina, Anna, Bruno, José Raphael, Célio, Marla, Sandra, Rômulo, Roger, Wendrell, Sr. Gê e Sr. Zé.

Às amigas que conquistei ao longo do mestrado, Rosilaine e Cassiane, e aos meus colegas de turma, por compartilharem comigo essa caminhada e celebrarem cada conquista ao meu lado.

A todos os colaboradores e amigos que, direta ou indiretamente, fizeram parte desse sonho e contribuíram com seu conhecimento, apoio e incentivo em cada etapa desta jornada, meu mais sincero muito obrigada!

À Unigranrio e ao programa de pós-graduação Biotrans, bem como a todos os professores que o compõem, minha gratidão pelo suporte acadêmico e científico.

Agradeço também à FAPERJ, CAPES e CNPq pelo apoio financeiro, essencial para o desenvolvimento deste trabalho.

RESUMO

O câncer é uma das principais causas de morte global e foi registrado um aumento de 400% no custo de tratamento nos últimos 4 anos. A hipertermia magnética via nanopartículas magnéticas (NPs) é uma abordagem promissora para terapia oncológica. O aumento de temperatura localizado, induzido pela presença das NPs no ambiente tumoral, promove a morte seletiva de células cancerosas, quando submetidas a um campo magnético alternado. No entanto, tal abordagem apresenta limitações quanto ao controle de liberação de calor dos nanossistemas empregados, podendo causar danos ao organismo em temperaturas superiores à terapêutica (42 °C). Neste contexto, o objetivo do trabalho é avaliar a formação de corona proteica e vias de internalização dos nanossistemas, além dos efeitos da aplicação de campo magnético alternado em modelos de osteossarcoma, após internalização de nanopartículas magnéticas de óxido de ferro, puras (NPMp) e dopadas com Zn/Co/Cr (NPMd). A caracterização confirmou a presença de magnetita e comportamento superparamagnético em ambas as amostras além de autoregulação térmica nas NPMd. As micrografias de MET mostraram morfologia esférica com diâmetro de 10 ± 2 nm, para a amostra pura (NPMp), e formato cúbico com aresta de 20 ± 2 nm, para a amostra dopada (NPMd). A análise de DLS apresentou uma distribuição de diâmetro hidrodinâmico bimodal em torno de 100 e 1000 nm para ambas as partículas, tanto em água quanto em meio de cultura. A diminuição do potencial zeta em meio de cultura e a análise de FTIR confirmaram a adsorção de proteínas nas nanopartículas. A espectrometria de massa identificou 15 proteínas comuns entre os nanossistemas e 161 adsorvidas exclusivamente na NPMd, sendo estas preferencialmente internalizadas por endocitose mediada por clatrina e raft lipídico. Antes da exposição ao campo magnético, a análise de MTT demonstrou a segurança das partículas até a concentração de 300 µg/ml. Após a exposição ao campo, a redução dos esferoides apresenta um efeito cumulativo significativo com danos irreversíveis na ultraestrutura celular após 4 ciclos de exposição de campo magnético para ambas as partículas quando comparadas com o controle, mas sem diferenças significativas entre as duas amostras. Contudo, este efeito é antecipado ao 3 ciclo nas células em contato com NPMp sugerindo que a dopagem das NPMd autorreguladas potencializa os efeitos cumulativos da aplicação de campo. Esses avanços visam consolidar a aplicação terapêutica das NPs, otimizando sua utilização em tratamentos multimodais e na liberação controlada de medicamentos, fortalecendo sua viabilidade clínica.

Palavras-Chave: Nanotecnologia biomédica; Danos celulares irreversíveis; corona proteica.

ABSTRACT

Cancer is one of the leading causes of global mortality, with a 400% increase in treatment costs over the past four years. Magnetic hyperthermia via magnetic nanoparticles (NPs) is a promising approach for oncological therapy. The localized temperature increase, induced by the presence of NPs in the tumor environment, promotes the selective death of cancer cells when subjected to an alternating magnetic field. However, this approach presents limitations in controlling the heat release of the employed nanosystems, potentially causing harm to the body at temperatures above the therapeutic threshold (42 °C). In this context, the objective of this study is to evaluate the formation of the protein corona and the internalization pathways of nanosystems, as well as the effects of applying an alternating magnetic field in osteosarcoma models, after the internalization of pure iron oxide magnetic nanoparticles (NPMp) and those doped with Zn/Co/Cr (NPMd). Characterization confirmed the presence of magnetite and superparamagnetic behavior in both samples, as well as thermal self-regulation in NPMd. TEM micrographs showed a spherical morphology with a diameter of 10 ± 2 nm for the pure sample (NPMp) and a cubic shape with an edge length of 20 ± 2 nm for the doped sample (NPMd). DLS analysis revealed a bimodal hydrodynamic diameter distribution around 100 and 1000 nm for both particles, in both water and culture medium. The reduction in zeta potential in culture medium and FTIR analysis confirmed protein adsorption on the nanoparticles. Mass spectrometry identified 15 proteins commonly adsorbed on both nanosystems and 161 exclusively adsorbed on NPMd, which were preferentially internalized via clathrin- and lipid raft-mediated endocytosis. Before magnetic field exposure, MTT analysis demonstrated particle safety up to a concentration of 300 µg/ml. After exposure, the spheroid reduction exhibited a significant cumulative effect, with irreversible ultrastructural damage after four cycles of magnetic field exposure for both particles compared to the control, with no significant differences between the two samples. However, this effect occurred earlier in the third cycle for cells in contact with NPMp, suggesting that the doping of self-regulated NPMd enhances the cumulative effects of field application. These advances aim to consolidate the therapeutic application of NPs, optimizing their use in multimodal treatments and controlled drug release, strengthening their clinical feasibility.

Keywords: Biomedical nanotechnology; Irreversible cellular damage; Protein corona.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Estimativa de mortalidade de Câncer no Brasil, 2023-2025.....	14
Figura 2: Diferença entre as formas de hipertermia que proporciona o aquecimento tecidual cancerígeno	20
Figura 3: Representação esquemática do tratamento de câncer por hipertermia magnética, empregando nanopartículas magnéticas	21
Figura 4: Representação esquemática de diferentes vias endocíticas	23
Figura 5: Gráfico de DRX gerado confirma que o biomaterial é uma nanopartícula de óxido de ferro	37
Figura 6: Curvas de magnetização para as amostras de nanopartículas pura (NPMp) e dopada (NPMd) com suas respectivas ampliações da curva de histerese em função do campo magnético aplicado a 300 K	39
Figura 7: Análise de Hipertermia das nanopartículas magnéticas, demonstrando a autorregulação térmica da NPMd e a elevada temperatura da NPMp	40
Figura 8: A análise de microscopia eletrônica de transmissão (MET) das nanopartículas magnéticas revelou características distintas na morfologia entre as amostras	41
Figura 9: A análise de Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS) das nanopartículas magnéticas, mostrando as medidas de tamanho das partículas..	42
Figura 10: Gráficos resultantes da leitura de FTIR, demonstrando a presença de Fe-O e grupo amida nas nanopartículas magnéticas (NPMp) e nanopartículas magnéticas dopadas (NPMd)	44
Figura 11: Gráfico ilustrativo do total de proteínas encontradas nas amostras de nanopartículas magnéticas pura (NPMp) e nanopartículas magnéticas dopadas (NPMd) após o contato com meio de cultura	44

Figura 12: Proteômica (A): Demonstração das proteínas mais abundantes na nanopartícula magnética pura (NPMp), (B) Demonstração das proteínas mais abundantes na nanopartícula magnética dopada (NPMd)	46
Figura 13: Viabilidade celular (%) das células SAOS-2 tratadas com NPMp e NPMd, avaliada pelo ensaio de MTT conforme a ISO 10993-5/2009	48
Figura 14: Análise da internalização das nanopartículas NPMp e NPMd por microscopia confocal	50
Figura 15: Efeito da exposição cumulativa do campo magnético aos esferóides.	56
Figura 16: Análise da área de elipse dos esferóides após aplicação do campo magnético	57
Figura 17: (A) Cortes centrais dos esferóides (XY, XZ, YZ) mostrando a distribuição das nanopartículas. (B) Reconstrução 3D evidenciando a distribuição das NPMp ao longo dos ciclos de campo magnético, enquanto as NPMd mantêm uma distribuição homogênea	61
Figura 18: Análise por microscopia eletrônica de transmissão (MET) demonstrando as alterações morfológicas induzidas pela hipertermia magnética nos esferóides tumorais tratados com nanopartículas magnéticas	64
Figura 19: Análise por microscopia eletrônica de transmissão (MET) demonstrando as alterações morfológicas induzidas pela hipertermia magnética nos esferóides tumorais tratados com nanopartículas magnéticas	66

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1: Inibidores de endocitose e seus mecanismos de ação	25
Quadro 2: Inibidores de vias endocíticas	34
Quadro 3: Parâmetros de aplicação do campo magnético alternado	35
Quadro 4: Descrição de proteínas compartilhadas entre as nanopartículas analisadas	45
Tabela 1: Análise de Potencial Zeta das nanopartículas magnéticas, demonstrando o aumento da carga de superfície quando em contato com meio de cultura	43

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
1.1	CÂNCER	14
1.1.1	Definição e estatística	Erro! Indicador não definido.
1.1.2	Osteossarcoma	15
1.1.3	Tratamentos oncológicos modernos	16
1.2	ABORDAGEM TERAPÊUTICA COM NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS DE ÓXIDO DE FERRO 18	
1.2.1	Óxido de Ferro Nanoestruturado	18
1.2.2	Hipertermia Magnética	19
1.2.3	Endocitose: vias de internalização de matérias nanoestruturados	23
2	JUSTIFICATIVA	27
3	OBJETIVO	28
3.1	OBJETIVO GERAL	28
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	28
4	METODOLOGIA	29
4.1	NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS DE ÓXIDO DE FERRO	29
4.1.1	Síntese de nanopartículas de óxido de ferro pura (NPMp)	29
4.1.2	Síntese de nanopartículas de óxido de ferro dopadas (NPMd)	29
4.1.3	Marcação fluorescente das NPs	29
4.2	CARACTERIZAÇÕES DO BIOMATERIAL	30
4.2.1	Difração de Raio X (DRX)	30
4.2.2	Medidas de magnetização	30
4.2.3	Hipertermia Magnética	30
4.2.4	Microscopia eletrônica de transmissão (MET)	31
4.2.5	Espalhamento dinâmico de luz (DLS)	31
4.2.6	Potencial Zeta	32
4.2.7	Espectrometria no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)	32
4.2.8	Espectrometria de massas	32

4.3	VALIDAÇÃO CELULAR	33
4.3.1	Cultura celular 2D e 3D	34
4.3.2	Ensaio de Viabilidade Celular (MTT) em Células SAOS-2	34
4.3.3	Inibição das vias de internalização	35
4.3.4	Hipertermia das células 3D expostas ao campo magnético alternado	36
4.3.5	Marcação fluorescente das células 2D e 3D.	36
4.3.6	Microtomografia computadorizada (microCT).	37
4.3.7	Micrografia por MET	37
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
5.1	CARACTERIZAÇÃO DOS NANOSISTEMAS	38
5.2	REGIME MAGNÉTICO DAS NPs	39
5.3	PERFIL DE LIBERAÇÃO DE CALOR DOS NANOSISTEMAS	40
5.4	ESTRUTURA MORFOLÓGICA DOS NANOSISTEMAS	41
5.5	DISTRIBUIÇÃO DE DIÂMETRO HIDRODINÂMICO DAS NPs.....	42
5.6	FORMAÇÃO DE PROTEÍNA CORONA	43
5.7	CITOTOXICIDADE (ISO 10993-5/2009)	49
5.8	MECANISMO DE INTERNALIZAÇÃO DAS NPs.....	50
5.9	EFEITO DA HIPERtermia Magnética após aplicação do campo magnético alternado em células 3D: potencial terapêutico para osteossarcoma	55
5.10	ANÁLISE MICROESTRUTURAL DOS ESFERÓIDES DE OSTEOSSARCOMA POR MICROCT APÓS O TRATAMENTO COM HIPERtermia Magnética	60
5.11	INTERNALIZAÇÃO E DISTRIBUIÇÃO DE NPs EM ESFERÓIDES: ANÁLISE MORFOLÓGICA ULTRAESTRUTURAL POR (MET)	64
6	CONCLUSÃO	69
7	PERSPECTIVAS	70
	REFERÊNCIAS.....	72
	APÊNDICE 1 – LISTAGEM DE PROTEÍNAS ANALISADAS EM ESPECTROMETRIA DE MASSAS.....	77

1 INTRODUÇÃO

1.1 Câncer

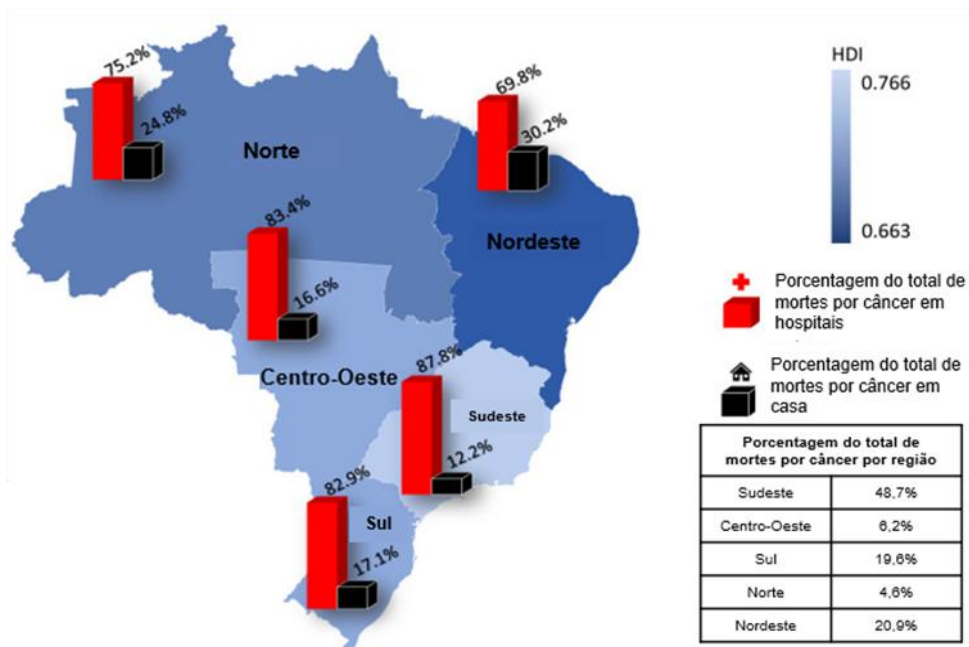
1.1.1 Panorama Epidemiológico do Câncer

O câncer é uma condição caracterizada pelo crescimento descontrolado e anormal das células do corpo. Essas células cancerosas possuem a capacidade de invadir os tecidos circundantes e se disseminar para outras partes do organismo, um processo conhecido como metástase (BAÑOBRE-LÓPEZ et al., 2013). As mutações genéticas, ou seja, as alterações no DNA dos genes, podem ocorrer em células comuns. Essas mutações levam as células a receberem instruções incorretas para suas atividades, desviando-as de sua função normal. É importante destacar que as células podem sofrer mutações genéticas mesmo na ausência de exposição a agentes cancerígenos. Essas mutações, muitas vezes espontâneas, não interferem no desenvolvimento normal das células, mas podem desencadear processos cancerosos quando ocorrem em genes críticos para a regulação do crescimento celular e da divisão.

Existem muitos tipos diferentes de câncer, cada um com características específicas, causas e tratamentos. Alguns dos tipos mais comuns incluem câncer de pele, mama, pulmão, próstata, cólon e reto, além de muitos outros. As causas do câncer podem variar e muitas vezes são multifatoriais, envolvendo uma combinação de fatores genéticos, ambientais e de estilo de vida. Fatores como tabagismo, exposição à radiação, dieta pouco saudável, falta de atividade física e predisposição genética podem aumentar o risco de desenvolver câncer (LIU et al., 2019). A complexidade dinâmica do cenário global do câncer é evidente, desviando-se de uma uniformidade na manifestação do impacto dessa doença. Conforme as observações de (VINEIS et al., 2014), o câncer continua a figurar como uma das principais causas de morte em escala mundial, com sua influência aumentando progressivamente ao longo do tempo. Esse crescimento é observado tanto em países desenvolvidos quanto em desenvolvimento, impulsionado por uma interseção de fatores, como o envelhecimento populacional, o crescimento demográfico, o rápido desenvolvimento socioeconômico e alterações na prevalência de fatores de risco associados (BRAY et al., 2018). Essas mudanças têm contribuído para a ascensão do câncer como a principal causa de morte prematura, diminuindo a expectativa de vida em várias nações (BRUSTUGUN et al., 2014). No Brasil, de acordo com o (Observatório de Oncologia e pelo TJCC), nos últimos 4 anos houve um aumento de 402%, de 2018 a

2022, no custo médio dos procedimentos de tratamento do câncer (quimioterapia, radioterapia e imunoterapia).

Figura 1: Estimativa de mortalidade de Câncer no Brasil, 2023-2025



Fonte: Observatório de Oncologia e pelo TJCC.

No contexto da saúde pública brasileira, as neoplasias malignas ocupam a posição de segunda principal causa de óbitos por doenças, totalizando anualmente cerca de 190 mil mortes (INCA, 2020). As estimativas de incidência e mortalidade por câncer no mundo no final de 2020, fornecidas pelos dados do GLOBOCAN 2020, indicam que o número global de novos casos atingiu 19,3 milhões, resultando em quase 10 milhões de mortes por câncer em 2020 (SUNG et al., 2021).

1.1.2 Osteossarcoma

O osteossarcoma é um tipo raro e agressivo de câncer ósseo que se origina nas células formadoras de ossos, conhecidas como osteoblastos. Este tipo de tumor é mais comum em adolescentes e jovens adultos, com uma incidência maior durante os períodos de crescimento rápido dos ossos, tipicamente entre 10 e 30 anos de idade. Embora possa ocorrer em qualquer osso do corpo, o osteossarcoma é mais frequentemente encontrado nos ossos longos das pernas e braços, particularmente nas regiões próximas aos joelhos e ombros. Este sarcoma é a neoplasia óssea

maligna primária mais frequente em adolescentes, com aproximadamente dois terços dos tumores localizados na região ao redor do joelho, incluindo o fêmur distal, a tíbia proximal e o úmero proximal (PILAVAKI et al., 2023). Os sintomas iniciais do osteossarcoma incluem dor localizada, inchaço e, em alguns casos, disfunção articular, além de fraturas patológicas em certos pacientes. Diferenciar entre dor de crescimento e trauma pode ser desafiador, mas é vital considerar a possibilidade de osteossarcoma maligno. O prognóstico dos pacientes é significativamente afetado pela presença de metástases e pela resistência aos tratamentos, especialmente as metástases pulmonares (ZHAO et al., 2021). Devido à alta taxa de recidiva e ao prognóstico desfavorável, é crucial desenvolver novas abordagens terapêuticas e biomarcadores para um controle mais eficaz da doença (PILAVAKI et al., 2023). O diagnóstico e tratamento do osteossarcoma são complexos e requerem uma abordagem multidisciplinar. Atualmente, a prática clínica utiliza uma combinação de cirurgia, radioterapia e terapia sistêmica multiagente. Avanços em quimioterapia e técnicas cirúrgicas transformaram o osteossarcoma de uma doença quase sempre fatal para uma condição em que muitos pacientes podem sobreviver (ZHAO et al., 2021). Contudo, o tratamento do osteossarcoma ainda enfrenta desafios por ser um tumor de difícil acesso cirúrgico. Na era da medicina de precisão, há um esforço crescente para entender melhor a biologia, genética e perfil molecular do osteossarcoma, com o objetivo de desenvolver terapias mais eficazes e direcionadas (PILAVAKI et al., 2023).

1.1.3 Tratamentos oncológicos modernos

Os sarcomas ósseos constituem um grupo heterogêneo de neoplasias raras, representando menos de 0,2% de todos os tumores malignos (STILLER et al., 2013) e aproximadamente 10% de todos os sarcomas. Estima-se que a incidência seja de 0,2–0,3 novos casos/100.000 habitantes/ano (BERNER et al., 2015; VALERY et al., 2015; WHELAN et al., 2012; MIRABELLO et al., 2009; MORENO et al., 2017). Osteossarcoma é aquele de maior incidência, predominando em adolescentes e adultos jovens do sexo masculino. Contudo, é um câncer ósseo raro e altamente agressivo, apresentando uma taxa de mortalidade alarmante de cerca de 40%, que pode alcançar 70% em casos de metástase. Devido à raridade desta doença, o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas é limitado e o cuidado, negligenciado, o que a torna um problema de saúde pública. O pico de incidência

ocorre durante a segunda década de vida, geralmente coincidente com o surto de crescimento puberal, sendo o fêmur distal, a tíbia proximal e o úmero proximal os locais mais comuns de manifestação.

Clinicamente, o osteossarcoma se caracteriza pela formação de tecido ósseo imaturo por células malignas, o que leva a sintomas como dor local e edema, frequentemente confundidos com traumas ou crescimento ósseo normal. Esse quadro clínico pode atrasar o diagnóstico, permitindo a progressão da doença para estágios mais avançados. A progressão do osteossarcoma é rápida e agressiva, com alta propensão à disseminação hematogênica, principalmente para os pulmões, que são o principal sítio de metástase. Nos casos em que o tumor já metastatizou para os pulmões, a taxa de mortalidade pode atingir alarmantes 70%. Mesmo nos casos de doença localizada, a taxa de sobrevivência a cinco anos é de cerca de 60-70%, mas cai para 20-30% em pacientes com metástase pulmonar.

O tratamento atual do osteossarcoma inclui a ressecção cirúrgica do tumor, acompanhada de quimioterapia neoadjuvante e adjuvante. No entanto, esses tratamentos apresentam uma série de limitações, incluindo alta toxicidade e resistência à quimioterapia, além de efeitos colaterais graves como cardiotoxicidade, nefrotoxicidade e impacto na fertilidade, que comprometem significativamente a qualidade de vida dos pacientes, geralmente muito jovens. Além disso, o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas tem sido limitado, especialmente nos últimos anos, devido à raridade da doença, o que dificulta a realização de ensaios clínicos em larga escala e a captação de investimentos para pesquisa e desenvolvimento de novos tratamentos. Diante desses desafios, a nanotecnologia tem emergido como uma estratégia promissora no tratamento do osteossarcoma. As nanopartículas podem atuar como vetores para a entrega controlada e direcionada de fármacos, reduzindo os efeitos adversos sistêmicos e aumentando a eficácia terapêutica (BEACH MA., 2024). Além disso, nanossistemas multifuncionais vêm sendo desenvolvidos para combinar diagnóstico e terapia (teranóstica), permitindo o monitoramento em tempo real da resposta ao tratamento. Entre as abordagens mais avançadas, destacam-se as nanopartículas poliméricas, lipossômicas e metálicas, que oferecem propriedades únicas para o transporte e liberação controlada de agentes quimioterápicos, bem como a nanotermoterapia, que utiliza nanopartículas para aumentar a temperatura do microambiente tumoral e potencializar a destruição das células cancerígenas (Zhao L., 2010). Nesse contexto, as nanopartículas

magnéticas de óxido de ferro representam uma alternativa inovadora para o tratamento do osteossarcoma por meio da hipertermia magnética. Esse método consiste na aplicação de um campo magnético alternado para induzir a elevação da temperatura local do tumor, promovendo a morte seletiva das células tumorais sem causar danos significativos aos tecidos saudáveis. Além de sua eficácia no combate ao câncer, essa abordagem pode ser combinada com outros tratamentos, como quimioterapia e imunoterapia, maximizando os efeitos terapêuticos e reduzindo a toxicidade sistêmica, tornando-se uma promissora ferramenta na oncologia moderna.

1.2 Abordagem terapêutica com nanopartículas magnéticas de óxido de ferro

1.2.1 Óxido de Ferro Nanoestruturado

Uma nova categoria de nanoestruturas multifuncionais e inovadoras está emergindo, impulsionada pela disponibilidade de nanomateriais com dimensões na faixa de 1 a 100 nanômetros. Esses nanomateriais exibem propriedades magnéticas, mecânicas, ópticas, químicas e elétricas distintas quando comparadas à sua forma bulk (LETTI et al., 2013). Essas características são dependentes da forma e tamanho do nanomaterial, podendo ser ajustadas conforme a função desejada. A eficácia na obtenção desses materiais inovadores é resultado do controle preciso dos métodos de síntese, exploração de precursores, desenvolvimento de tratamentos superficiais e implementação de métodos de caracterização detalhados (CHUNG et al., 2019).

Entre os diversos tipos de nanomateriais, as nanopartículas magnéticas têm recebido considerável atenção e encontram aplicação em diversas áreas. Especificamente, as nanopartículas de óxido de ferro, conhecidas como iron oxide nanoparticles (IONS), (E. FANTECHI et al., 2014), são amplamente utilizadas na biomedicina devido ao comportamento que pode ser superparamagnético, capacidade de modificação da superfície, processos de síntese relativamente simples e baixa toxicidade (RIVERA et al., 2020).

Os óxidos de ferro, como a hematita (α -Fe₂O₃), a magnetita (Fe₃O₄) e a maghemita (γ -Fe₂O₃), apresentam diversas disposições cristalográficas influenciadas por transições de fase induzidas pela temperatura. Entre eles, destaca-se a magnetita (Fe₃O₄) por sua facilidade de síntese e saturação, resultando em uma magnetização maior e mais controlada. Por outro lado, a maghemita (γ -Fe₂O₃), que é uma variedade de óxido de ferro com maior oxidação, é reduzida a partir da magnetita e apresenta

menor quantidade de ferro, possuindo composição química semelhante à hematita (α -Fe₂O₃), mas não magnética (BARROW et al., 2018).

Esses materiais são considerados compatíveis e não tóxicos ao organismo (BAÑOBRE-LÓPEZ et al., 2013). Para melhorar a especificidade e seletividade das nanopartículas (NPs) em relação às células cancerosas, é possível funcionalizá-las utilizando materiais orgânicos ou inorgânicos (BAÑOBRE-LÓPEZ et al., 2013). Partículas na faixa de tamanho entre 20 e 100 nm têm uma tendência a se acumular em tumores devido ao fenômeno de aumento de permeabilidade e retenção, visto que tecidos tumorais frequentemente apresentam fenestrações em seus vasos sanguíneos com dimensões na ordem de centenas de nanômetros (LING et al., 2015). Esse fenômeno se deve à disposição única das células nos vasos sanguíneos do tecido canceroso. Nesse contexto, as NPs demonstram maior seletividade, passando pelas fenestras presentes no tecido e aumentando sua concentração nesse local (NEHOFF et al., 2014).

Nos últimos anos, a área de teranóstico tem atraído considerável interesse na comunidade científica devido à sua capacidade de integrar terapia e diagnóstico, oferecendo uma abordagem combinada e a perspectiva de tratamento personalizado, direcionado e monitorado de maneira não invasiva. Atualmente, a técnica de hipertermia magnética, que utiliza nanopartículas, já foi testada com sucesso em casos de glioblastoma (GUPTA et al., 2019). Dentre as várias estratégias exploradas para teranóstico, o emprego de nanopartículas superparamagnéticas de óxido de ferro destaca-se como uma alternativa promissora. Acreditamos que com os avanços contínuos nos nanossistemas magnéticos, será possível estabelecer as nanopartículas de óxido de ferro associadas à hipertermia magnética como uma ferramenta de tratamento potencialmente eficaz para terapia do câncer. Essas alternativas podem representar um grande avanço no campo da oncologia, oferecendo novas opções terapêuticas com potencial para melhorar significativamente os resultados de tratamento para pacientes com câncer.

1.2.2 Hipertermia Magnética

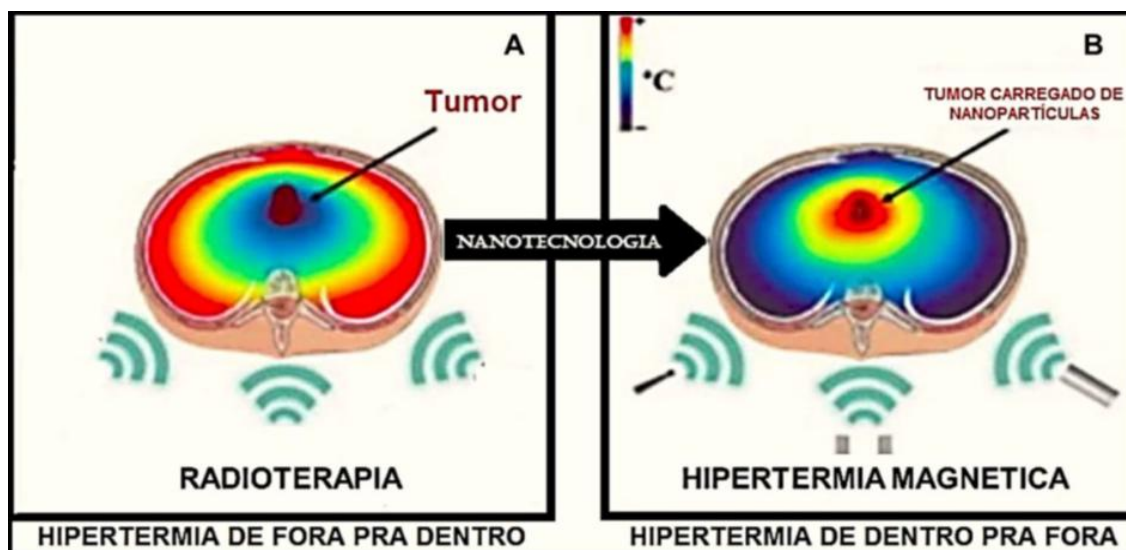
A hipertermia é um processo observado e estudado há centenas de anos. Entre os primeiros registros históricos sobre o assunto, acredita-se que qualquer doença poderia ser curada pelo aquecimento corporal (SOUZA et al., 2011). Diante do exposto, a hipertermia pode ser definida como uma terapia ou procedimento

terapêutico que, geralmente em associação com outros tratamentos, é utilizado para o tratamento antineoplásico em determinados tipos tumorais, através da elevação artificial da temperatura, objetivando a destruição das células cancerosa (OLIVEIRA et al., 2015).

Esta modalidade terapêutica é utilizada como escolha para o tratamento antitumoral seguindo um preceito de que as células cancerosas não são termoestáveis, perecendo facilmente quando expostas à elevação de temperatura (em torno de 42°C). O fácil aquecimento também se deve à redução de aporte de O² por seu (tumor) sistema vascular, evento este que não é observado sob a óptica de tecidos normais, uma vez que a vascularização tumoral é pobremente desenvolvida (SOUZA et al., 2011).

Em uma comparação entre a hipertermia tradicional e a hipertermia magnética, ambas visando a destruição do tecido tumoral, a diferença fundamental reside na entrega de energia que resulta no aumento da temperatura local. Na abordagem de hipertermia tradicional, como exemplificado pela radioterapia (Figura 2A), o aquecimento é realizado do ambiente externo para o ambiente interno do tumor, resultando na maior fonte de energia aplicada à parte superficial do tumor. Isso implica que tecidos saudáveis mais externos ao tumor recebem doses mais elevadas de calor para garantir que a dose correta alcance o tecido tumoral. Essa técnica apresenta baixa seletividade, podendo causar efeitos adversos e, possivelmente, uma reação térmica ineficiente no local desejado (BEIK et al., 2016). Por outro lado, na hipertermia magnética (Figura 2B), nanopartículas magnéticas são utilizadas e entregues às células cancerosas, seja por via oral ou intravenosa (NEHOFF et al., 2014). Isso possibilita atingir o tecido tumoral a partir de seu interior. Ao induzir um campo magnético alternado que fornece altas taxas de energia, as nanopartículas passam por um processo de reversão, ou seja, a taxa de absorção de energia (SAR) resulta no aumento local de temperatura (GALEANO-VILLAR et al., 2019). As nanopartículas geram uma entrega mais eficaz de calor dentro do ambiente tumoral e possivelmente intracelular, devido à internalização das partículas pelas células (ABU-BAKR et al., 2019). Dessa forma, reduz-se a ação adversa da reação térmica nos tecidos circundantes (BEIK et al., 2016).

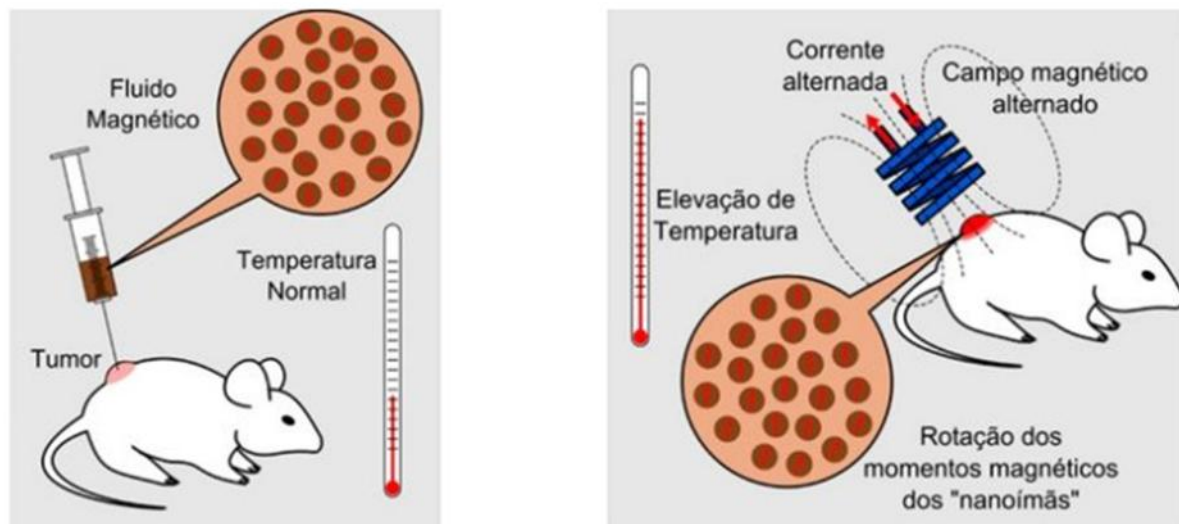
Figura 2: Diferença entre as formas de hipertermia que proporciona o aquecimento tecidual cancerígeno.



Fonte: Adaptada (BEIK et al, 2016)

Nanopartículas magnéticas, como a magnetita (Fe_3O_4), são altamente atrativas para aplicações biomédicas devido às suas propriedades magnéticas distintas. O regime superparamagnético dessas partículas implica uma dinâmica magnética notavelmente lenta, permitindo a recuperação controlada da remanência do material quando exposto a um campo magnético alternado de alta frequência. Nesse cenário, as nanopartículas magnéticas liberam energia, resultando em um aumento localizado da temperatura. Esse fenômeno é promissor para o tratamento de câncer e é denominado hipertermia magnética, conforme ilustrado na (Figura 3). O tratamento se baseia no aquecimento focalizado do tecido tumoral, mantido na faixa de 41 a 45 °C, mediante a aplicação de um campo magnético alternado externo. Dentro dessa faixa de temperatura, observa-se que o dano é reversível em células saudáveis, enquanto células tumorais enfrentam danos irreversíveis (BROLLO et al., 2016).

Figura 3: Representação esquemática do tratamento de câncer por hipertermia magnética, empregando nanopartículas magnéticas: (a) introdução do fluido magnético no tecido tumoral e (b) aplicação de campo magnético alternado para induzir o aquecimento localizado.



Fonte: Adaptado de (NANOMED et al., 2013).

A eficiência do material em gerar calor por indução de campo magnético alternado é quantificada pela perda específica de potência (SLP - specific loss power), também conhecida como taxa de absorção específica (SAR - specific absorption rate). Essa grandeza representa a potência gerada pela nanopartícula, normalizada pela sua massa, sendo uma medida direta da taxa de aquecimento proporcionada pela nanopartícula (DIAS et al., 2014).

Em aplicações clínicas, são desejáveis nanopartículas que apresentem valores elevados de SAR, permitindo a administração de menores quantidades de material para alcançar a mesma condição terapêutica. Isso contribui para minimizar possíveis efeitos colaterais associados ao excesso de nanopartículas no organismo do paciente. O valor de SAR é geralmente influenciado por parâmetros como a estrutura da partícula (tamanho, forma e arranjo cristalino), propriedades magnéticas e condições do campo magnético alternado, os quais podem ser controlados durante a síntese da partícula ou a aplicação do campo magnético. Recentemente, têm sido realizados esforços para validar a viabilidade, controlabilidade e não invasividade da técnica de hipertermia magnética intracelular como um método terapêutico. As nanopartículas superparamagnéticas de óxido de ferro já foram aprovadas para testes em humanos (BLANCO-ANDUJAR et al., 2016). A empresa MagForce Nanotechnologies AG é a única que utiliza nanopartículas de óxido de ferro para o tratamento de tumores por

hipertermia magnética em humanos, apresentando ensaios clínicos em estágio avançado. O primeiro teste clínico, promissor para o tratamento de câncer de próstata, foi conduzido por (JOHANNSEN et al., 2005).

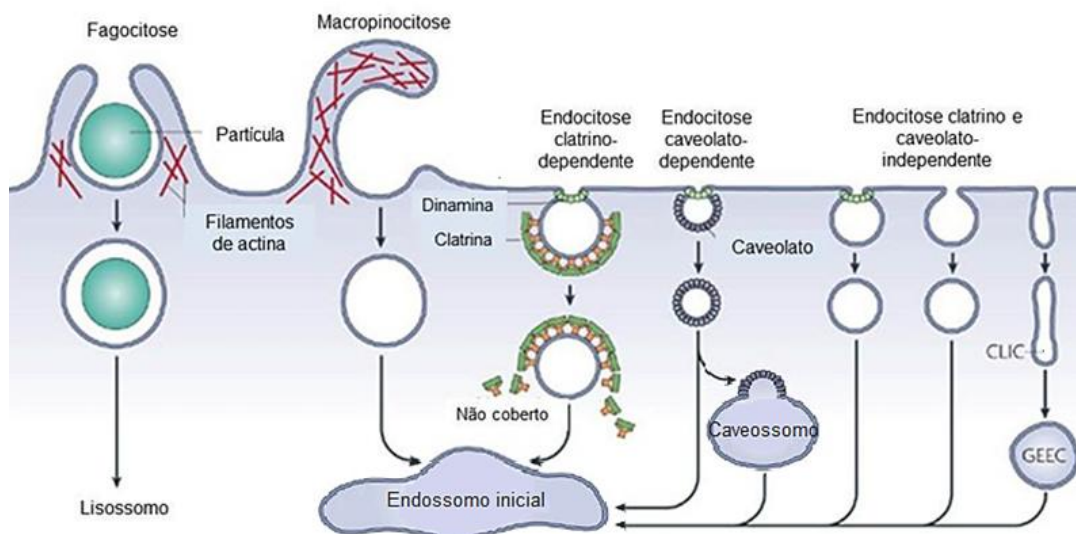
Por meio deste tipo de terapia (consideradas estratégias terapêuticas alternativas e/ou complementares), a destruição tumoral por hipertermia tem sido estudada como uma importante via de escolha para minimizar as invasões cirúrgicas e, em situações em que a ressecção não é possível (em regiões vitais como o SNC), pode se apresentar como uma das principais vias terapêuticas para tratamento (CICUÉNDEZ M et al., 2018).

1.2.3 Endocitose: vias de internalização de matérias nanoestruturados

A internalização de materiais nanoestruturados nas células é um processo crítico para o sucesso de várias aplicações biomédicas, como entrega de drogas, terapia genética e diagnóstico. Existem várias vias de internalização, dependendo das propriedades dos nanomateriais e do tipo de célula. A endocitose é o principal mecanismo pelo qual as células internalizam materiais nanoestruturados. As principais vias endocíticas incluem a endocitose mediada por clatrina, endocitose mediada por caveolina, endocitose independente de clatrina e caveolina, macropinocitose e fagocitose (figura 4). (BANUSHI.B et al., 2023). A endocitose mediada por clatrina envolve a formação de vesículas revestidas por clatrina que englobam os nanomateriais e os transportam para o interior da célula. A endocitose mediada por caveolina ocorre em microdomínios da membrana celular chamados caveolas, que são ricos em colesterol e esfingolipídios. Este processo é particularmente importante para a internalização de certos tipos de nanopartículas. A macropinocitose é um processo de internalização não específico que envolve a formação de grandes vesículas chamadas macropinosomos, que englobam grandes volumes de fluido extracelular e seus conteúdos. Este mecanismo é usado por células fagocíticas, como macrófagos, para internalizar partículas maiores, incluindo nanomateriais. (RENNICK JJ et al., 2021). Além da endocitose, a fagocitose é uma via importante em células especializadas, como macrófagos, neutrófilos e células dendríticas. Esses fagócitos englobam partículas grandes, incluindo nanomateriais, em vesículas chamadas fagossomos, que então se fundem com lisossomos para degradar os materiais internalizados. A transição direta através da membrana celular é um processo menos comum, mas relevante para certos tipos de nanopartículas. Isso

pode ocorrer através de inserção direta na membrana ou por meio de mecanismos de transição dependentes de energia. Este método é frequentemente observado em nanopartículas muito pequenas ou em condições específicas (BANUSHI.B et al., 2023).

Figura 4: Representação esquemática de diferentes vias endocíticas.



Fonte: Adaptado de (MAYOR et al., 2007).

A eficiência e a via de internalização de nanomateriais são influenciadas por vários fatores, incluindo o tamanho, forma, carga superficial e funcionalização dos nanomateriais, bem como o tipo de célula alvo e suas propriedades fisiológicas. Materiais nanoestruturados, devido ao seu tamanho, são capazes de interagir com as células da mesma forma que outros materiais tamanho similar, tais como vírus e proteínas, sendo reconhecidos por receptores nas membranas e sendo internalizados através da maquinaria endocítica das células (FRANCIA et al., 2020). Embora o tamanho das partículas seja importante uma vez que quanto maiores estas forem, mais dificuldade as células terão para internalizá-las (WU et al, 2019), tanto o tamanho quanto à forma, a elasticidade e a carga da superfície podem ser adaptadas dependendo da necessidade (SHI et al., 2017).

As nanopartículas podem ser introduzidas no organismo por diferentes vias, como inalação, ingestão oral, penetração dérmica e ocular, além de injeções intravenosas, intramusculares e subcutâneas. Ao entrarem em contato com fluidos fisiológicos ou barreiras biológicas, podem sofrer processos de agregação e/ou

dissolução, influenciando sua biodistribuição e comportamento biológico. Compreender os mecanismos de endocitose das nanopartículas (NPs) e sua regulação é fundamental para otimizar sua captação e minimizar possíveis efeitos tóxicos. Para isso, diferentes estratégias têm sido utilizadas, como o uso de inibidores químicos e farmacológicos, abordagens genéticas e a análise de biomarcadores específicos. Uma das principais abordagens para estudar a endocitose de NPs é a utilização de inibidores, que bloqueiam seletivamente as vias de captação celular (ALMEIDA et al., 2021). Esses inibidores são amplamente empregados devido à sua rápida ação, eficiência e baixo custo, além de atuarem em uma ampla população celular. Entre os inibidores mais comuns estão o dynasore, lovastatina, amilorida, genisteína e MbCD, cada um direcionado a diferentes mecanismos de internalização celular (Quadro 1).

Quadro 1: Inibidores de endocitose e seus mecanismos de ação.

Inibidor	Caminho(s) envolvido(s)	Mecanismo de ação
Dynasore	Endocitose dependente de dinamina	Inibe a atividade GTPase da dinamina 1 e 2, bloqueando a endocitose mediada por clatrina e caveolas.
Lovastatina	Endocitose mediada por caveolas	Reduz a produção de colesterol, essencial para a formação de caveolas.
Amilorida	Macropinocitose	Inibe a bomba de troca Na^+/H^+ , afetando o pH intracelular e bloqueando a sinalização de Rac1 e Cdc42.
Genisteína	Endocitose mediada por caveolas	Inibe a atividade de tirosina quinases, interrompendo a formação de vesículas de caveolas.
Metil-β-ciclodextrina	Endocitose mediada por caveolas/Raft lipídico	Reduz o colesterol da membrana plasmática, prejudicando a organização dos domínios lipídicos necessários para a endocitose.

2 JUSTIFICATIVA

O câncer é o nome dado a um conjunto de mais de 100 doenças que apresentam, como produto de alterações moleculares, um crescimento celular desordenado, com capacidade de infiltração em outros tecidos e órgãos (INCA et al., 2011). Ao longo dos anos, os esforços de pesquisa têm se concentrado em compreender melhor os mecanismos subjacentes à doença, desenvolver métodos mais precisos de diagnóstico precoce e descobrir tratamentos mais eficazes, visando melhorar as taxas de sobrevivência e qualidade de vida dos pacientes diagnosticados com câncer.

Estudos voltados para a hipertermia mediada por nanopartículas de óxido de ferro com autorregulação térmica, em faixa terapêutica (41-45 °C), demonstram um grande potencial no tratamento antitumoral. Essa faixa de temperatura é eficaz para causar danos em células cancerosas, enquanto minimiza os efeitos adversos nas células saudáveis, uma vez o corpo humano em condições saudáveis apresenta temperatura 37 °C, mas a elevação desta temperatura até 42 °C não causa danos significativos às células saudáveis. Devido à sua eficácia, baixa toxicidade, alta seletividade, e ao efeito terapêutico mais relevante dentro do tumor (devido ao metabolismo tumoral aumentado), que leva a uma maior internalização de NPs, essa abordagem representa uma escolha terapêutica segura, menos invasiva e com menos efeitos adversos comparado com os procedimentos convencionais. Entretanto, essa abordagem possui limitações no controle da liberação de calor dos nanossistemas utilizados na faixa terapêutica, podendo causar danos ao organismo quando a temperatura excede 42 °C.

O uso de nanopartículas de óxido de ferro autorreguladas aprimoram a técnica da hipertermia como uma opção promissora no combate aos cânceres sólidos de difícil alcance terapêutico, como o osteossarcoma. Contudo, é necessário que a abordagem terapêutica dos novos nanossistemas, citados em literatura como autorregulados, seja validada do ponto de vista biológico, entendendo as diferenças entre formação de proteína corona, a internalização por diferentes vias endocíticas e os efeitos hipotérmicos promovidas por estes sistemas comparados com NPs tradicionais.

3 OBJETIVO

3.1 Objetivo Geral

Validar o efeito biológico da hipertermia magnética autorregulada, induzida pela aplicação de campo magnético alternado em nanopartículas magnéticas de óxido de ferro dopadas com Zn/Co/Cr, como abordagem terapêutica para osteossarcoma.

3.2 Objetivos Específicos

- Avaliar as características físico-químicas das nanopartículas magnéticas de óxido de ferro, pura (NPMp) e dopada (NPMd), e capacidade de autorregulação térmica em resposta a um campo magnético alternado.
- Investigar a presença e composição de proteína corona das diferentes nanopartículas magnéticas expostas a meio de cultura.
- Analisar as vias envolvidas na internalização de nanopartículas magnéticas em modelo tumoral 2D de osteossarcoma.
- Avaliar o efeito da aplicação de campo magnético alternado no tratamento de câncer, utilizando modelo tumoral 3D de osteossarcoma.

4 METODOLOGIA

4.1 Nanopartículas magnéticas de óxido de ferro

As nanopartículas utilizadas no presente trabalho foram sintetizadas e cedidas por colaboradores, conforme especificações a seguir. Vale ressaltar que a nanopartícula pura (NPMp) está sendo utilizada como modelo tradicional para liberação de calor (controle), enquanto a dopada (NPMd) apresenta comportamento de autorregulação térmica próxima à faixa terapêutica de temperatura (42-45 °C).

4.1.1 Síntese de nanopartículas de óxido de ferro pura (NPMp)

As nanopartículas magnéticas de magnetita pura (Fe_3O_4), nomeada como NPMp, foi sintetizada no Laboratório de Nanotecnologia Biofuncional da UFRJ e cedida pela Magtech Soluções em Nanopartículas Magnéticas Ltda. A síntese foi conduzida utilizando o método de coprecipitação, conforme descrito por BEDÊ et al., (2017).

4.1.2 Síntese de nanopartículas de óxido de ferro dopadas (NPMd)

As nanopartículas magnéticas de ferritas dopadas com Zn/Co/Cr ($\text{Zn}_{0.54}\text{Co}_{0.46}\text{Cr}_{0.4}\text{Fe}_{1.6}\text{O}_4$), nomeada como NPMd, foi sintetizada e cedida pelo Laboratório de Materiais Magnéticos Multifuncionais do CBPF. A síntese foi conduzida por reação de coprecipitação por via hidrotérmica como descrito na literatura (C L VALENTE-RODRIGUES et al., 2023).

4.1.3 Marcação fluorescente das nanopartículas (NPs)

Com o objetivo de criar NPs fluorescente para realizar a avaliação semiquantitativa das vias de internalização e tráfego intracelular das NPs, foi necessário realizar uma marcação fluorescente das mesmas, adsorvendo a superfície a Rodamina, uma molécula fluorescente, não radioativa. Para isso, foram preparados 50 ml de solução de Rodamina concentrada 0,5 mg/ml em água (solução estoque). A seguir, o volume correspondente a 200 mg de cada partícula foi diluído em 1 ml da solução estoque de Rodamina, respectivamente. Após, estas amostras foram submetidas a agitação por duas horas à temperatura ambiente para promover a adsorção da Rodamina à partícula. Posteriormente, o material foi centrifugado por 10 minutos a 350g, lavado com H_2O e novamente centrifugado e ressuspenso em água,

repetindo o processo até que o sobrenadante se torne transparente. A confirmação da adsorção da Rodamina fluorescente no comprimento de onda de 547 nm, às nanopartículas de óxido de ferro foi realizada por meio de microscópio de fluorescência de alta resolução Axio Imager da Zeiss (FIOCRUZ).

4.2 Caracterizações do Biomaterial

Para a confirmação 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 completo (Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM HIGH), suplementado com 10 % de Soro Fetal Bovino (SFB) e 1 % de antibiótico Penicilina/Estreptomicina (PS) como forma de mimetizar o ambiente celular *in vivo*. Para caracterização do biomaterial foram utilizadas técnicas: MET, DLS, FTIR e Potencial Zeta.

4.2.1 Difração de Raios X (DRX)

Para verificar a qualidade da síntese foi realizada uma análise estrutural e microestrutural por difração de raios X (DRX), identificando os diferentes materiais presentes na estrutura e verificando o grau de cristalinidade do material sintetizado. Os difratogramas foram medidos em uma faixa angular de 2θ compreendida entre 10° até 80° , com passo de $0,026^\circ$ em um difratômetro de pó da marca Panalytical, modelo X'PERT Pro, disponível no Laboratório Multiusuário de raios-X do CBPF, RJ. Para a identificação das fases cristalinas presentes nas amostras, em comparação foram utilizados padrões disponíveis na base de dados de estrutura cristalina inorgânica (ICSD), correspondentes às fases de magnetita (Fe_3O_4).

4.2.2 Medidas de magnetização

Medidas de magnetização por magnetometria de amostra vibrante foram realizadas no aparelho Physical Property Measurement System (PPMS) da Quantum Design, modelo DynaCool, EUA, utilizando a opção Vibrating Sample Magnetometer (VSM). As medidas foram realizadas sob campo variável de 30.000 a -30.000 Oe, em temperatura fixa de 300 K.

4.2.3 Hipertermia Magnética

Medidas de hipertermia magnética foram realizadas, utilizando um sistema de indução da Ambrell, modelo Easy Heat EH 3542 LI, do Reino Unido. Um frasco de vidro contendo 1,0 mL de uma dispersão aquosa de 20,0 mg/mL da amostra foi posicionado em um calorímetro com isolamento térmico. A suspensão foi exposta a um campo magnético alternado com frequência (f) de 224 kHz, amplitude (H) de 27,5 mT por 30 min e acionado por uma bobina, gerando um campo magnético alternado induzido, enquanto um termômetro de fibra óptica mede a mudança de temperatura.

4.2.4 Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

Para avaliar a morfologia, organização estrutural, tamanho, características nanoestruturais do material que será utilizado na avaliação após a internalização das partículas, bem como eventuais mudanças na morfologia celular advindas dessa internalização foi utilizada a técnica de microscopia eletrônica de transmissão.

Para avaliação morfológicas, as NPMp e NPMd diluídas em água e meio de cultura celular foram dispersas em banho ultrassônico na frequência de 40KHz, durante 10 minutos e em seguida depositadas em uma grade de cobre revestida com formvar.

Visando garantir a estabilidade do vácuo do equipamento, as grades contendo as amostras foram deixadas secas por 24 horas à temperatura ambiente antes da análise no microscópio eletrônico de transmissão Hitachi HT 7800 da Plataforma de Microscopia Eletrônica Rudolf Barth – Fiocruz. Neste microscópio, utilizamos um feixe de elétrons gerado por um filamento de tungstênio, acelerado por uma diferença de potencial de 100 kV.

4.2.5 Espalhamento dinâmico de luz (DLS)

O espalhamento dinâmico de luz foi utilizado para analisar a distribuição de tamanho das NPMp e NPMd ressuspensas em água ou em meio de cultivo celular completo. Para isso, foi realizada uma diluição da solução estoque de 1 mg/ml de cada partícula ressuspensa em água destilada para chegar a uma concentração de 300 µg/ml, ressuspensas em água ou meio de cultivo celular completo, respectivamente. Esta suspensão foi incubada em agitação durante 24h. Após, as amostras foram centrifugadas a 350g por 10 min a 25° C, o sobrenadante foi descartado e o pellet lavado em água e centrifugado novamente, por 3 vezes. Em seguida, para ambas as condições, o sobrenadante foi descartado e o pellet seco a temperatura ambiente.

Para realizar as análises o pellet foi ressuspensão em 1ml de Citrato de sódio (Nacit) 2,5 mg/ml às NPs. As análises de DLS foram realizadas utilizando o equipamento Malvern Zetasizer Nano series, do Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas (CBPF).

4.2.6 Potencial Zeta

Para verificar a eventual adsorção de moléculas, incluindo proteínas, foi utilizada a técnica do potencial Z. Para isso, foi realizada uma diluição da solução estoque de 1 mg/ml de cada partícula ressuspensa em água destilada para chegar a uma concentração de 300 µg/ml, ressuspensas em água ou meio de cultivo celular completo, respectivamente. Esta suspensão foi incubada em agitação durante 24h. Após, as amostras foram centrifugadas a 350g por 10 min a 25° C, o sobrenadante foi descartado e o pellet lavado em água e centrifugado novamente, por 3 vezes. Em seguida, para ambas as condições, o sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspensão em 1 ml de KCl 1mM. A leitura foi realizada utilizando o equipamento Malvern Zetasizer Nano series, do Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas (CBPF).

4.2.7 Espectrometria no infravermelho com transformada de *Fourier* (FTIR)

Para determinação de características estruturais principalmente em grupos funcionais e de ligações presentes em uma amostra foi utilizada a técnica de FTIR.

As amostras foram preparadas como descrito na seção 4.2, mas secas na estufa a 37°C por 30min. Após, 5 mg de amostra foi pesado e montado em uma prensa uniaxial, pressionado por cinco minutos e lido no espectrômetro da marca Shimadzu modelo IRPrestige-21, no Laboratório de Espectroscopia do CBPF. O interferograma de cada nanossistema foi gerado em uma faixa de comprimento número de onda de 400 a 4000 cm⁻¹.

4.2.8 Espectrometria de massas

Para avaliar a presença e composição da proteína corona, foi utilizada a técnica de espectrometria de massa (MS) utilizando o equipamento Orbitrap Exploris 480 do Centro de Pesquisa em Medicina de Precisão (CPMP) - UFRJ. Para isso, foi realizada uma solução de 300 µg/ml de cada NPMp ou NMPd, ressuspensas em meio de cultivo celular completo. Esta suspensão foi incubada em agitação durante 24h. Após, as amostras foram centrifugadas a 350g por 10 min a 25° C, o sobrenadante foi descartado e o pellet lavado em água e centrifugado novamente, por 3 vezes. Em

seguida, para ambas as condições, o sobrenadante foi descartado e o pellet seco a temperatura ambiente.

Para realizar a digestão das proteínas, as amostras foram inicialmente quantificadas utilizando o Qubit, estimando a massa de proteínas para um volume final de 500 µl. Em seguida, foram adicionados 100 µl de uma solução de ureia 4M e bicarbonato de amônio 10 mM. Após homogeneizar e manter sob agitação por 30 minutos, para redução das pontes dissulfeto entre os resíduos de cisteína, foi adicionado ditioneína (DTT) para uma concentração final de 10 mM. As proteínas foram então homogeneizadas e incubadas a 37°C por 1 hora sob agitação. Após esse período, para impedir uma nova estruturação das pontes dissulfeto, foi realizada a alquilação dos enxofres, adicionando-se iodoacetamida (IAA) para uma concentração final de 40 mM, e incubando à temperatura ambiente por 30 minutos. Em seguida, o pH foi aferido, devendo estar entre 7 e 9. Adicionamos 0,5 µg de tripsina e incubamos a 37°C por 18 horas. No dia seguinte, as amostras foram centrifugadas a 350g por 10 minutos, e ácido trifluoroacético foi adicionado para uma concentração final de 1%, com o objetivo de parar a reação da tripsina. As amostras foram quantificadas novamente por Qubit, secas em microporos low-binding e ressuspensas em água com ácido fórmico 0,1% para análise por LC-MS. Injetamos 250 ng de peptídeos tripticos no nanoLC para a análise.

Após, os peptídeos resultantes foram separados por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) antes de serem introduzidos em um espectrômetro de massa. Na espectrometria de massa, os peptídeos foram ionizados e separados com base na razão carga/massa. Os fragmentos gerados durante a ionização fornecem informações sobre a sequência de aminoácidos, possibilitando a identificação das proteínas presentes na amostra. A listagem das proteínas analisadas pode ser encontrada no Apêndice 1. Portanto, os dados obtidos foram analisados bioinformaticamente utilizando como critério de exclusão a presença de pelo menos de 2 peptídeos detectados pela análise de cromatografia. Para essa análise quantitativa foi utilizado o software R Studio.

4.3 Validação celular

4.3.1 Cultura celular 2D e 3D

As células tumorais osteossarcoma humano (SAOS-2) foram descongeladas e cultivadas em meio de cultivo DMEM high glicose suplementado com 10 % de soro fetal bovino em ambiente úmido a 37 °C com 5 % de CO₂. Para garantir a qualidade do cultivo, foram realizadas três passagens e os experimentos foram realizados na curva de crescimento celular exponencial.

Para realizar a cultura de células 3D, foram usadas placas de fundo em U de 96 poços (Corning), previamente revestidas com uma fina camada de 1% de agarose ultrapura (Sigma-Aldrich). Em seguida, 200 µL de suspensão de células ressuspensas em meio DMEM de alta glicose suplementado com 10% SFB e 1% PS, contendo 10.000 células foram plaqueadas em cada poço. As células foram incubadas por 72 horas em uma atmosfera umidificada com 5% de CO₂ a 37 °C. O crescimento, a forma e a morfologia dos esferóides foram monitoradas no microscópio óptico invertido Olympus (modelo CKX41, Japão) para garantir a reprodutibilidade da morfologia e a uniformidade da dimensão dos esferóides.

4.3.2 Ensaio de Viabilidade Celular (MTT) em Células SAOS-2

O ensaio de viabilidade celular foi realizado utilizando o método do MTT, conforme estabelecido pela norma ISO 10993-5, para avaliar os efeitos das nanopartículas de óxido de ferro na viabilidade das células SAOS-2. Células da linhagem SAOS-2 (osteossarcoma humano) foram cultivadas em meio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS) e 1% de solução antibiótica (penicilina 100 U/mL e estreptomicina 100 µg/mL), sendo mantidas em incubadora a 37°C, 5% de CO₂ e 95% de umidade. Para a realização do ensaio, as células foram semeadas em placas de 96 poços a uma densidade de 2×10^4 células/poço e incubadas por 24 horas para adesão. Após esse período, o meio foi removido e substituído por meio fresco contendo nanopartículas de óxido de ferro na concentração de 10, 30, 50, 100, 300 e 500 µg/mL, sendo as células incubadas por 24 horas sob as mesmas condições de cultivo. Ao término do tratamento, o meio contendo as nanopartículas foi removido e substituído por 100 µL de meio DMEM sem FBS, seguido da adição de 10 µL da solução de MTT (5 mg/mL em PBS). As células foram incubadas por 4 horas a 37°C para permitir a conversão do MTT em formazan. Em seguida, o meio foi cuidadosamente removido e os cristais de formazan foram

solubilizados com 100 µL de DMSO, e a absorbância foi medida a 570 nm utilizando um leitor de microplacas. Os experimentos foram realizados em triplicata.

4.3.3 Inibição das vias de internalização

Para avaliar por quais vias de internalização que as nanopartículas entram, 3×10^4 células plaqueadas em lamínulas de vidro durante 24h. Em seguida elas foram expostas a diferentes inibidores durante 30 minutos, em meio de cultura DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) com 10% de SFB e 1% de PS, com objetivo de inibir a via de internalização desejada de forma seletiva. Dentre os inibidores que foram utilizados estão o Dynasore 100 µM (Dynasore hydrate powder, dynamin 1 and dynamin 2 GTPase activity inhibitor) - D7693, inibidor da via endocítica mediada por Clatrina; Ginesteína 300 µM, responsável pela inibição da via mediada por Caveolina; MBCD (Methyl-β-cyclodextrin) 10 µM, Metil-β-ciclodextrina powder, BioReagent, suitable for cell culture - C4555 inibidor do raft lipídico, Amilorida 0,5M 5-(N,N-Dimethyl)amiloride hydrochloride - A4562 inibidor da Macropinocitose; e Lovastatina (Lovastatin) - PHR1285 0,9M, que causa a inibição da Fagocitose (Quadro 2).

Quadro 2: Inibidores de vias endocíticas

VIA DE INIBIÇÃO	INIBIDOR	TRAÇADOR
Clatrina	Dynasore 100 µM - D7693	Transferrina humana
Caveolina	Ginesteína 10 mM - 328270250	Transferrina humana
Raft lipídico	MetilBetaCicloDestrina 10 mM - C4555	Toxina da cólera
Macropinocitose	Amilorida - A4562 0,5M	Lucifer Yellow
Fagocitose	Lovastatina - PHR1285 0,9M	Lucifer Yellow

O processo de internalização foi verificado com moléculas traçadores fluorescentes, cada uma tendo como alvo um inibidor. A transferrina humana foi usada para marcar a Dynasore e Ginesteína, a toxina da cólera marcará o MBCD, Lucifer

Yellow será usada para marcação da Amilorida, e marcação da Lovastatina. A marcação de fluorescência para análise semiquantitativa será descrita na (seção 4.3.5).

4.3.4 Hipertermia das células 3D expostas ao campo magnético alternado

Para analisar o efeito do campo magnético sobre as células tumorais na presença de nanopartículas magnéticas (NPMp e NPMd), foram formados esferoides tridimensionais, os quais foram expostos a 300 µg/mL de nanopartículas por 24 horas. Após esse período, micrografias foram obtidas utilizando a microscopia de fluorescência Axio Imager da Zeiss, com marcação do núcleo celular com DAPI (descrita na seção 4.3.5). Em seguida, foi aplicada a hipertermia magnética sob um campo magnético de 596 Oe e frequência de 226 kHz, com ciclos de 10 minutos cada, nas condições descritas a seguir. Após 24 horas de contato com às nanopartículas, o campo magnético foi aplicado uma (T1), duas (T2) ou três vezes (T3), com cada ciclo consistindo em 10 minutos de exposição ao campo magnético, seguidos de 30 minutos de repouso em incubadora a 37 °C, 5% de CO₂ e atmosfera umidificada. Para investigar o efeito cumulativo da hipertermia magnética ao longo do tempo, aplicações adicionais foram realizadas, um novo ciclo de 10 minutos foi aplicado 48 horas após o contato inicial às nanopartículas (T4) e, posteriormente, mais um ciclo de 10 minutos foi realizado 72 horas após a exposição inicial (T5), (Quadro 2).

Quadro 3: Parâmetros de aplicação do campo magnético alternado

EXPOSIÇÃO	DIA 1	DIA 2
T1	1 aplicação	-
T3	3 aplicações	-
T4	4 aplicações	-
T5	3 aplicações	1 aplicação

4.3.5 Marcação fluorescente das células 2D e 3D.

Para avaliar a internalização das NPs e o efeito da hipertermia no tamanho dos esferóides foram realizadas marcações de fluorescência. Para a visualização do

citoesqueleto e dos núcleos celulares, foi realizado um protocolo de marcação utilizando faloidina conjugada a Alexa Fluor 647 e DAPI para análise de internalização em células 2D e apenas DAPI para análise do efeito da hipertermia no tamanho do esferóide (células 3D).

Brevemente, as amostras foram fixadas em paraformaldeído 4% (PFA) durante 10 min, lavadas três vezes com PBS, por 5 minutos cada lavagem. Em seguida, foi adicionado NH_4Cl 20 mM por 10 minutos, seguido de três lavagens com PBS. Para a permeabilização da membrana, foi adicionado 0,1% X-100 + BSA 1% por 10 minutos. A faloidina Alexa Fluor 647, na diluição de 1:80 em solução contendo Triton X-100 a 0,1% e BSA a 1%, foi adicionada permanecendo em incubação por 30 minutos em câmara úmida. Após esse período, as amostras foram lavadas três vezes com PBS e para a marcação do núcleo, incubadas com FluorShield com DAPI para análise de internalização e DAPI líquido, na diluição 1:1000, por 10 minutos em temperatura ambiente, para as análises de cultivo 3D. As lamínulas de vidro de células em 2D (internalização), foram cuidadosamente montadas em lâminas, posicionando a face com as células em contato com o selante. O excesso do selante foi removido e a montagem foi finalizada utilizando esmalte transparente.

As análises de microscopia foram realizadas em Microscópio de microscopia de fluorescência Axio Imager da Zeiss (FIOCRUZ) e Microscópio Confocal Leica TCS-SPE (Unidade multiusuária de microscopia confocal do Instituto de Ciência biomédicas UFRJ).

4.3.6 Microtomografia computadorizada (microCT).

Para investigar a distribuição das NPs e possíveis alterações morfológicas ou perda de integridade estrutural devido ao tratamento foi utilizada a técnica da microCT. Os esferóides foram processados para microscopia eletrônica de transmissão e escaneados em um dispositivo de microCT de alta resolução Bruker (modelo Skyscan 1172, Bélgica), usando um tempo total de digitalização de cerca de 1 h em um tamanho de voxel de 13,04 μm , 24 kV, 529 μA , 180° de rotação, um passo de rotação de 0,25°, exposição de 2000 ms. A correção do endurecimento do feixe e os limites de contraste ideais com base nos testes iniciais de varredura e reconstrução foram determinados de acordo com as instruções do fabricante.

4.3.7 Micrografia por MET

Para análises ultraestruturais da morfologia celular as amostras de esferoides foram fixadas em solução de Karnovsky e pós-fixadas com tetróxido de ósmio a 1% e ferrocianeto de potássio a 0,8% por 30 minutos. Em seguida, foram lavadas três vezes com tampão cacodilato, desidratadas em uma série crescente de etanol (50%, 70%, 80%, 90%, 95% e 100%) e embebidas em resina epóxi. Cortes ultrafinos (40–100 nm) foram obtidos e colocados em grades de cobre revestidas com formvar.

As micrografias foram geradas no microscópio eletrônico de transmissão Hitachi HT 7800 da Plataforma de Microscopia Eletrônica Rudolf Barth – Fiocruz, utilizando um feixe de elétrons gerado por um filamento de tungstênio, acelerado por uma diferença de potencial de 100 kV.

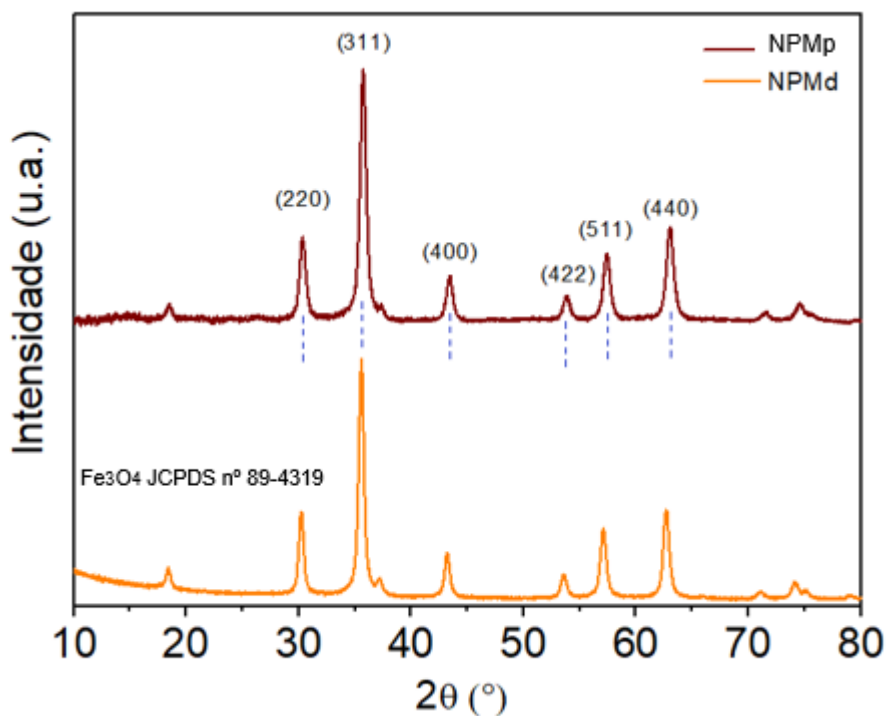
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização dos nanosistemas

Os nanosistemas magnéticos foram caracterizados em relação a suas propriedades físico-químicas.

Para identificar as fases resultantes das sínteses e determinar o grau de cristalinidade das nanopartículas magnéticas (NPs), o material puro após a síntese, foi caracterizado pela técnica de difração de raio-X (DRX), conforme ilustrado na (Figura 5). Os principais picos identificados correspondem aos planos de reflexão cristalina de Fe_3O_4 (220, 311, 400, 422, 511 e 440) e foram indexados conforme a ficha cristalográfica JCPDS nº 89-4319 (AZARNIER S.G et al., 2022). Essa congruência reforça a validade e a qualidade da síntese das nanopartículas de óxido de ferro. É importante ressaltar que não podemos afirmar com certeza que a amostra é exclusivamente composta de magnetita, pois o padrão de difração da maghemita é quase idêntico. No entanto, a cor da amostra é típica da magnetita (preta), ao passo que a maghemita possui uma coloração ocre, sugerindo uma composição prevalente de magnetita.

Figura 5: Gráfico de DRX gerado confirma que o biomaterial é uma nanopartícula de óxido de ferro. A similaridade entre as amostras pode ser observada. (NPMd) Nanopartícula magnética dopada com Co, Zn e Cr; (NPMp) Nanopartícula magnética pura. As amostras possuem cristalinidade semelhante.



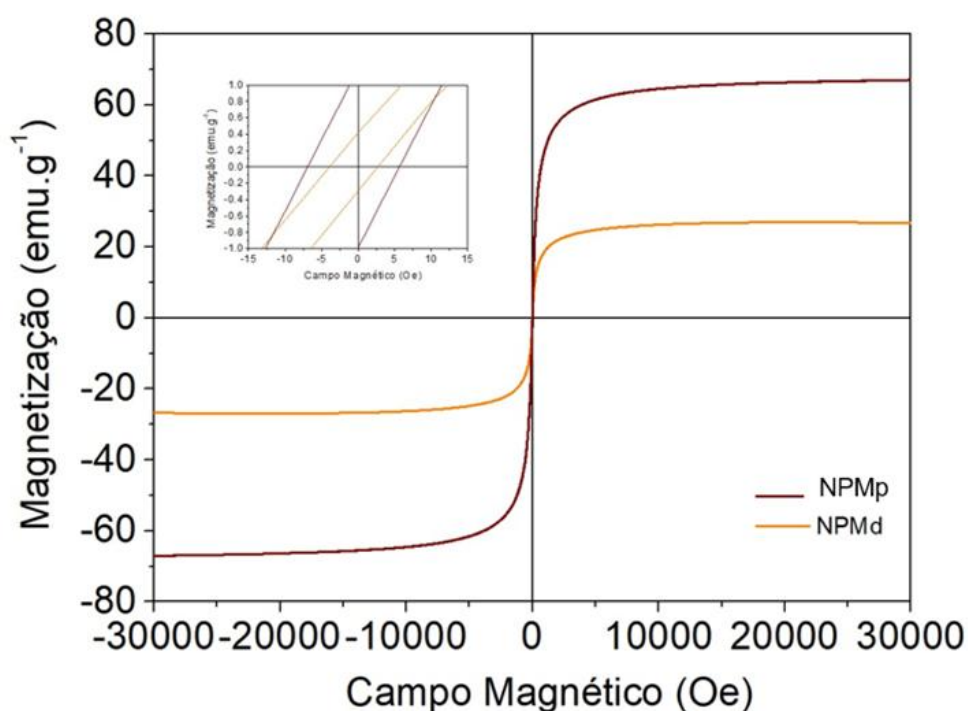
Em relação a sua estrutura cristalina, os óxidos de ferro podem existir em diferentes arranjos cristalográficos. Dentre esses se destacam a hematita (α -Fe₂O₃), a magnetita (Fe₃O₄) e a maghemita (γ -Fe₂O₃), devido ao seu polimorfismo, que envolve transições de fase induzidas por temperatura. A magnetita se distingue dos outros óxidos de ferro porque sua estrutura contém ferro em dois estados de oxidação: divalente e trivalente. O Fe₃O₄ possui uma estrutura cúbica de espinélio invertido, caracterizada por um empacotamento cúbico (WU et al., 2015). Quando dopada (ferrita de Zn/Co/Cr) a estrutura cristalina passa adotar um arranjo cúbico de face centrada (C L VALENTE-RODRIGUES et al., 2023). Esta alteração na estrutura cristalina é percebida pelo leve deslocamento para menores ângulos de difração (2θ), que sugere variações nas tensões da estrutura do óxido de ferro, devido a dopagem.

5.2 Regime magnético das nanopartículas (NPs)

As curvas de magnetização das partículas podem ser observadas na Figura 6. Ambas apresentaram um perfil de superparamagnetismo e valores de magnetização de saturação (M_s) de 67,0 e 27,0 emu/g para NPMp e NPMd, respectivamente, corroborando resultados reportados na literatura (C L VALENTE-RODRIGUES et al., 2023; MARTINS.M. G et al., 2023) além de exibir magnetização de remanência e campo coercitivo desprezíveis (respectivamente 1,0 emu/g e 7,0 Oe para NMP e 0,4

emu/g e 4,0 Oe para NPMd). A diminuição na magnetização de saturação da amostra NPMd em relação a NPMp confirma a dopagem com Zn/Co/Cr. A redução na Ms pode ser atribuída a mudança de composição e morfologia da partícula magnética (KIM et al., 2009).

Figura 6: Curvas de magnetização para as amostras de nanopartículas pura (NPMp) e dopada (NPMd) com suas respectivas ampliações da curva de histerese em função do campo magnético aplicado a 300 K.



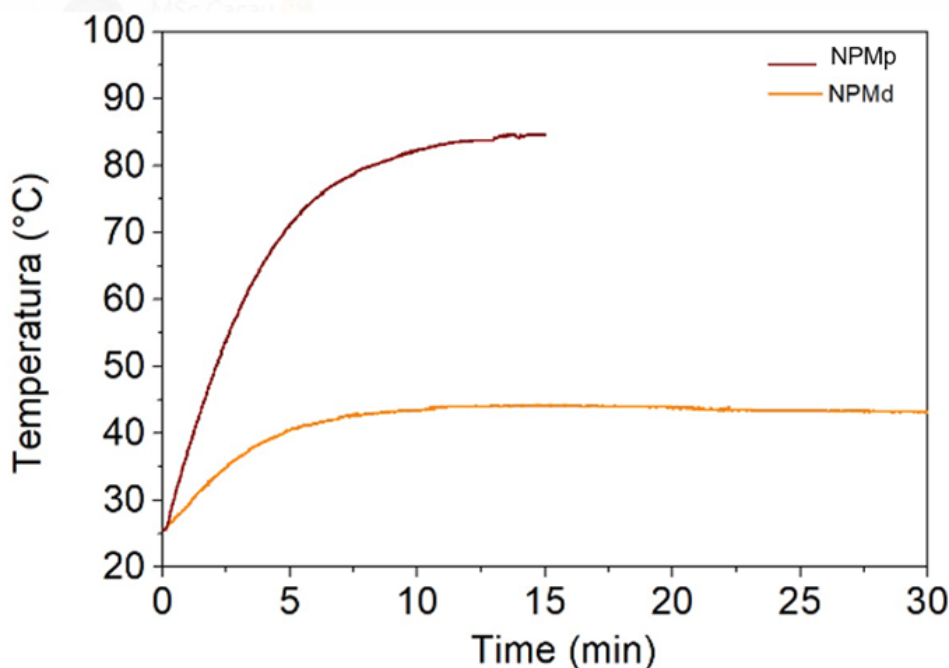
5.3 Perfil de liberação de calor dos nanosistemas

A técnica de hipertermia magnética foi utilizada para induzir a geração de calor pelas nanopartículas quando expostas a um campo magnético alternado. Na Figura 11, são exibidas as curvas de aquecimento das NPs em água. No gráfico, observa-se que a NPMd apresenta autorregulação na temperatura de 42°C. Em contraste, a NPMp, quando exposta ao campo magnético alternado, eleva sua temperatura acima de 80 °C em menos de 10 minutos, sem apresentar autorregulação.

A capacidade de autorregulação da NPMd é atribuída à sua baixa temperatura Curie resultante da dopagem com Zn/Co/Cr (W. ZHANG et al., 2018). Esse

comportamento é importante para aplicação no tratamento antitumoral, pois a autorregulação térmica em torno de 42 °C é crucial para a eficácia terapêutica.

Figura 7: Análise de Hipertermia das nanopartículas magnéticas, demonstrando a autorregulação térmica da NPMd e a elevada temperatura da NPMp. As amostras foram analisadas em uma concentração de 10 mg/ml de NPM e 20 mg/ml de NPMd. Foi aplicado um campo magnético alternado de 27 mT a uma frequência de 224 kHz.



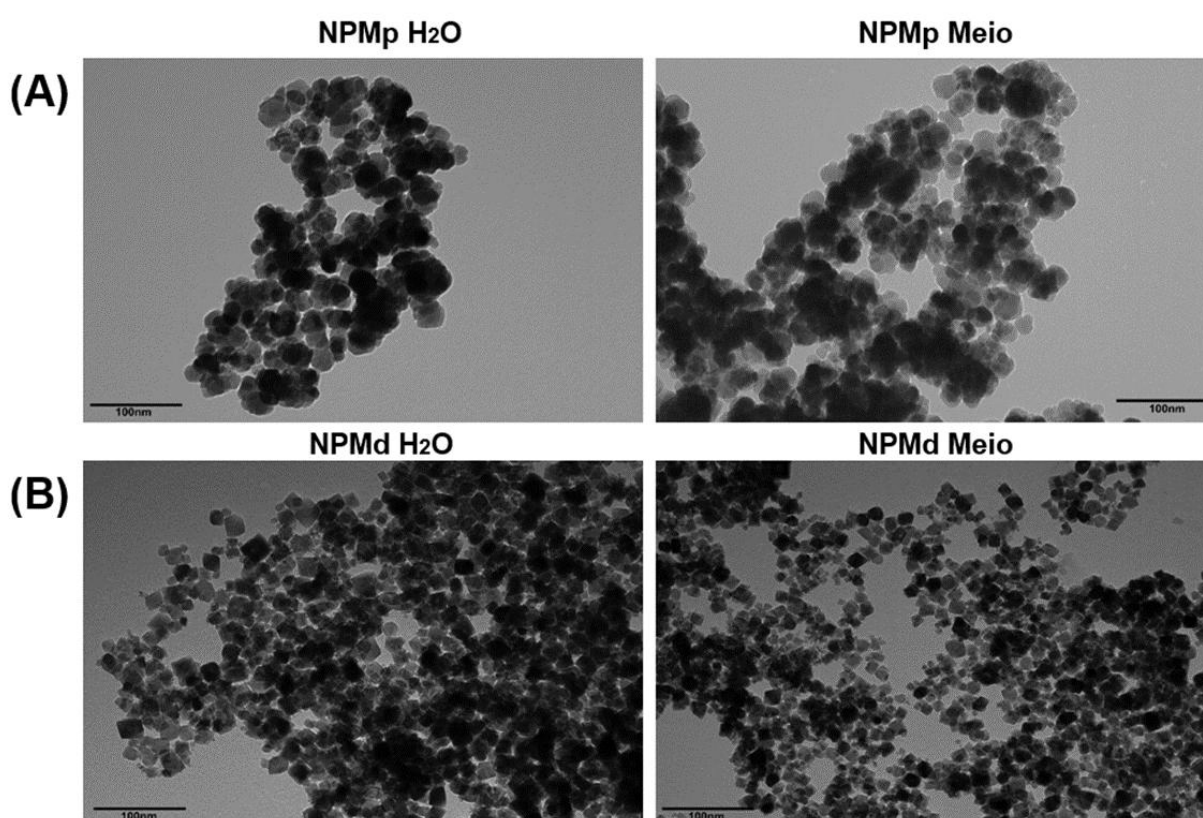
5.4 Estrutura morfológica dos nanosistemas

A morfologia das nanopartículas magnéticas foi avaliada por microscopia eletrônica de transmissão (MET). As micrografias obtidas são apresentadas na Figura 8 para ambas as amostras. A amostra de NPMp (A) apresentou morfologia esférica, enquanto a NPMd (B) exibiu uma morfologia cúbica. Em ambas, observou-se a tendência à formação de aglomerados, possivelmente devido ao modo de preparo das suspensões antes da análise ou à alta relação área/volume característica de materiais em escala nanométrica. Essas aglomerações foram identificadas tanto em água quanto em meio de cultura.

O tamanho, a composição e a morfologia das partículas de óxido de ferro são fatores determinantes para suas propriedades magnéticas. Estudos apontam que há um aumento significativo no diâmetro das NPs quando em contato com meio de cultura (YI-XIN et al., 2014). Embora a síntese convencional geralmente resulte em partículas esféricas, métodos alternativos permitem a obtenção de diferentes

formatos, conferindo propriedades magnéticas distintas. Entre as morfologias não convencionais, destacam-se os nanooctópodos (ZHAO et al., 2013), os nanocubos (KIM et al., 2009) e os nanoanéis (JIA et al., 2008).

Figura 8: A análise de microscopia eletrônica de transmissão (MET) das nanopartículas magnéticas revelou características distintas na morfologia entre as amostras. Na micrografia (A) observamos a morfologia esférica das nanopartículas, correspondendo à amostra NPMp. Já na micrografia (B) evidenciamos a morfologia cúbica das nanopartículas, representadas pela amostra NPMd.

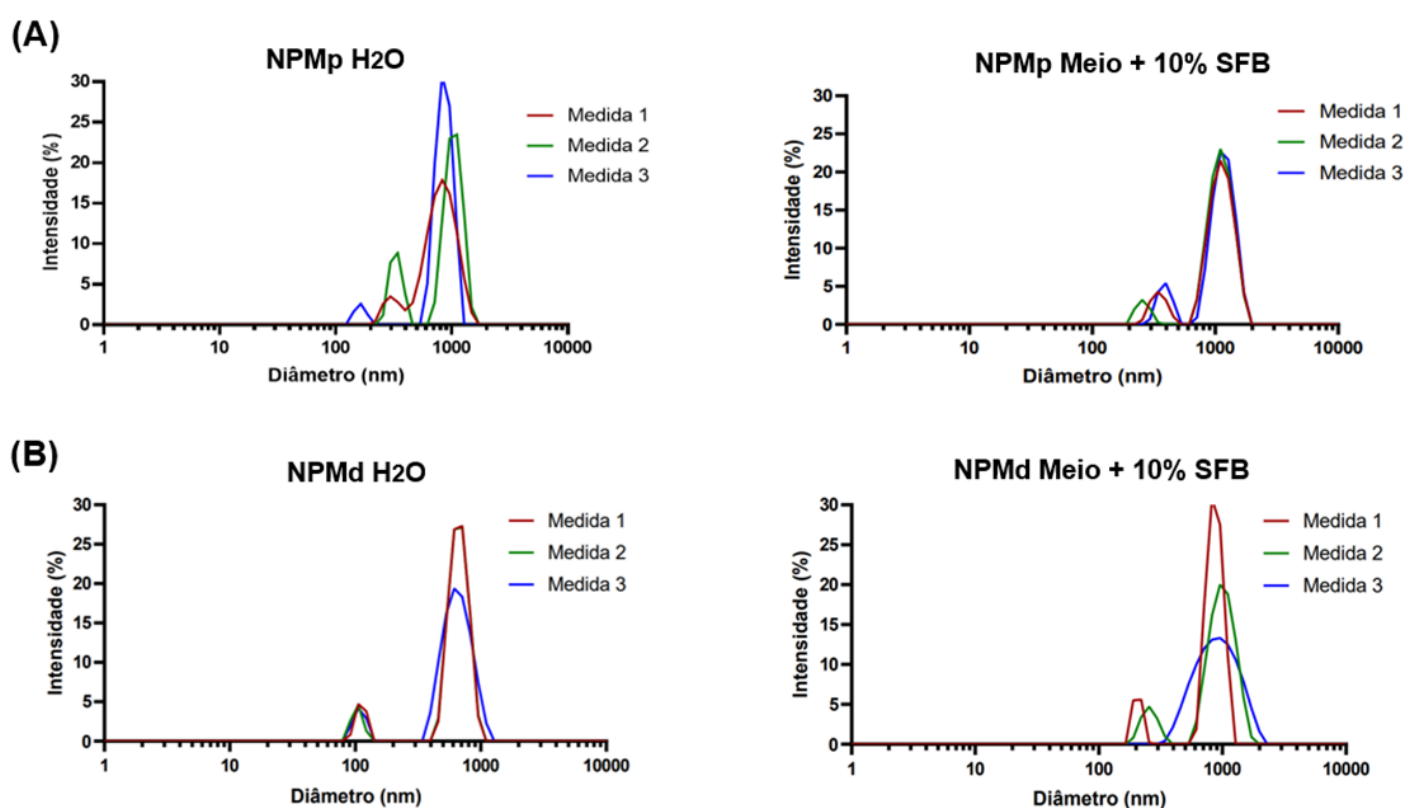


5.5 Distribuição de diâmetro hidrodinâmico das NPs

A técnica de espalhamento dinâmico de luz (DLS) foi utilizada para medir o tamanho das nanopartículas magnéticas (NPs) em seu estado de aglomeração. A análise revelou uma distribuição bimodal do diâmetro hidrodinâmico em ambas as amostras. Na amostra (A), correspondente à NPMp, a distribuição do diâmetro hidrodinâmico em água variou de 500 a 900 nm, com uma população predominante em torno de 700 nm, apresentando uma distribuição heterogênea. Em meio de cultivo suplementado com soro fetal bovino (SFB), os valores variaram entre 300 e 1000 nm, com um pico predominante em 1000 nm e uma população homogênea. Na amostra

(B), referente à NPMd, a distribuição em água variou de 100 a 700 nm, com uma população homogênea. Já em meio de cultivo + SFB, os valores oscilaram entre 250 e 1000 nm, com um pico principal em 900 nm e uma distribuição heterogênea.

Figura 9: A análise de Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS) das nanopartículas magnéticas, mostrando as medidas de tamanho das partículas. Na imagem (A), estão representadas as nanopartículas magnéticas pura (NPMp) em água e meio de cultivo. Na imagem (B), são apresentadas as nanopartículas magnéticas dopadas (NPMd) em água e meio de cultivo.



Descobertas indicam que quando nanopartículas e proteínas de meios suplementados interagem, os sais inorgânicos do DMEM contribuem para produzir grandes bio-coronas, cujo tamanho varia com a concentração e o tempo, como visto por (VIVAS et al., 2024).

5.6 Formação de proteína corona

O potencial Zeta foi determinado para avaliar a carga de superfície das nanopartículas magnéticas puras (NPMp) e dopadas (NPMd), como mostrado na Tabela 1 os resultados foram compilados em uma tabela, revelando uma considerável

adsorção de proteínas na presença de SFB. As amostras sem adição de meio exibiram valores menores de potencial zeta, -5,3 para NPMp e -3,1 para NPMd. Por outro lado, nas amostras expostas ao DMEM, observamos uma significativa adsorção de proteínas, como previsto, resultando em um aumento no potencial zeta. Os valores foram de -24,5 para NPM e -24,3 para NPMd. Esses resultados indicam que a presença de proteínas no meio de cultura influencia diretamente a carga de superfície das nanopartículas.

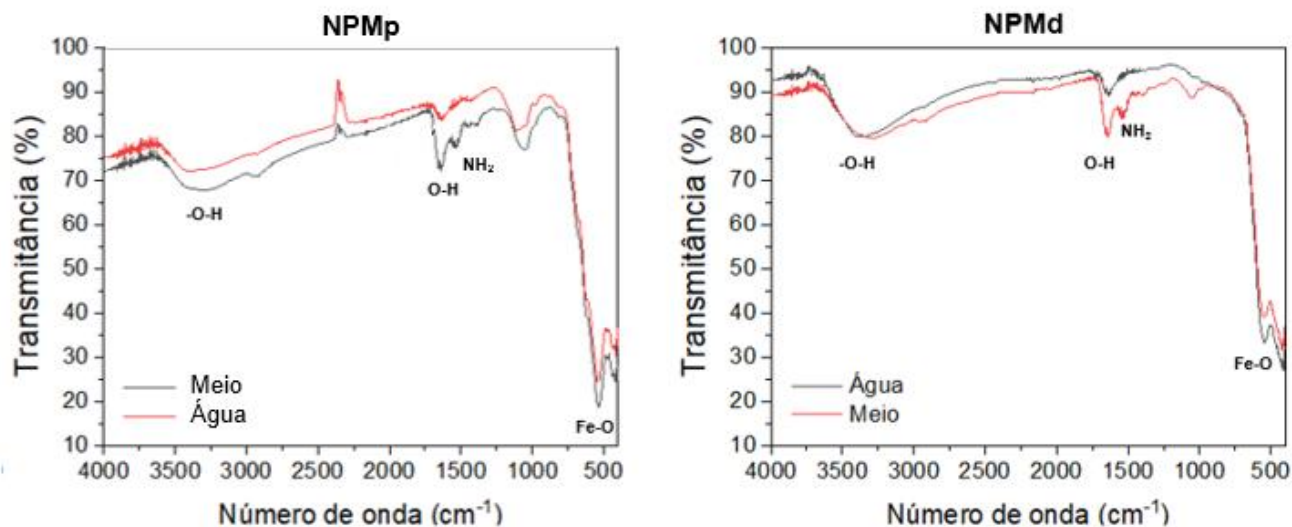
Tabela 1: Análise de Potencial Zeta das nanopartículas magnéticas, demonstrando o aumento da carga de superfície quando em contato com meio de cultura. Ambas as partículas NPMp e NPMd apresentaram incremento significativo no potencial Zeta após contato com o meio de cultivo.

Potencial Zeta (mV)

Amostra	H ₂ O	DMEM 10% SFB
NPMp	-5,3 ± 1,9	-24,5 ± 1,5
NPMd	-3,1 ± 0,2	-24,3 ± 1,5

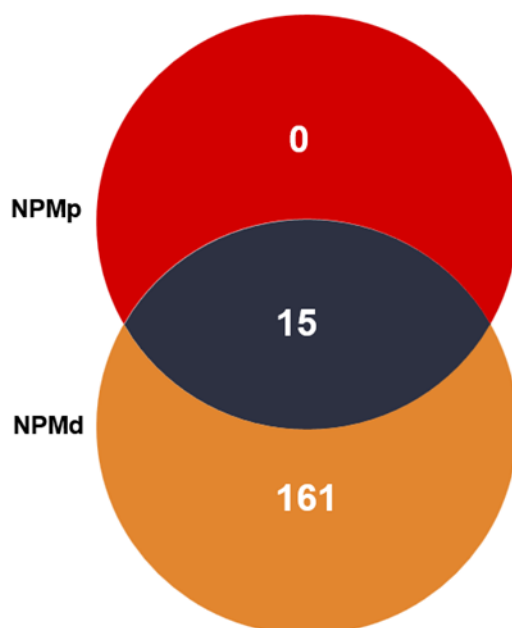
Utilizamos a técnica de FTIR para identificar os grupos funcionais dos biomateriais de nanopartículas de óxido de ferro. Foi possível identificar o grupo funcional característico do óxido de ferro, (Fe-O), através das bandas de absorção situadas em 540 cm⁻¹. Além disso, verificamos a presença do grupo amida (NH₂) na banda de 1500 cm⁻¹, confirmando que os materiais são de fato óxido de ferro. Esta presença de grupo amida após contato com meio de cultura sugere uma alta probabilidade de adsorção protéica desse meio. Para respaldar nossas observações, comparamos os resultados com as caracterizações de nanopartículas de óxido de ferro obtidas por (AZARNIER S.G et al., 2022), confirmando assim a natureza do nosso biomaterial. Os gráficos resultantes dessas análises estão representados na Figura 10.

Figura 10: Gráficos resultantes da leitura de FTIR, demonstrando a presença de Fe-O e grupo amida nas nanopartículas magnéticas (NPMp) e nanopartículas magnéticas dopadas (NPMd).



As análises de espectrometria revelaram uma possível adsorção proteica de NPMp e NPMd após o contato com o meio de cultura. Contudo, os resultados mostraram uma diferença na composição da proteína corona adsorvida pelos diferentes nanossistemas. Particularmente um total de 176 proteínas foram encontradas nas amostras de NPMp e NPMd. Surpreendentemente, apenas 15 proteínas foram encontradas tanto na NPMp quanto na NPMd, enquanto 161 essas proteínas são exclusivas da NPMd (Figura 11). A composição da corona proteica adsorvida compartilhada pelos dois nanossistemas foi evidenciada no (Quadro 4).

Figura 11: Gráfico ilustrativo do total de proteínas encontradas nas amostras de nanopartículas magnéticas pura (NPMp) e nanopartículas magnéticas dopadas (NPMd) após o contato com meio de cultura. Das 176 proteínas identificadas no total, 15 proteínas foram identificadas em ambas as partículas, enquanto 161 foram exclusivas da NPMd.

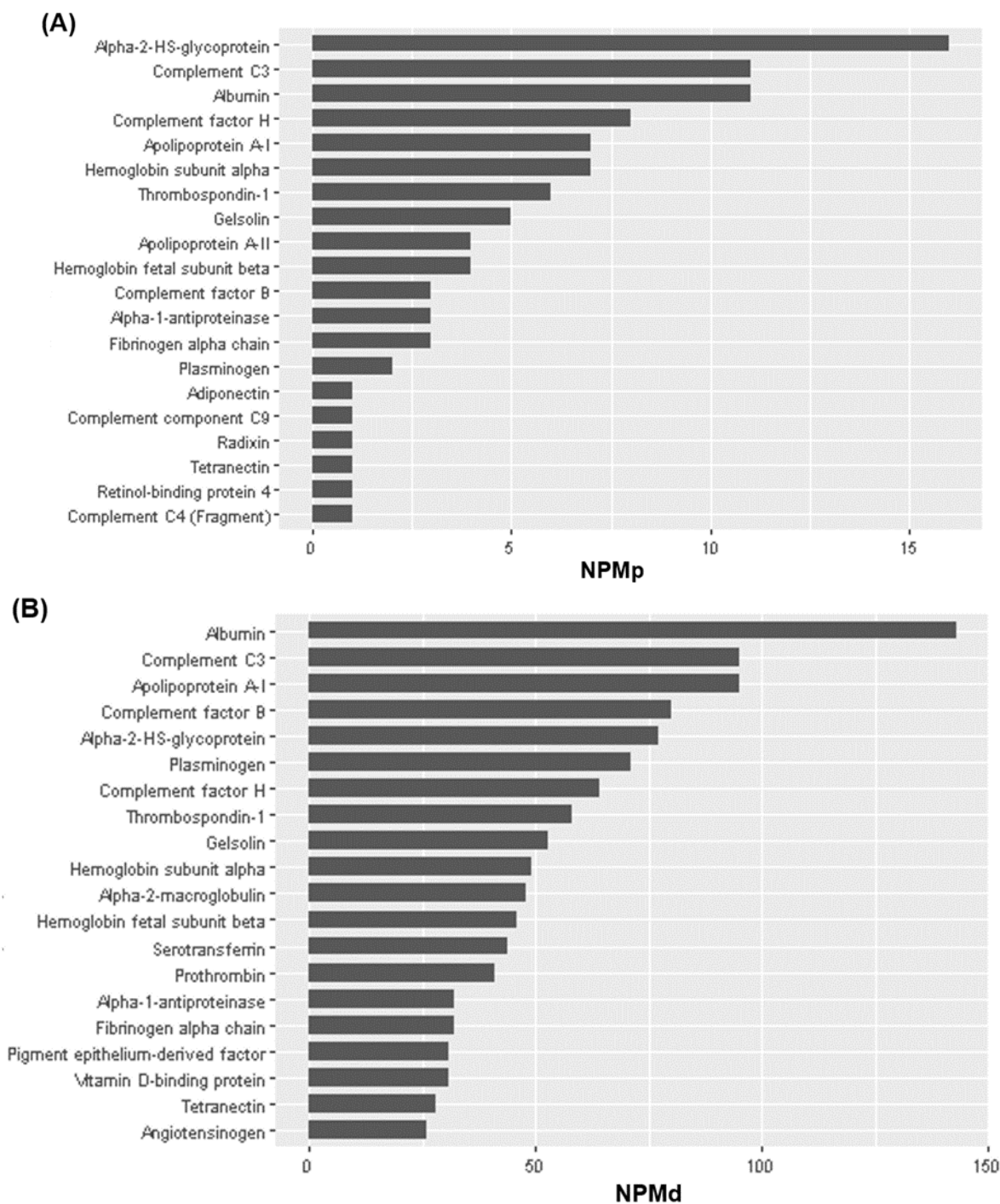


Quadro 4: Descrição de proteínas compartilhadas entre as nanopartículas analisadas.

Proteínas adsorvidas	
Albumin	Complement factor H
Alpha-1-Antiproteinase	Fibrinogen alpha chain
Alpha-2-HS-glycoprotein	Gelsolin
Apolipoprotein A-I	Hemoglobin fetal subunit beta
Apolipoprotein A-II	Hemoglobin subunit beta
Complement C3	Kininogen-1
Complement C4	Kininogen-2
Complement factor B	Plasminogen

As análises de bioinformática dos resultados obtidos identificaram as proteínas mais abundantes presentes nas nanopartículas magnéticas (NPs), gerando uma lista com as proteínas mais abundantes tanto nas NPMp quanto nas NPMd (Figura 9). Das 15 proteínas compartilhadas entre esses nanossistemas, 12 foram identificadas como as mais abundantes. Apesar destas proteínas resultarem absorvidas em ambos os sistemas a sua abundância na superfície de cada nanopartículas é diferente. Na NPMp, a proteína mais prevalente é a alfa-2-HS-glicoproteína, enquanto nas NPMd a mais abundante é a albumina.

Figura 12: Proteômica (A): Demonstração das proteínas mais abundantes na nanopartícula magnética pura (NPMp), onde a proteína Alfa-2-HS-Glicoproteína se destaca como a mais prevalente. (B) Demonstração das proteínas mais abundantes na nanopartícula magnética dopada (NPMd), com destaque para a prevalência da proteína albumina.



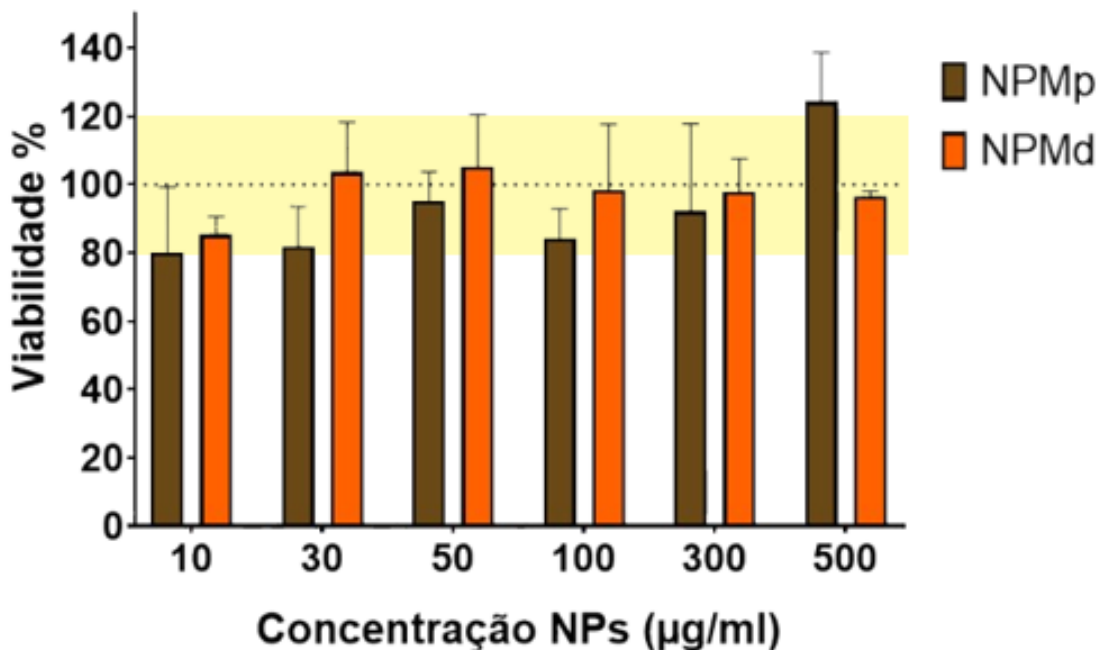
A composição da coroa proteica adsorvida na superfície de nanopartículas pode influenciar diretamente suas vias de internalização, um fator crucial na eficácia

dos sistemas de entrega de fármacos. Quando nanossistemas circulam na corrente sanguínea, diferentes proteínas plasmáticas podem se adsorver à sua superfície, formando a chamada “coroa proteica”, composta por albumina, imunoglobulinas, apolipoproteínas, fibrinogênio e componentes do sistema complemento, entre outras. A interação dessas proteínas com receptores específicos na membrana celular pode direcionar as nanopartículas por diferentes mecanismos de endocitose, influenciando seu destino intracelular e, conseqüentemente, sua biodistribuição e resposta biológica (BASHIRI et al., 2023). A variação no perfil de proteínas adsorvidas depende das propriedades físico-químicas do nanossistema. Por exemplo, enquanto um nanossistema pode apresentar maior afinidade por albumina e imunoglobulinas, outro pode adsorver preferencialmente apolipoproteínas e fibrinogênio. Essas diferenças impactam diretamente a via de internalização celular, que pode ocorrer por mecanismos distintos, como endocitose mediada por clatrina, caveolina ou macropinocitose. Segundo (BENTO-ABREU et al., 2009), a albumina, quando ligada à megalina, pode ser endocitada tanto por caveolas, estruturas ricas em caveolina, quanto por fossos revestidos de clatrina, evidenciando a importância dos receptores na captação de biomoléculas e nanopartículas. Estudos indicam que as proteínas coronais não apenas modulam a endocitose, mas também afetam o tráfego intracelular das nanopartículas. O trabalho de (RONG CAI et al., 2020) demonstrou que a coroa proteica altera as vias de internalização dos nanobastões de ouro por macrófagos devido à interação diferencial das proteínas com receptores de membrana, afetando a eficiência de internalização e, conseqüentemente, a resposta imunológica e a eficácia terapêutica. Esse efeito pode ser observado também em nanossistemas de sílica (SiO_2), nos quais experimentos com inibidores de endocitose e colocalização de nanopartículas com marcadores de vesículas endocíticas confirmaram o envolvimento da macropinocitose na captação dessas partículas (VRANIC et al., 2013). Além disso, a escolha da via de endocitose influencia diretamente o destino intracelular das nanopartículas. Enquanto algumas vias levam as partículas para reciclagem na membrana celular, outras direcionam-nas para endossomos iniciais e, posteriormente, para os lisossomos, onde podem ser degradadas ou armazenadas por longos períodos (RENNICK et al., 2021). Dessa forma, compreender e controlar o perfil proteico adsorvido nas nanopartículas é essencial para otimizar sua captação celular e aprimorar seu desempenho como sistema de entrega de fármacos.

5.7 Citotoxicidade (ISO 10993-5/2009)

Para avaliar a segurança no uso das nanopartículas de óxido de ferro como tratamento para o osteossarcoma foi realizado um ensaio de citotoxicidade em células 2D, seguindo a ISO 10993-5/2009. Os resultados mostraram que nenhuma das formulações testadas, tanto as nanopartículas magnéticas puras (NPMp) quanto as nanopartículas modificadas (NPMd), apresentou efeito citotóxico sobre as células SAOS-2 em nenhuma das concentrações avaliadas, com a viabilidade celular permanecendo acima de 80% em todos os grupos (Figura 13). No entanto, na concentração de 500 µg/mL de NPMp, observou-se um aumento na absorbância, possivelmente devido à interferência das nanopartículas na leitura do ensaio de MTT, apesar dos valores permanecerem dentro dos que a ISO indica como ausência de citotoxicidade.

Figura 13: Viabilidade celular (%) das células SAOS-2 tratadas com NPMp e NPMd, avaliada pelo ensaio de MTT conforme a ISO 10993-5/2009. Observa-se ausência de citotoxicidade (>80%) em todas as concentrações testadas. A leve variação na absorbância em 500 µg/mL de NPMp sugere interferência óptica das nanopartículas. A concentração de 300 µg/mL foi escolhida para minimizar interferências. Valores expressos como média ± desvio padrão ($n = 3$).



A interferência óptica de nanopartículas coloridas em métodos baseados em absorbância, como o ensaio de MTT, é um desafio amplamente reconhecido, mas ainda não há um consenso regulatório sobre sua mitigação. Atualmente, a ISO 10993-5/2009 é a principal referência para avaliação de citotoxicidade, mas não foi originalmente desenvolvida para nanomateriais, o que pode comprometer a precisão dos resultados em determinados casos. O Guia nº 63/2023, que trata da segurança biológica de materiais nanotecnológicos, reconhece essa limitação e enfatiza a necessidade de caracterização físico-química detalhada dos nanomateriais, além da adaptação ou complementação dos métodos tradicionais para garantir resultados confiáveis (LEWINSKI N et al., 2008).

Dessa forma, a ausência de um marco regulatório consolidado para nanomateriais reforça a necessidade urgente de revisão das diretrizes existentes. A adoção de abordagens complementares, como ensaios baseados em fluorescência e luminescência, pode ajudar a minimizar interferências e melhorar a precisão dos testes. Essa limitação metodológica evidencia a importância da adaptação dos ensaios convencionais para uma realidade nanotecnológica emergente, visando maior confiabilidade na avaliação da biocompatibilidade e segurança desses materiais em aplicações biomédicas (ESHRATI YEGANEH et al., 2022).

Contudo, no presente estudo, a concentração de 300 µg/mL foi escolhida para os experimentos subsequentes, visando garantir a ausência de efeitos adversos e minimizando possíveis interferências analíticas.

5.8 Mecanismo de internalização das NPs

Para a análise da internalização e das vias endocíticas utilizadas pelas células, inibimos seletivamente as principais vias endocíticas, a saber endocitose mediada por clatrina, caveolina, macropinocitose e raft lipídico. Foram utilizadas NPs previamente marcadas com rodamina, de forma que pudessem ser visualizadas em imagem de microscopia confocal.

Para cada inibidor, uma molécula traçadora específica foi utilizada, também em doses já descritas previamente na literatura por EVGENIYA et al, 2021, LIANG et al, 2021, NASAKO et al, 2020, BENCHIMOL, 2020, TYRPAK et al, 2019, HOLOWNIA, 2019, PERISA et al 2016. Estes estudos permitiram estabelecer a concentração ideal dos inibidores, que conseguiu inibir significativamente a via endocítica sem produzir

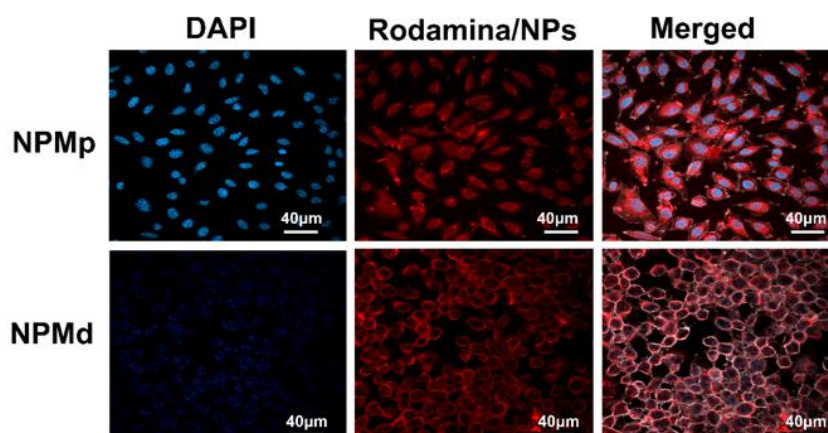
nenhuma alteração morfológica ou morte celular nas células. As concentrações testadas para as vias de clatrina, caveolina e raft lipídico confirmaram os dados na literatura e dispensando a testagem do outro inibidor (para via macropinocitose) cuja concentração foi baseada na literatura.

Prosseguimos, portanto, com a análise individual das vias endocíticas, com o propósito de compreender através de qual ou quais vias as NPs são internalizadas. Os resultados podem ser observados na Figura 14, mostrando uma internalização das NPMp por todas as vias de internalização estudadas, independentemente da inibição. Contudo, foi observada uma tendência de redução da internalização, após a inibição da via de endocitose por clatrina. Por outro lado, as NPMd mostraram uma internalização prevalente por endocitose mediada por clatrina e raft lipídico.

Com base nos resultados obtidos, concluímos que a NPMp não apresenta uma via preferencial entre as testadas, sendo internalizada por múltiplos mecanismos. Já a NPMd demonstra uma preferência clara pelas vias mediadas por clatrina e rafts lipídicos, indicando um mecanismo de internalização mais seletivo.

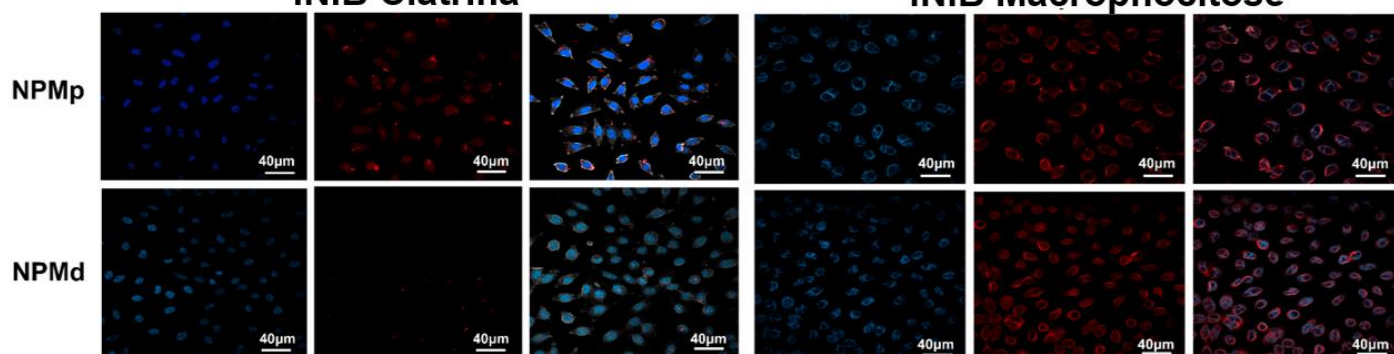
Figura 14: Análise da internalização das nanopartículas NPMp e NPMd por microscopia confocal. As imagens mostram a captação celular de ambas as nanopartículas na ausência e presença de inibidores, evidenciando diferenças em seus mecanismos de internalização.

S/ inibidor



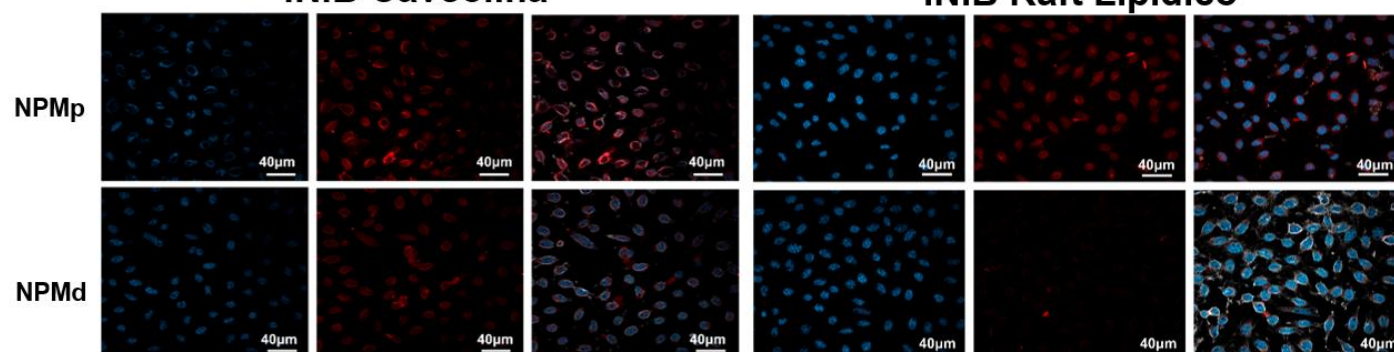
INIB Clatrina

INIB Macropnocitose



INIB Caveolina

INIB Raft Lipídico



As diferenças nas características físico-químicas e tamanho das NPs podem influenciar a via de internalização utilizada pelas células e assim, seu comportamento biológico (WANG et al., 2017).

A literatura sugere que certas nanopartículas, como as de poliestireno, tendem a seguir a via mediada por clatrina independentemente do tamanho. No entanto, modificações na superfície das NPs lipídicas podem direcioná-las para a via mediada por caveolina ou macropinocitose. Isso demonstra a plasticidade dos mecanismos

endocíticos em resposta às características físico-químicas específicas de cada tipo de nanopartícula (WANG et al., 2017).

KAIHANG GUAN et al. demonstraram que, em alguns tipos celulares, como os neutrófilos, a internalização eficiente de nanopartículas (NPs) pode ocorrer independentemente do tipo de NPs utilizada, embora os mecanismos de captação possam variar. Contudo, o estudo destaca que um fator crucial nesse processo é a presença de plasma no meio, que influencia significativamente a ligação das NPs às células. Esse achado sugere que a composição da coroa proteica formada ao redor das NPs pode modular suas interações com os receptores celulares, afetando diretamente a via de internalização.

Nossos resultados confirmaram a formação dessa coroa proteica, com a identificação de 176 proteínas adsorvidas na superfície das NPs após contato com o meio de cultura DMEM suplementado com soro fetal bovino. Além disso, observamos um perfil distinto de adsorção proteica entre as NPMp e as NPMd.

A composição da superfície das NPs desempenha um papel fundamental na escolha da via endocítica utilizada pelas células. NPs baseadas em albumina, como aquelas compostas por albumina sérica humana (HSA) ou albumina sérica bovina (BSA), podem apresentar carga positiva ou negativa, dependendo da modificação química ou da natureza do fármaco encapsulado. Estudos indicam que essas NPs adsorvidas com albumina são preferencialmente internalizadas por endocitose mediada por clatrina (GARANINA A et al., 2024). Esse dado corrobora nossos achados, visto que as NPMd apresentaram uma clara preferência pela via de internalização mediada por clatrina. Além disso, nossa análise proteômica revelou uma maior abundância de albumina na superfície das NPMd, reforçando a relação entre a composição proteica das NPs e a via predominante de captação celular.

No caso das nanopartículas de óxido de ferro (IONPs) puras, a endocitose mediada por caveolina é amplamente relatada como a principal via de entrada. Contudo, modificações na superfície dessas NPs podem alterar seu comportamento. Por exemplo, a funcionalização com dimercaptosuccinato pode redirecionar sua internalização para a via mediada por clatrina ou até para macropinocitose, dependendo do tipo celular analisado (LIU Q et al., 2019). Esses achados reforçam a importância da caracterização detalhada da superfície das NPs no desenvolvimento de sistemas terapêuticos, uma vez que a via de internalização pode impactar diretamente a biodistribuição e a eficácia terapêutica.

Estudos adicionais revelaram que agregados menores de SPIONs (superparamagnetic iron oxide nanoparticles) foram observados próximos a regiões da membrana celular revestidas de clatrina. Vesículas de clatrina contendo pequenos agregados de SPIONs (menores que 200 nm) foram identificadas no citoplasma, próximas à membrana. Por outro lado, agregados maiores foram localizados na periferia celular, frequentemente engolfados por extensões da membrana, sugerindo um processo de captação macropinocítica. Outros estudos também propuseram a macropinocitose como um mecanismo relevante para a internalização de nanopartículas de óxido de ferro catiônicas, além de outras nanopartículas. De fato, as nanopartículas de óxido de ferro superparamagnéticas foram internalizadas por um processo dependente de energia e localizadas em endossomos, demonstrando que a escolha entre macropinocitose e endocitose mediada por clatrina depende do tamanho dos agregados (CALERO M et al., 2015).

A endocitose mediada por clatrina é um dos principais mecanismos de internalização de nanopartículas. No entanto, seu processo regulador ainda não está completamente elucidado. Um estudo recente observou que a proteína adaptadora HIP-55 regula essa via de endocitose, evidenciando o papel das proteínas na modulação dos mecanismos de captação celular (KAIHANG GUAN et al., 2023).

Para esclarecer as vias de transporte dessas nanopartículas, estudos de inibição farmacológica e knock-down de genes demonstraram que os GCPN (complexos de nanopartículas de glicoproteínas) foram predominantemente internalizados por endocitose mediada por balsas lipídicas não caveolares. A análise proteômica desses estudos permitiu explorar os mecanismos de transporte com maior profundidade, identificando 561 proteínas. O estudo revelou que diversas vias estavam reguladas positivamente e poderiam atuar em conjunto para facilitar a internalização, fato este que corrobora com nossos resultados de internalização de NPMp. Entre as proteínas altamente expressas, a proteína 2 de mielina e linfócitos (MAL2) foi selecionada e confirmada como colocalizada com os GCPN, reforçando o envolvimento das balsas lipídicas nesse processo (FEIYANG DENG, 2022). Esses achados corroboram nossos resultados, pois as NPMd, que apresentaram maior adsorção de proteínas em comparação com as NPMp, também exibiram glicoproteínas na superfície. Além disso, as NPMd demonstraram um perfil de internalização mais elevada por meio da via mediada por balsas lipídicas.

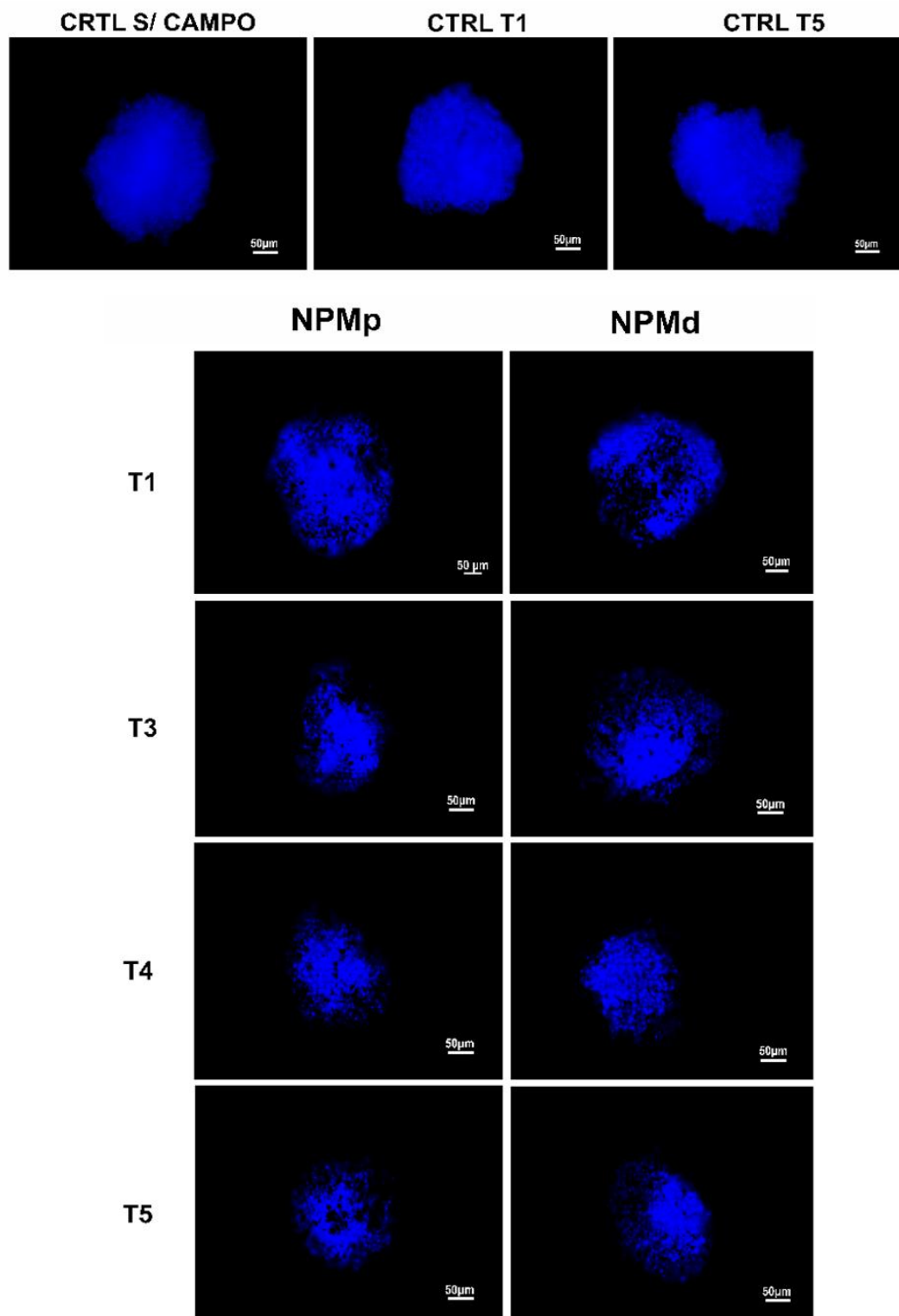
Outro fator relevante é o destino intracelular das nanopartículas após a internalização. As proteínas adsorvidas na superfície das NPs podem ser retidas até sua degradação nos lisossomos, destacando a necessidade de compreender não apenas a captação, mas também a trajetória intracelular das partículas (BERTOLI et al., 2016). Após a endocitose, as NPs podem ser transportadas para os endossomos e, posteriormente, para os lisossomos, onde ocorre sua degradação. No entanto, parte das proteínas associadas à superfície das NPs pode ser reciclada de volta para a membrana plasmática, participando da renovação da membrana celular ou influenciando novos eventos de internalização. Além disso, as NPs podem ser recirculadas para o meio extracelular via exocitose, um mecanismo que não apenas regula sua eliminação, mas também pode modular a resposta celular. A exocitose pode ocorrer por meio de vesículas que transportam as NPs dos endossomos para a membrana plasmática, impactando diretamente sua biodistribuição e eficácia terapêutica. Dependendo da natureza da nanopartícula e do tipo celular, diferentes rotas de exocitose podem ser seguidas, influenciando a interação das NPs com o microambiente e potencialmente modulando mecanismos de resistência celular.

Nossos dados não apenas corroboram estudos prévios da literatura, mas também ampliam o entendimento sobre a relação entre a composição da coroa proteica e a via de captação celular. Essa compreensão é essencial para o design racional de nanopartículas, permitindo a otimização de sua entrega intracelular e a maximização de seus efeitos terapêuticos.

5.9 Efeito da hipertermia magnética após aplicação do campo magnético alternado em células 3D: potencial terapêutico para osteossarcoma

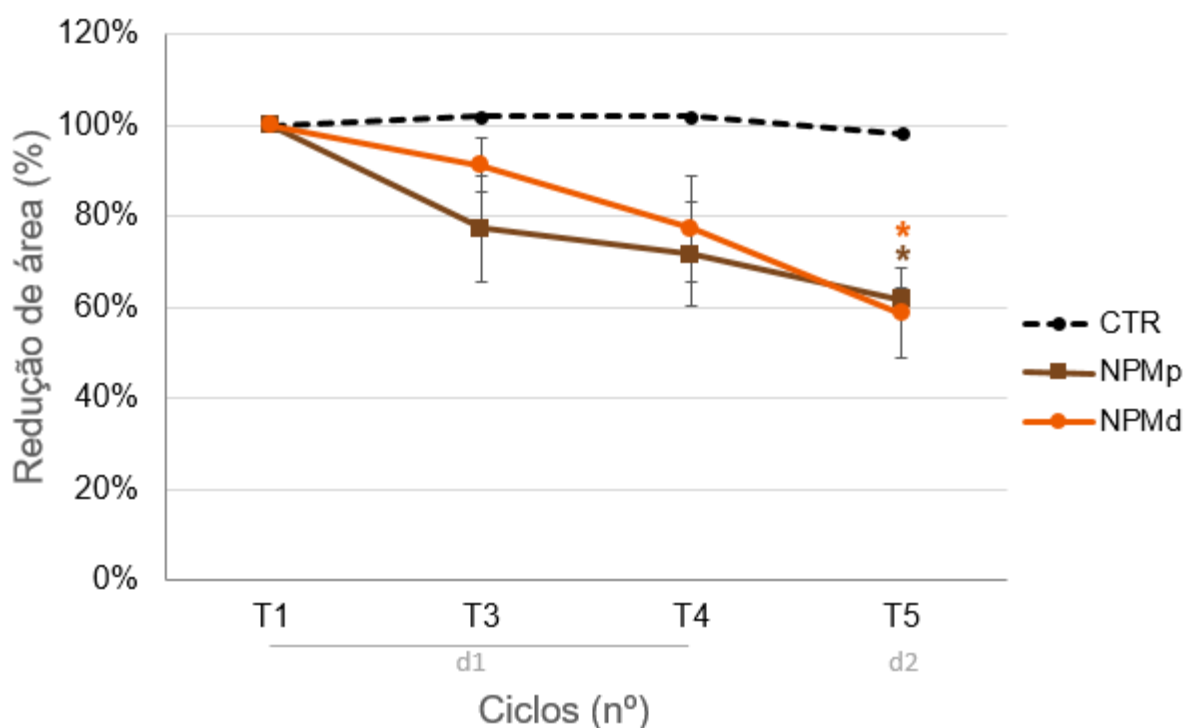
Uma vez confirmada a capacidade de internalização das nanopartículas (NPMp e NPMd) nos esferóides tumorais de SAOS-2 e a ausência de citotoxicidade após o contato com as partículas, estes foram submetidos à aplicação de campo magnético alternado em cinco ciclos de 10 minutos cada (conforme detalhado na seção 4.3.4). Para avaliar os possíveis efeitos da aplicação do campo magnético sobre os esferóides, foram obtidas imagens representativas dos esferóides marcados com corante nuclear (Figura 15).

Figura 15: Efeito da exposição cumulativa do campo magnético aos esferoides.



Os resultados demonstraram uma redução no tamanho dos esferoides a partir do terceiro ciclo cumulativo de exposição ao campo magnético, no primeiro dia, para ambas as nanopartículas testadas (Figura 15). Além disso, conforme demonstrado pela análise quantitativa da área dos esferoides (Figura 16), medida por meio do software ImageJ, o tamanho do esferoide é reduzido de forma diretamente proporcional aos ciclos de campos aplicados, após o contato com ambas as NPs, mostrando uma diferença significativa comparado com o controle (exposto apenas a campo magnético, sem NPs) após quatro ciclos cumulativos, sendo os três primeiros no primeiro dia e o último após um descanso de 24 horas (T5).

Figura 16: Análise da área de elipse dos esferóides após aplicação do campo magnético.



Além disso, inicialmente (T3), os esferoides expostos a NPMp apresentaram uma maior taxa de redução em comparação àqueles tratados com NPMd. No entanto, essa diferença tornou-se gradualmente menos pronunciada, desaparecendo nos tempos subsequentes (Figura 16).

O uso de modelos tridimensionais de esferoides para investigar os efeitos cumulativos do campo magnético após o contato com as nanopartículas terapêuticas

tem se tornado cada vez mais relevante na pesquisa contra o câncer. Esses modelos não apenas reproduzem de forma mais realista a complexidade do microambiente tumoral, mas também fornecem dados mais previsíveis sobre a eficácia dos tratamentos em sistemas *in vivo*.

Por exemplo, de acordo com BRÜNIGK et al. (2020), os esferoides apresentam menor sensibilidade ao calor em comparação às células cultivadas em monocamada. A literatura demonstra que modelos tridimensionais respondem de maneira distinta a terapias como radiação e hipertermia magnética, efeitos que não são observados em culturas bidimensionais. Esses achados sugerem que a hipertermia magnética pode afetar as células independentemente de seu estado proliferativo, enquanto a radiação tem maior impacto sobre células em divisão ativa. Dessa forma, o uso de esferoides tumorais para avaliar a hipertermia magnética se destaca como uma estratégia essencial para compreender melhor os mecanismos de resposta celular e otimizar abordagens terapêuticas mais eficazes no combate ao câncer.

Nosso estudo demonstrou uma redução no tamanho dos esferoides expostos ao campo magnético após a internalização das NPMp e NPMd. Essa redução pode estar associada tanto a efeitos térmicos da hipertermia magnética quanto a forças mecânicas decorrentes do movimento browniano das nanopartículas (MAMANI et al., 2021). Esse deslocamento aleatório, intensificado pela aplicação do campo magnético, pode influenciar a organização celular e a integridade estrutural dos esferoides, contribuindo para a redução de tamanho observada.

Estudos anteriores do nosso grupo e dados da literatura (STOCKE et al., 2018; MARTINS et al., 2023) também relataram a redução do tamanho dos esferoides após o contato com NPMp e quatro aplicações do campo magnético, sugerindo um possível efeito cumulativo dessa exposição. Nossos resultados corroboram essa observação, evidenciando uma redução mais expressiva no ciclo T5 para ambas as partículas. Isso sugere que tanto o estímulo magnético sucessivo quanto a dopagem das NPMd contribuem para esse fenômeno. Esse efeito cumulativo pode estar relacionado ao aumento progressivo da dissipação de calor gerada pelas nanopartículas, impactando diretamente a viabilidade celular e a estrutura dos esferoides.

Observamos, contudo, uma tendência de redução mais acentuada nos esferoides expostos a NPMp em comparação aos expostos a NPMd nos primeiros ciclos. Esse comportamento pode ser atribuído à dopagem das NPMd com zinco, cobalto e cromo, que confere a essas nanopartículas um mecanismo de

autorregulação térmica. Isso sugere que, nos primeiros ciclos, a redução de tamanho dos esferoides expostos a NPMd esteja mais associada ao mecanismo de hipertermia e menos ao efeito mecânico das nanopartículas. Entretanto, essa diferença desaparece com o efeito cumulativo, sugerindo que o efeito de ação mecânica compensa as diferenças de liberação de calor pelas partículas após 5 ciclos de aplicação de campo magnético alternado.

Esse comportamento pode estar relacionado à morfologia cúbica das NPMd, que facilita a internalização celular devido à sua geometria angular e menor tamanho. Além disso, a maior quantidade de proteínas adsorvidas na superfície das NPMd pode favorecer a formação de uma coroa proteica, promovendo a endocitose e intensificando os danos celulares induzidos pelo campo magnético. Essas características tornam as NPMd uma estratégia promissora para aplicações terapêuticas direcionadas a células tumorais. Sua capacidade de manter a temperatura autorregulada reduz o risco de danos às células saudáveis, afetando seletivamente as células cancerosas, que possuem menor capacidade de termorregulação e são mais sensíveis a variações térmicas.

No entanto, para otimizar essa abordagem terapêutica, são necessários estudos adicionais para diferenciar os efeitos do campo magnético cumulativo, do impacto da dopagem e das interações físico-químicas da dopagem no material.

No contexto da hipertermia magnética terapêutica, também é crucial determinar a quantidade ideal de nanopartículas necessárias para obter o efeito terapêutico desejado, minimizando potenciais efeitos adversos. Este estudo sugere que ciclos repetidos de aplicação do campo magnético podem potencializar os efeitos terapêuticos sem a necessidade de novas exposições às nanopartículas, o que pode aumentar a segurança do tratamento (BEOLA *et al.*, 2018).

Além disso, a via de administração das nanopartículas desempenha um papel fundamental na eficácia do tratamento. Existem diferentes formas de aplicação, cada uma com vantagens específicas dependendo do alvo terapêutico e da estratégia desejada. A administração intravenosa é amplamente utilizada em terapias oncológicas e em diagnósticos por imagem, como ressonância magnética, permitindo a distribuição das nanopartículas pela circulação sanguínea. Já a administração local (intratumoral) garante maior concentração de nanopartículas no tecido-alvo, aumentando a eficácia terapêutica e minimizando efeitos colaterais sistêmicos uma abordagem particularmente vantajosa para a hipertermia magnética localizada.

A administração por inalação surge como uma alternativa interessante, especialmente para tumores pulmonares ou doenças respiratórias, proporcionando uma entrega direcionada e limitando a distribuição sistêmica. Embora a administração oral seja menos comum para nanopartículas magnéticas, ela pode ser explorada para a liberação controlada de fármacos em condições gastrointestinais específicas (PEREZ-POTTI et al., 2023).

Além disso, a aplicação do campo magnético em esferóides contendo nanopartículas pode influenciar a morfologia das próprias partículas, reforçando o potencial dessa abordagem para estratégias terapêuticas no tratamento do câncer (SILVA et al., 2011). Um estudo conduzido por (DUDECK et al., 2006) sobre a infusão arterial local de partículas de óxido de ferro superparamagnético (SPIO) em pacientes com carcinoma hepatocelular demonstrou seu potencial na redução tumoral por meio da quimioembolização. Os resultados indicaram que essa abordagem não apenas reduz significativamente o tamanho do tumor, mas também diminui a intensidade do sinal intratumoral em sequências de ressonância magnética. Esses achados ressaltam a eficácia da administração seletiva, destacando seu papel promissor em terapias direcionadas ao câncer.

Por fim, a aplicação de nanopartículas multifuncionais, que atuam simultaneamente como agentes de diagnóstico e tratamento, apresenta grande potencial. Essa abordagem não só reduz a necessidade de múltiplas intervenções médicas, mas também pode otimizar os resultados terapêuticos e melhorar a qualidade de vida dos pacientes.

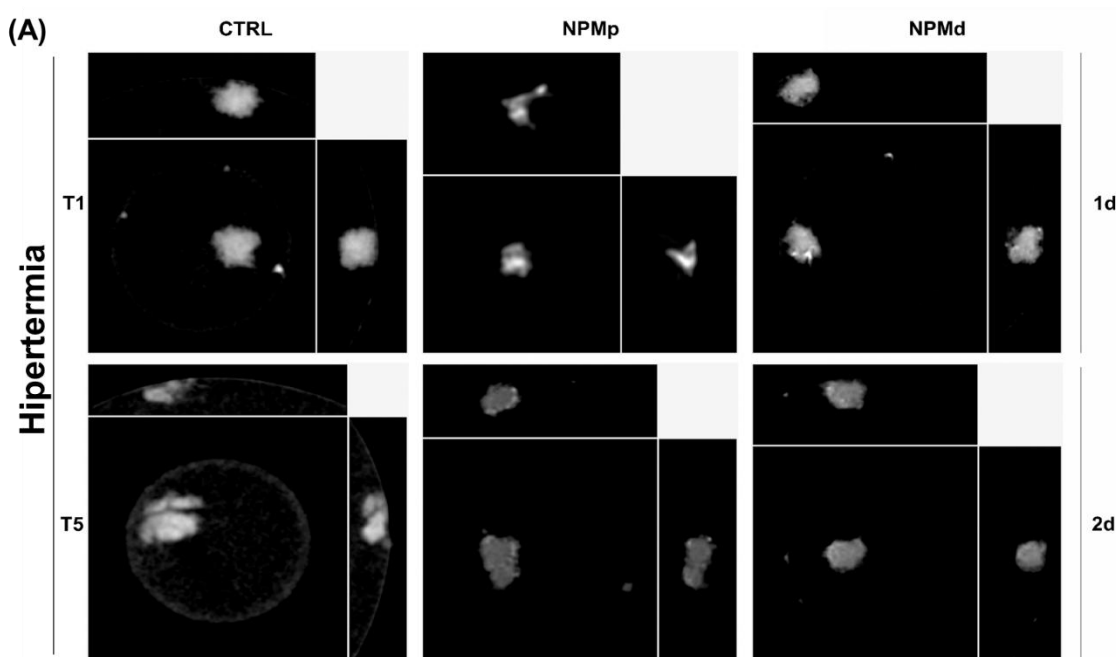
No caso específico do osteossarcoma, uma estratégia baseada na injeção local de NPs pode proporcionar maior concentração das nanopartículas no tecido ósseo afetado, maximizando os efeitos terapêuticos da hipertermia magnética e minimizando danos aos tecidos saudáveis circundantes. Essa abordagem pode ser particularmente vantajosa devido à natureza agressiva e à localização anatômica do osteossarcoma, permitindo um controle mais preciso da progressão tumoral e, potencialmente, reduzindo a necessidade de tratamentos sistêmicos mais invasivos (BEOLA et al., 2020).

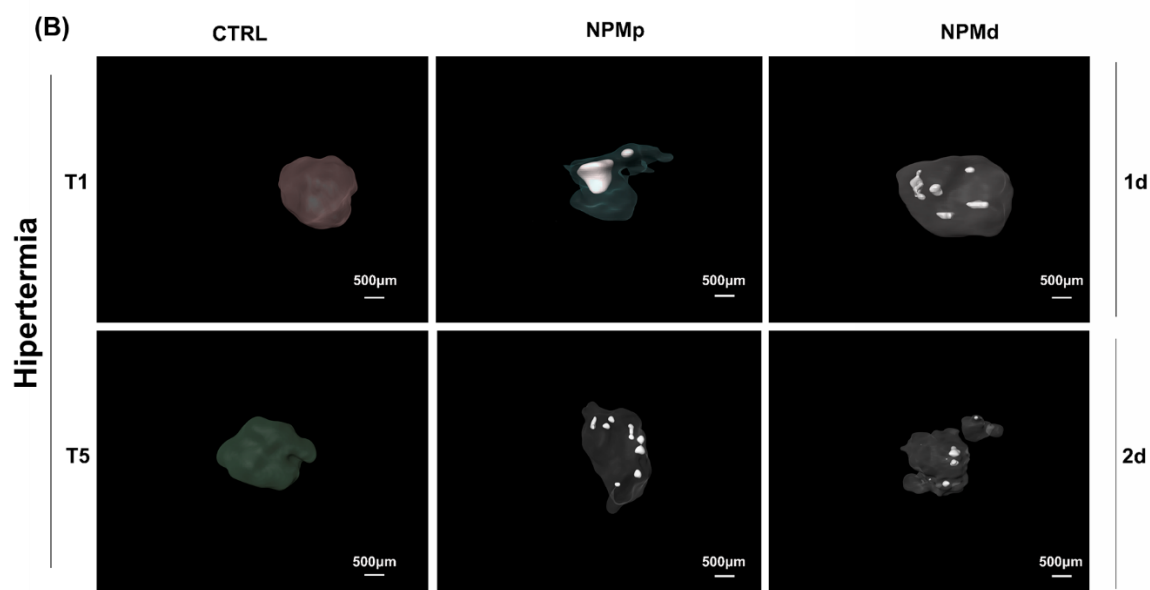
5.10 Análise microestrutural dos esferóides de osteossarcoma por microCT após o tratamento com hipertermia magnética

Devido às suas propriedades físico-químicas, como alta densidade eletrônica, cristalinidade e comportamento magnético, as nanopartículas de óxido de ferro atuam como agentes de contraste eficientes para análises por tomografia. Em contrapartida, a microscopia confocal não permite a visualização direta das nanopartículas (NPs) e sua distribuição dentro dos esferóides, a menos que estas estejam funcionalizadas com marcadores fluorescentes. Estudos anteriores do grupo aprimoraram o uso da técnica de emblocamento para análise de microscopia eletrônica de transmissão dos esferóides para aumentar o contraste das estruturas biológicas, tornando o esferoide visível na microCT. Dessa forma, os esferóides tratados com NPMp e NPMd foram submetidos à microtomografia computadorizada (microCT), permitindo o estudo morfológico dos esferóides com uma técnica não destrutiva e de alta resolução, possibilitando a obtenção de dados tridimensionais detalhados e comprovando o potencial diagnóstico de ambas as partículas.

Cortes centrais (em XY, XZ e YZ) foram processados matematicamente (Figura 17A) e foi realizada uma reconstrução em 3D dos esferóides (Figura 17B).

Figura 17: (A) Cortes centrais dos esferóides (XY, XZ, YZ) mostrando a distribuição das nanopartículas. (B) Reconstrução 3D evidenciando a distribuição das NPMp ao longo dos ciclos de campo magnético, enquanto as NPMd mantêm uma distribuição homogênea.





As análises mostraram que as partículas magnéticas puras mudam de distribuição com o aumento dos ciclos de campo aplicados, passando a ter uma distribuição mais dispersa, uniforme e com aglomerados menores em T5 comparado com T1 (Figura 17 B). Contudo, o mesmo comportamento não é observado nas NPMd que mostram o mesmo comportamento, com poucos aglomerados distribuídos ao longo do inteiro volume dos esferóides, mesmo com poucos ciclos de campo aplicados.

Os resultados obtidos por microCT evidenciam diferenças relevantes na distribuição das nanopartículas dentro dos esferóides após poucos ciclos de aplicação de campo magnético, revelando padrões distintos entre as partículas magnéticas puras (NPMp) e as dopadas (NPMd). A redistribuição das NPMp ao longo dos ciclos de aplicação do campo magnético sugere que o efeito cumulativo do campo influencia a dinâmica das partículas dentro do esferoide. A transição de uma distribuição heterogênea inicial, com aglomerados maiores, para uma distribuição mais homogênea em T5 indica que o campo magnético pode estar promovendo a movimentação das partículas, possivelmente por mecanismos de rearranjo induzido pelo movimento browniano sob influência do campo externo (MAMANI et al., 2021). Esse efeito pode ter implicações diretas na eficiência terapêutica da hipertermia magnética, uma vez que uma distribuição mais uniforme das nanopartículas dentro do tecido tumoral poderia resultar em um aquecimento mais homogêneo e,

conseqüentemente, em um efeito terapêutico mais eficaz. Por outro lado, as NPMd apresentaram um comportamento distinto, mantendo uma distribuição homogênea ao longo dos ciclos, sem a formação de grandes aglomerados. Esse resultado pode estar relacionado à modificação estrutural promovida pela dopagem, que pode influenciar a interação entre as nanopartículas e a matriz extracelular dos esferoides. A menor tendência à formação de aglomerados pode estar associada a propriedades de superfície modificadas, como alterações na carga superficial e na afinidade com biomoléculas, resultando em uma dispersão mais estável dentro do sistema tridimensional. Além disso, a presença de elementos dopantes promoveu a redução da magnetização das partículas (como observado nas curvas de magnetização na Figura 6), podendo ter limitado espacialmente sua resposta ao campo magnético externo e restringindo sua redistribuição ao longo dos ciclos aplicados (MAMANI et al., 2021).

A análise quantitativa da fração volumétrica ocupada pelas nanopartículas dentro dos esferoides fornecerá informações adicionais sobre a eficácia da internalização e a interação dessas partículas com o microambiente tumoral. Estudos prévios indicam que a distribuição das nanopartículas dentro de tecidos tridimensionais pode ser influenciada por diversos fatores, incluindo a permeabilidade do esferoide, o tamanho e a funcionalização das partículas e até mesmo a presença de gradientes metabólicos que afetam a difusão dos nanomateriais no interior da estrutura celular (KIEVIT et al., 2011; CHOU et al., 2022).

Outro ponto relevante a ser considerado é o impacto dessa distribuição na resposta biológica dos esferoides. Uma distribuição mais homogênea das nanopartículas pode favorecer uma interação mais eficiente com as células tumorais, aumentando a eficácia da terapia baseada em hipertermia magnética. Além disso, uma menor tendência à formação de aglomerados pode minimizar efeitos colaterais indesejados, como a indução de hipóxia localizada ou o comprometimento do transporte de nutrientes e oxigênio dentro dos esferoides (SCHMITZ C., 2021).

Dessa forma, os achados reforçam a importância da caracterização estrutural das nanopartículas e do microambiente tumoral para otimizar estratégias terapêuticas baseadas no uso de nanomateriais magnéticos. Estudos futuros devem focar na correlação entre a distribuição das partículas e a resposta celular ao tratamento, além de investigar possíveis mecanismos biofísicos que regem essa interação.

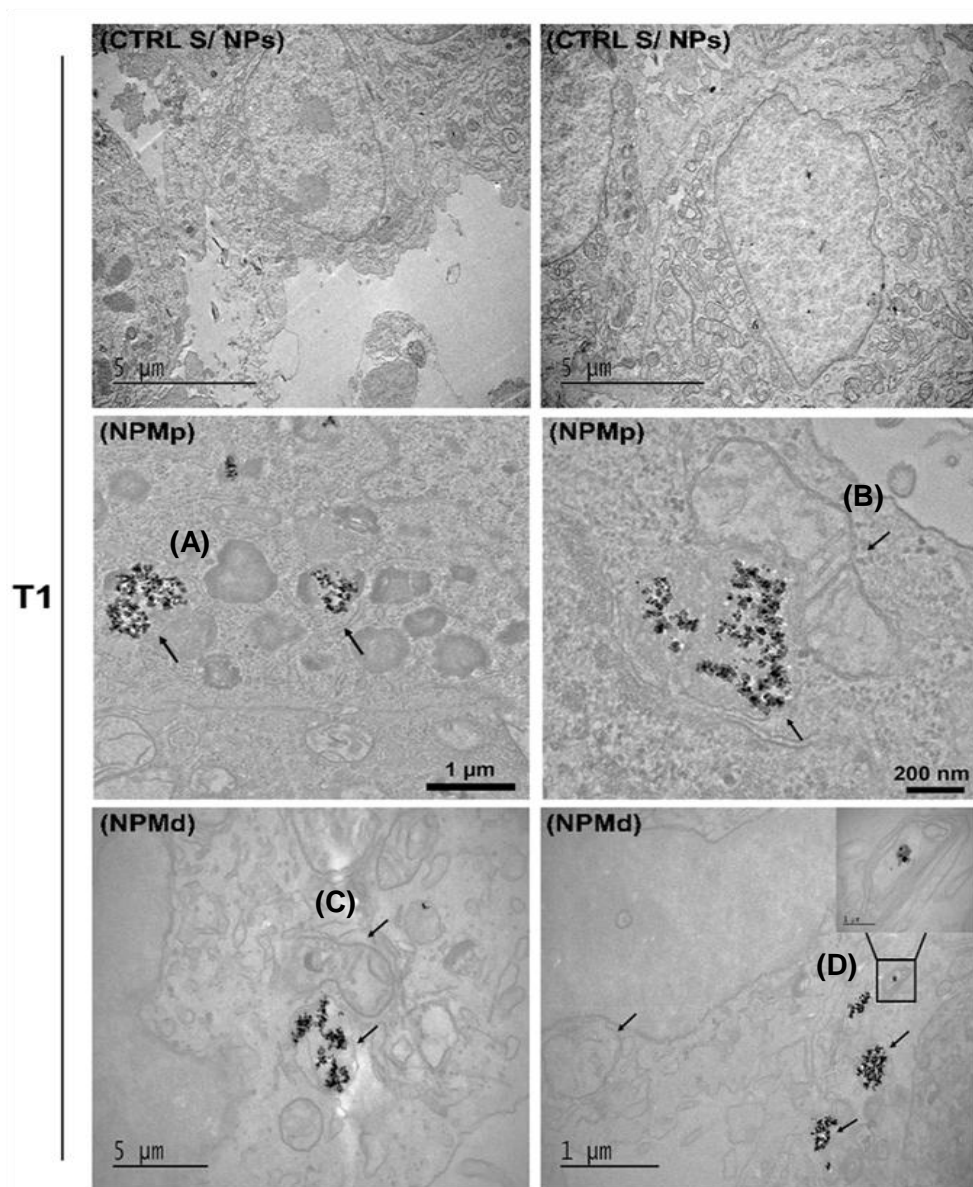
Os dados de microCT não apenas confirmam o potencial diagnóstico das nanopartículas estudadas, mas também sugerem que a modulação da distribuição das partículas pode ser um fator crítico para a otimização da terapia baseada em hipertermia magnética.

5.11 Internalização e distribuição de NPs em esferóides: análise morfológica ultraestrutural por (MET)

Para avaliar a morfologia e a ultraestrutura celular em alta resolução após a contato das nanopartículas magnéticas com os esferóides e sucessiva exposição ao campo magnético alternado, utilizamos a microscopia eletrônica de transmissão (MET). Esta técnica permite a visualização detalhada de alterações em organelas, membranas, interações celulares e processos como autofagia, apoptose e endocitose. As análises foram conduzidas nos dois extremos do experimento, nos ciclos T1 e T5 de ambas as amostras, NPMp e NPMd (Figura 18 e 19).

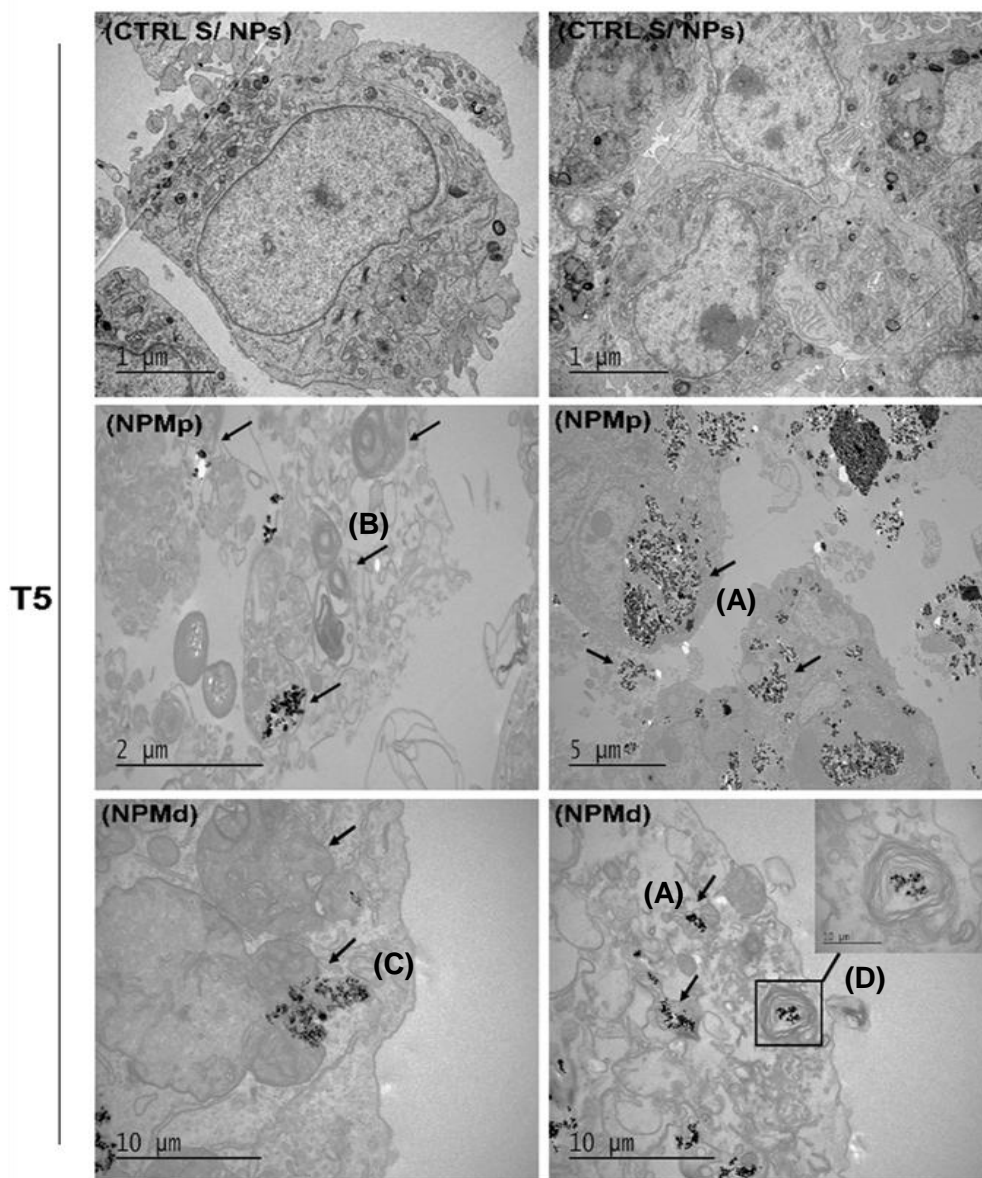
Em contraste, no grupo controle, as células permaneceram íntegras, sem sinais de danos estruturais, as micrografias gravadas após o ciclo inicial (T1), confirmam a internalização de ambas as nanopartículas no ambiente intracelular e as possíveis implicações de cada uma nos processos celulares. Nas células tratadas com NPMp, observamos desgaste celular, particularmente alterações mitocondriais (B), presença de vesículas endocíticas e modificações no citoplasma (A). Já naquelas expostas às NPMd, identificamos vesículas contendo nanopartículas, alterações mitocondriais (C) além de formação de autofagossomas (D), (Figura 18).

Figura 18: Análise por microscopia eletrônica de transmissão (MET) demonstrando as alterações morfológicas induzidas pela hipertermia magnética nos esferóides tumorais tratados com nanopartículas magnéticas. Imagem representativa do ciclo T1, evidenciando a internalização das nanopartículas no ambiente intracelular, com presença de vesículas endocíticas (A), alterações mitocondriais (B), (C) e formação de autofagossomas (D).



Após a exposição ao campo magnético cumulativo (sem intermediação das NPs, T5) no grupo controle, a ultraestrutura celular permanece íntegra, com danos estruturais mínimos observados nos esfeoides, podendo estes estar relacionados ao estresse da manipulação ou à exposição ao campo magnético ao longo do experimento. No entanto, nos esferoides tratados com NPMp e expostos ao efeito cumulativo do campo magnético (T5), identificamos a formação de corpos multivesiculares (B), alterações estruturais significativas e destruição do citoplasma (A), (Figura 19).

Figura 19: Análise por microscopia eletrônica de transmissão (MET) demonstrando as alterações morfológicas induzidas pela hipertermia magnética nos esferoides tumorais tratados com nanopartículas magnéticas. Imagem representativa do ciclo T5, mostrando intensificação dos danos celulares, com destruição do citoplasma (A), acúmulo de corpos multivesiculares (B), fragmentação nuclear (C) e autofagossoma (D), indicando morte celular avançada.



Por fim, no ciclo T5, ambas as amostras apresentaram sinais claros de morte celular, incluindo fragmentação nuclear (C) e danos irreversíveis, mesmo após um

período de 24 horas para recuperação. Comparando os tratamentos induzidos pelas diferentes nanopartículas magnéticas, as células expostas às NPMd apresentaram, no ciclo T5, um grau mais acentuado de degradação celular em relação às tratadas com NPMp. Esse fato, associado ao perfil de diminuição de tamanho tumoral dependente do ciclo de campo aplicado (Figura 16), sugere que as NPMp apresentam como mecanismo terapêutico predominante a liberação de calor, dada a redução pronunciada do esferoide após a primeira aplicação de campo. Em contrapartida, as NPMd parecem não apresentar a liberação de calor como mecanismo principal, pois a redução de tamanho do esferoide neste caso é mais linear. No entanto, os efeitos cumulativos de aplicações sucessivas de campo aos sistemas contendo NPMd são compensadas após cinco ciclos de aplicação de campo (T5), resultando em mesma dimensão final dos esferoides expostos a ambas nanopartículas. No caso do tratamento com a NPMd, o efeito terapêutico pode estar associado ao movimento Browniano das NPMd (C L VALENTE-RODRIGUES et al., 2023), facilitado pelo menor tamanho de aglomerado, que, ao longo dos ciclos de tratamento, potencializa a interação com as estruturas celulares, induzindo uma morte por ação mecânica.

Uma outra hipótese é que a liberação de calor induzido pelo campo magnético pode favorecer a liberação de íons provenientes da dopagem das NPMd, como Zn, Cr e Co. Esses íons podem influenciar o dano celular por meio de mecanismos adicionais, incluindo toxicidade iônica local e/ou induzindo a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS), contribuindo assim para a degradação celular observada (C L VALENTE-RODRIGUES et al., 2023).

Além disso, observamos um efeito tempo dependente das NPMp, que se mostram dispersas mais uniformemente pelo citoplasma, observado na (figura 18) e confirmando as análises de microCT. Já nos esferoides tratados com NPMd, verificamos a presença de autofagossomas, citoplasma completamente degradado e fragmentação nuclear. Isso sugere que no caso das NPMp os efeitos possam ser gerados principalmente pelo movimento browniano e amplificado pela hipertermia. Diferente das NPMp, as NPMd permaneceram concentradas em locais específicos da célula, indicando que os danos observados foram diretamente causados principalmente pela hipertermia, sem a mesma dispersão observada nas NPMp (figura 19).

Estudos prévios indicam que a hipertermia magnética pode desencadear diferentes tipos de morte celular nos tumores, incluindo apoptose, necrose e autofagia,

ocorrendo de forma simultânea ou sequencial, dependendo das condições experimentais e das características das nanopartículas utilizadas (STOCKE NA et al., 2018). Além disso, a resposta celular à hipertermia magnética parece estar diretamente relacionada ao grau de dispersão e ao tamanho dos agregados de nanopartículas. Nanopartículas superparamagnéticas de óxido de ferro (SPIO) bem dispersas demonstraram induzir apoptose, um efeito semelhante ao observado na hipertermia convencional, que corrobora com os nossos resultados. Por outro lado, agregados de tamanho nanométrico promovem autofagia dependente da temperatura, possivelmente mediada pelo aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS). Já os agregados de tamanho micrométrico causam danos rápidos à membrana celular, levando à morte celular aguda *in vitro*, e, quando aplicados *in vivo*, mostraram-se altamente eficazes na inibição do crescimento tumoral (SADHUKHA T et al., 2014). Esses achados reforçam a importância do controle da dispersão e do tamanho das nanopartículas na modulação dos efeitos biológicos da hipertermia magnética. Enquanto partículas bem dispersas tendem a promover uma resposta apoptótica mais controlada, agregados maiores ou de menor estabilidade podem desencadear mecanismos mais agressivos, como necrose e autofagia excessiva, impactando diretamente a viabilidade celular e a progressão tumoral. Dessa forma, compreender a relação entre a estrutura das nanopartículas, suas interações com o microambiente tumoral e os mecanismos celulares ativados é essencial para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas mais eficientes e seletivas no combate ao câncer.

Estudos na literatura demonstraram que a hipertermia magnética não apenas impacta a viabilidade celular, mas também promove alterações estruturais significativas no microambiente tumoral, corroborando com nossos achados. KOLOSNAJ-TABI et al. observam uma redistribuição estrutural das fibras de colágeno e dos nanocubos, indicando um afrouxamento da matriz extracelular em câncer de fígado, após o primeiro ciclo de hipertermia. Essa modificação é um fator crucial, pois pode facilitar a penetração das nanopartículas no tecido tumoral, aumentando a eficiência da terapia (KOLOSNAJ-TABI et al., 2014). Após o tratamento térmico, verificou-se também que tanto as fibras de colágeno quanto as nanopartículas, que anteriormente colocalizavam de maneira compacta em tumores não aquecidos, passaram a se difundir e afrouxar. Além disso, observou-se que os nanocubos penetraram mais profundamente no núcleo do tumor rico em células,

enquanto as fibras de colágeno na matriz extracelular se tornaram mais soltas. Essa reestruturação pode estar associada a alterações na conformação das proteínas da matriz extracelular induzidas pelo calor, resultando em maior permeabilidade do tecido tumoral. Adicionalmente, a hipertermia magnética levou à formação de extensas áreas necróticas, com células apoptóticas e necróticas localizadas na vizinhança das nanopartículas, sugerindo que o aquecimento induzido pelas NPs pode atuar diretamente na destruição das células tumorais e na promoção da morte celular programada (KOLOSNAJ-TABI et al., 2014). Dessa forma, esses achados indicam que a combinação da hipertermia magnética com modificações na matriz extracelular pode potencializar a eficácia dessa abordagem terapêutica. O afrouxamento da matriz tumoral facilita a penetração das NPs, enquanto o aumento localizado da temperatura intensifica o estresse celular, promovendo a morte seletiva das células cancerosas.

Portanto, nossos achados destacam o potencial da hipertermia magnética não apenas como uma estratégia eficaz na indução da morte celular, mas também como um modulador do microambiente tumoral, favorecendo a penetração de fármacos e ampliando as possibilidades terapêuticas. No entanto, para a plena aplicação clínica dessa abordagem, é essencial aprofundar a compreensão sobre os efeitos biológicos das nanopartículas, levando em consideração suas propriedades físico-químicas, grau de agregação e interações com o tecido tumoral. Estudos futuros devem focar na otimização dos parâmetros de tratamento, incluindo dosagem, tempo de exposição e frequência do campo magnético, a fim de maximizar os efeitos terapêuticos e minimizar possíveis danos colaterais. Além disso, investigar a influência dessas alterações na progressão tumoral e na resposta imune pode fornecer insights valiosos para o desenvolvimento de terapias mais seletivas e eficientes. Assim, a hipertermia magnética se apresenta como uma ferramenta promissora na oncologia, com potencial para revolucionar as abordagens terapêuticas no combate ao câncer.

6 CONCLUSÃO

Nesse estudo investigamos a influência das propriedades físico-químicas das nanopartículas magnéticas (NPs) sobre sua aplicação na hipertermia magnética e seus efeitos na viabilidade celular. As principais conclusões deste estudo destacam:

- Caracterização estrutural e estabilidade térmica: foi confirmada a fase cristalinada das NPs. As NPMp apresentaram morfologia esférica, enquanto as NPMd exibiram estrutura cúbica. As NPMd demonstraram autorregulação térmica, mantendo-se estáveis a 42°C.
- Interação com o meio biológico: A presença de proteínas na superfície das NPs após o contato com meio biológico foi confirmada por FTIR, evidenciada pela presença de grupos amida, e por análise de potencial Z pela redução do potencial de superfície e aumento do diâmetro hidrodinâmico. Análises proteômicas revelaram diferenças na composição da coroa proteica entre os nanossistemas.
- Internalização celular: As NPMd foram preferencialmente internalizadas por endocitose mediada por clatrina e raft lipídico, enquanto as NPMp não exibiram uma via predominante de internalização.
- Efeito na viabilidade celular: As NPs apresentaram baixa citotoxicidade em condições normais. No entanto, após o contato com as NPs e subsequente exposição ao campo magnético alternado, foi observada uma redução significativa do volume tumoral em esferoides 3D, com uma resposta dependente do número de ciclos aplicados. As NPMp induziram uma redução mais rápida com um menor número de aplicações, enquanto as NPMd demonstraram um efeito cumulativo ao longo dos ciclos, compensando esta diferença no T5.
- Distribuição e análise tridimensional: A microtomografia computadorizada confirmou a internalização e distribuição das NPs nos esferoides tumorais, destacando seu potencial multifuncional para terapia e diagnóstico por imagem.
- Impacto celular e mecanismos de dano: A exposição aos campos magnéticos alternados induziu alterações celulares irreversíveis, incluindo desgaste celular, disfunção mitocondrial, formação de corpos multivesiculares e destruição do citoplasma, com a composição das NPs sendo um fator determinante na resposta terapêutica.

7 PERSPECTIVAS

Este estudo abre caminhos para aprimorar a compreensão das interações entre as nanopartículas magnéticas (NPs) e as células tumorais, além de otimizar sua

aplicação terapêutica no tratamento do câncer. Entre as principais direções para o avanço da pesquisa, destacam-se:

- Aprofundamento na análise da distribuição das NPs em esferoides tumorais, com quantificação do volume ocupado pelas partículas, para compreender melhor sua interação com o ambiente tumoral.
- Investigação do impacto da possível liberação iônica e/ou de estresse oxidativo na geração de dano celular.
- Realização de um estudo correlativo do envolvimento das proteínas adsorvidas na superfície das NPs na internalização e no destino intracelular das partículas.
- Realização de estudos *in vivo* e organ-on-chip para avaliar o efeito com modelos mais complexos que reproduzem o ambiente tumoral.

Esses avanços visam consolidar a aplicação terapêutica das NPs, otimizando sua utilização em tratamentos multimodais e na liberação controlada de medicamentos, fortalecendo sua viabilidade clínica.

REFERÊNCIAS

- ABU-BAKR, A. F.; ABU-BAKR, A. F.; ZUBAREV, a. Effect of interparticle interaction on magnetic hyperthermia: homogeneous spatial distribution of the particles. p. 1–11, 2019.
- ALMEIDA, Mauro Sousa de et al. Understanding nanoparticle endocytosis to improve targeting strategies in nanomedicine. **Chemical Society Reviews**, [S.L.], v. 50, n. 9, p. 5397-5434, 2021. Royal Society of Chemistry (RSC).
- ARAI K., MURATA S., WANG T., YOSHIMURA W, ODA-TOKUHISA M, MATSUNAGA T, KISAILUS D, ARAKAKI A. Adsorption of Biom mineralization Protein Mms6 on Magnetite (Fe₃O₄) Nanoparticles. **Int J Mol Sci**, 2022.
- BANUSHI B, Joseph Sr, LUM B, LEE Jj, Simpson F. Endocytosis in cancer and cancer therapy. **Nat Rev Cancer**, 2023.
- BASCHIERI F, porshneva k, montagnac g. Frustrated clathrin-mediated endocytosis – causes and possible functions. **Journal of Cell Science**, 133(11), jcs240861, 2020.
- BASHIRI, ghazal & padilla, marshall & swingle, kelsey & shepherd, sarah & mitchell, michael & wang, karin. Nanoparticle protein corona: from structure and function to therapeutic targeting. **Lab on a Chip**, 2023.
- BLANCO-ANDUJAR, c.; ortega, d.; southern, p.; nesbitt, s. a.; thanh, n. t. k.; pankhurst, q. a. Real-time tracking of delayed-onset cellular apoptosis induced by intracellular magnetic hyperthermia. **Nanomedicine**, v. 11, p. 121–136, 2016.
- BRAY F, ferlay j, soerjomataram i, siegel rl, torre la, jemal a. Global cancer statistics estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **Globocan**, 2018.
- BRAY F, mery l, piñeros m, znaor a, zanetti r, ferlay j. (eds). Cancer incidence in five continents, Vol. XI Lyon, IARC. **International Agency for Research on Cancer**, 2017.
- BROLLO, M. E. F. et al. Magnetic hyperthermia in brick-like Ag@Fe₃O₄ core-shell nanoparticles. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 397, p. 20–27, 2016.
- BRUSTUGUN OT, moller b, helland å. Years of life lost as a measure of cancer burden on a national level. **Br J Cancer**, 2014.

CASTRO, gabriela & souza, wanderson & lima, thais & bonfim, danielle & werckmann, jacques & archanjo, braulio & granjeiro, josé & ribeiro, ana & gemini piperni, sara. The Effects of Titanium Dioxide Nanoparticles on Osteoblasts Mineralization: A Comparison between 2D and 3D Cell Culture Models. **Nanomaterials**. 13. 425, 2023.

CHUNG EUN JI; leon lorraine; rinaldi, carlos. Nanoparticles for Biomedical Applications: Fundamental Concepts, Biological Interactions and Clinical Applications. **Elsevier Inc**, 2019.

CICUÉNDEZ M, et al. Metabolic response of osteosarcoma cells to nanogram-mediated hyperthermia, 2018.

DIAS C.S.B, Estudo de vórtice magnético em nanopartículas para aplicações em hipertermia magnética. **Campinas**, 2014.

DIAS CSB, et al. Shape Tailored Magnetic Nanorings for Intracellular Hyperthermia Cancer Therapy. **Campinas**, 2017.

ESTATÍSTICAS de câncer Instituto Nacional de Câncer - Causas e Prevenção. **INCA**, 2021.

ESHRATI YEGANEH, F., Eshrati Yeganeh, A., Fatemizadeh, M. et al. Citotoxicidade in vitro e comportamento de liberação de fármacos anticâncer de nanopartículas de magnetita revestidas de metionina como carreadores. *Med Oncol* **39** , 252 (2022).

FANTECHI, e. c. innocenti, m. zanardelli, m. fittipaldi, e. falvo, et al.: A Smart Platform for Hyperthermia Application in Cancer Treatment: Cobalt-Doped Ferrite Nanoparticles Mineralized in Human Ferritin Cages. **ACS Nano** 8, 4705 2014.

FRANCIA V, montizaan d, salvati a, beilstein j. Interactions at the cell membrane and pathways of internalization of nano-sized materials for nanomedicine. **Journal of Nanotechnology**, 11, 338–353, 2020.

GUPTA, ruby; sharma, deepika, Evolution of Magnetic Hyperthermia for Glioblastoma Multiforme Therapy. **ACS Chemical Neuroscience**, 2019.

HANAHAN D, weinberg ra. Cancer Marks: The Next Generation. Atlas de Mortalidade por Câncer Instituto Nacional de Câncer, **INCA**, 2011.

HINZE C, boucrot e. Endocytosis in proliferating, quiescent and terminally differentiated cells. **Journal of Cell Science**, 131(23), 2018.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA (INCA). Ministério da Saúde (MS). ABC do câncer: abordagens básicas para o controle do câncer. 6. ed. 2020.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA Estimativa 2020: incidência de câncer no Brasil. **INCA**, 2019.

JU Y, guo h, edman m, hamm-alvarez s f. Application of advances in endocytosis and membrane trafficking to drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 157, p. 118-141, 2020.

KAKSONEN M, roux a. Mechanisms of clathrin-mediated endocytosis. **Nature Reviews Molecular Cell Biology** 19, p. 313-326, 2018.

KEJIE H, yushuang w, zhihong z, haibo c, bing y, hong-bo p, kai y. Membrane-curvature-mediated co-endocytosis of bystander and functional nanoparticles. **Nanoscale**, 2021.

KIEN P T, phu h d, linh n v v, quyen t n, hoa n.t. Recent Trends in Hydroxyapatite (HA) Synthesis and the Synthesis Report of Nanostructure HA by Hydrothermal Reaction. **Advances in experimental medicine and biology**, 1077:343-354, 2018.

KOLOSNAJ-TABI, J., Di Corato, R., Lartigue, L., Marangon, I., Guardia, P., Silva, A. K. A., ... Gazeau, F. (2014). *Heat-Generating Iron Oxide Nanocubes: Subtle "Deconstructors" of the Tumoral Microenvironment*. **ACS Nano**.

LETTI C.J., costa k.a., gross m.a., paterno l.g., pereira-da-silva m.a., morais p.c., and soler, m.a.g.: Synthesis, morphology and electrochemical applications of iron oxide-based nanocomposites. **Adv. Nano Res.** 5, 215 2017.

LETTI, camila jéssica. Estudo de nanocompósitos formados por partículas de óxidos de ferro e polímeros por meio da espectroscopia Raman, Dissertação (Mestrado em Física) - **Universidade de Brasília, Brasília**, 2013.

LI, J.; arnal, b.; wei, c.-w.; shang, j.; nguyen, t.-m.; o'donnell, m.; gao, x. Magneto-Optical Nanoparticles for Cyclic Magnetomotive Photoacoustic Imaging. **ACS Nano**, v. 9, n. 2, p. 1964–1976, 2015.

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.

OLIVEIRA LGS, garg v, santana gp. As nanopartículas de óxido de ferro magnéticos na terapia do câncer. **Manaus (AM)**, 2015.

PEREZ-POTTI, André et al. Nanoparticle-based immunotherapeutics: from the properties of nanocores to the differential effects of administration routes. **Advanced Drug Delivery Reviews**, [S.L.], v. 197, p. 114829, jun. 2023. Elsevier BV.

PILAVAKI, P. et al. Osteosarcoma: Current Concepts and Evolutions in Management Principles. v. 12, n. 8, p. 2785–2785, 9., 2023.

PRASAD NK, rathinasamy k, panda d, bahadur d Mechanism of cell death induced by magnetic hyperthermia with nanoparticles of $\gamma\text{-Mn}_x\text{Fe}_{2-x}\text{O}_3$ synthesized by a single step process; 2007.

RENNICK JJ, johnston apr, parton rg. Key principles and methods for studying the endocytosis of biological and nanoparticle therapeutics. **Nat Nanotechnol**, 2021.

RIVERA, L. M R; paterno, l. g; chaves, n. l; gregurec, d.; báó, s. n; moya, s. e; jain,m.; azevedo, r. b; morais, p. c; soler, m. a g. Biocompatible superparamagnetic carriers of chondroitin sulfate. **Materials Research Express**, 2019.

RIVERA, luis miguel ramirez; machado, j. g.; mathpal, mohan chandra; chaves, natalia l; gregurec, danijela; báó, sônia n; paterno, l. g.; moya, sergio e; azevedo,ricardo b; soler, maria a.g. Functional glucosamine-iron oxide nanocarrie. **Journal of Materials Research**, 2020.

SHI J, kantoff p w, wooster r, farokhzad o c. Cancer nanomedicine: progress, challenges and opportunities. **Nature Reviews Cancer**, 17(1), 20–37, 2017.

SADHUKHA T, Wiedmann TS, Panyam J. Enhancing therapeutic efficacy through designed aggregation of nanoparticles. **Biomaterials**. 2014 Sep;35(27):7860-9. doi: 10.1016/j.biomaterials.2014.05.085. Epub 2014 Jun 16.

SOUZA KC, mohallem nds, sousa emb. Magnetic nanocomposites: potential for applications in Biomedicine. **São Paulo**, 2011.

STOCKE NA, Sethi P, Jyoti A, Chan R, Arnold SM, Hilt JZ, Upreti M. Toxicity evaluation of magnetic hyperthermia induced by remote actuation of magnetic nanoparticles in 3D micrometastatic tumor tissue analogs for triple negative breast cancer. **Biomaterials**. 2017 Mar;120:115-125.

SUNG H, ferlay j, siegel rl, laversanne m, soerjomataram i, jemal a, et al. Global cancer statistics. **Globocan**, 2020.

TARASENKO D, meinecke m. Protein-dependent membrane remodeling in mitochondrial morphology and clathrin-mediated endocytosis. **European Biophysics Journal**, 2021.

VINEIS P, wild cp. Global cancer patterns: causes and prevention. **Lancet** 2014.

VIVAS CV, duarte el, barreto yb, deoliveira clp, toma sh, santos jj, araki k, alencar am, bloise ac. Interactions Between Silver Nanoparticles and Culture Medium Biomolecules with Dose and Time Dependencies, 2024.

W. ZHANG et al., "Novel nanoparticles with Cr³⁺ substituted ferrite for self-regulating temperature hyperthermia," **Nanoscale**, vol. 9, no. 37, pp. 13929–13937, 2017.

WU M, guo h, liu l, liu y, xie l. Size-dependent cellular uptake and localization profiles of silver nanoparticles. **Int J Nanomedicine**, 2019.

ZHANG S, sun k, zheng r, zeng h, wang s, chen r, et al. Cancer incidence and mortality in China, 2015. **J Natl Cancer Center**, 2020.

APÊNDICE 1 – LISTAGEM DE PROTEÍNAS ANALISADAS EM ESPECTROMETRIA DE MASSAS.

3-hydroxyanthranilate 3,4-dioxygenase	Asporin	Coagulation factor VII
Actin, cytoplasmic 1	ATP synthase subunit alpha,	Coagulation factor X
Actin, cytoplasmic 2	mitochondrial	Coagulation factor XII
Adenine phosphoribosyltransferase	Beta-2-microglobulin	Coagulation factor XIII A chain Fragment)
Adenosylhomocysteinase	Brain ribonuclease	Cofilin-1
Adiponectin	Cadherin-5	Collagen alpha-1(II) chain
Albumin	Calmodulin	Collectin-43
Alpha-1-acid glycoprotein	Carboxypeptidase B2	Complement C3
Alpha-1-antiproteinase	Carboxypeptidase N catalytic chain	Complement component C6
Alpha-1B-glycoprotein	Cartilage oligomeric matrix protein	Complement component C7
Alpha-2-HS-glycoprotein	CCHC-type zinc finger nucleic acid	Complement factor B
Alpha-2-macroglobulin	binding protein	Complement factor D
Alpha-enolase	CCN family member 2	Complement factor H
Alpha-fetoprotein	Chondroadherin	Copper transport protein ATOX1
Angiogenin-1	Clusterin	Dermatopontin
Apolipoprotein A-I	Coactosin-like protein	Dihydrodiol dehydrogenase 3
Apolipoprotein A-II	Coagulation factor IX	Factor XIIa inhibitor
Apolipoprotein E	Coagulation factor V	

Fatty acid-binding protein, liver	Hepatocyte growth factor-like protein	L-lactate dehydrogenase A chain
Fetuin-B	Histone H1.2	L-lactate dehydrogenase B chain
Fibrinogen alpha chain	Histone H4	Lumican
Fibrinogen gamma-B chain	Insulin-like growth factor I	Matrix Gla protein
Fibroleukin	Insulin-like growth factor II	Metalloproteinase inhibitor 1
Fibronectin	Insulin-like growth factor-binding protein 1	Metalloproteinase inhibitor 2
Fructose-1,6-bisphosphatase 1	Insulin-like growth factor-binding protein 2	Metallothionein-2
Gamma-aminobutyric acid receptor-associated protein-like 2	Insulin-like growth factor-binding protein 3	Metallothionein-I, hippocampal
Gelsolin	Insulin-like growth factor-binding protein 5	Monocyte differentiation antigen CD14
Glutathione S-transferase A1	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H1	Myosin-10
Glutathione S-transferase A2	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H3	N(G),N(G)-dimethylarginine dimethylaminohydrolase 1
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	Keratin, type I cytoskeletal 10	Nucleobindin-1
GTP cyclohydrolase 1 feedback regulatory protein	Kininogen-1	Parkinson disease protein 7 homolog
Heat shock 70 kDa protein 1B	Kininogen-2	Peptidoglycan recognition protein 1
Heat shock cognate 71 kDa protein	LIM and SH3 domain protein 1	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A
Heat shock protein HSP 90-alpha		Peroxiredoxin-1
Hemoglobin fetal subunit beta		Peroxiredoxin-2
		Phosphatidylethanolamine-binding protein 1

Hemoglobin subunit beta	Rho GDP-dissociation inhibitor 2	Phosphoglycerate kinase 1
Pigment epithelium-derived factor	Ribonuclease 4	Transgelin-2
Plasminogen	Secreted phosphoprotein 24	Translation machinery-associated protei
Pleiotrophin	Serotransferrin	Triosephosphate isomerase
Programmed cell death protein 5	Serpin A3-7	Tropomyosin alpha-3 chain
Protein disulfide-isomerase	Small ubiquitin-related modifier 2	Tubulin alpha-4A chain
Protein HP-20 homolog	Sorbitol dehydrogenase	Tubulin-specific chaperone A
Prothrombin	Spleen trypsin inhibitor I	Vitamin D-binding protein
Radixin	Stathmin	Vitamin K-dependent protein C (Fragment)
Ras suppressor protein 1	Tetranectin	Vitamin K-dependent protein S
Ras-related protein Rap-1b	Thrombospondin-1	Vitamin K-dependent protein Z
Regakine-1	Thrombospondin-4	Vitrin
Resistin	Thyroxine-binding globulin	
Retinol-binding protein 4		