

**INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE SANTA
CATARINA – CÂMPUS FLORIANÓPOLIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIAS RADIOLÓGICAS
MESTRADO PROFISSIONAL EM PROTEÇÃO RADIOLÓGICA**

EDUARDO SANT'ANA RICARDO

**ESTUDO DA RADIOSSENSIBILIZAÇÃO DE CÉLULAS TUMORAIS
DE CÂNCER COLORRETAL (HRT-18) E CARCINOMA
HEPATOCELULAR (HEPG2) COM NANOPARTÍCULAS
MAGNÉTICAS ESTABILIZADAS COM COPOILÉSTER.**

FLORIANÓPOLIS, 2024.

**INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE SANTA
CATARINA – CÂMPUS FLORIANÓPOLIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIAS RADIOLÓGICAS
MESTRADO PROFISSIONAL EM PROTEÇÃO RADIOLÓGICA**

EDUARDO SANT'ANA RICARDO

**ESTUDO DA RADIOSSENSIBILIZAÇÃO DE CÉLULAS TUMORAIS
DE CÂNCER COLORRETAL (HRT-18) E CARCINOMA
HEPATOCELULAR (HEPG2) COM NANOPARTÍCULAS
MAGNÉTICAS ESTABILIZADAS COM COPOILÉSTER.**

Dissertação de mestrado submetida ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Santa Catarina, Programa de Pós-Graduação em Tecnologias Radiológicas, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Proteção Radiológica.

Linha de Pesquisa: Inovação e Desenvolvimento de Produtos em Tecnologias Radiológicas

Orientador: Dr. Alexandre D'Agostini Zottis
Coorientadora: Dr^a. Karina Bettega Felipe

FLORIANÓPOLIS, 2024.

Ricardo, Eduardo Sant'Ana

Estudo da radiosensibilização de células tumorais de câncer colorretal (hrt-18) e carcinoma hepatocelular (hepg2) com nanopartículas magnéticas estabilizadas com copolíéster / Eduardo Sant'Ana Ricardo; orientador, Dr. Alexandre D'Agostini Zottis; coorientação, Dra. Karina Bettega Felipe - Florianópolis, SC, 2024. 88.: il. Color.

Dissertação de Mestrado - Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Santa Catarina, Campus Florianópolis. Programa de Pós-Graduação em Tecnologias Radiológicas. Mestrado Profissional em Proteção Radiológica

1. Nanopartículas superparamagnéticas de óxido de ferro. 2. Radiosensibilização. 3. Câncer. I. Zottis, Alexandre D'Agostini. II. Instituto Federal de Santa Catarina. Departamento Acadêmico de Saúde e Serviços. III. Título.

ESTUDO DA RADIOSENSIBILIZAÇÃO DE CÉLULAS TUMORAIS DE CÂNCER COLORRETAL (HRT-18) E CARCINOMA HEPATOCELULAR (HEPG2) COM NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS ESTABILIZADAS COM COPOILÉSTER.

EDUARDO SANT'ANA RICARDO

Esta dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de Mestre em Proteção Radiológica e aprovada na sua forma final pela banca examinadora do Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* – Mestrado Profissional em Proteção Radiológica, do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Santa Catarina.

Florianópolis, 19 de abril de 2024

Banca Examinadora:



Documento assinado digitalmente
ALEXANDRE D AGOSTINI ZOTTIS
Data: 31/07/2024 19:10:37-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Alexandre D'Agostini Zottis, Dr.

Orientador / Presidente

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia – IFSC

Karina Bettega Felipe, Dr^a.

Coorientadora

Universidade Federal do Paraná -

UFPR



Documento assinado digitalmente
MARCOS ARAQUEM SCOPEL
Data: 30/07/2024 08:54:49-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Marcos Araquem Scopel, Dr.
Instituto Federal de Educação,
Ciência e Tecnologia – IFSC



Documento assinado digitalmente
ROZANGELA CURI PEDROSA
Data: 19/07/2024 19:43:18-0300
CPF: ***.447.776-**
Verifique as assinaturas em <https://v.ufsc.br>

Rozangela Curi Pedrosa, Dr^a.
Universidade Federal de
Santa Catarina - UFSC

Assinado por: **TERESA CRISTINA DOS SANTOS LEAL**
Num. de Identificação:
18042097 Data: 2024.07.31
23:00:24+0100

Teresa Cristina dos Santos Leal, Dr^a.
Instituto Federal de Educação, Ciência
e Tecnologia – IFSC



Documento assinado digitalmente
JEOVANDRO MARIA BELTRAME
Data: 29/07/2024 18:49:36-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Jeovandro Maria Beltrame, Dr.
Universidade Federal de
Santa Catarina - UFSC

*Com todo o meu amor, dedico esta dissertação
àqueles que enchem minha vida de sentido:
Lucas, Arthur e Alair.*

AGRADECIMENTOS

A frase “apoiar-se nos ombros de gigantes” é uma metáfora que significa “usar a compreensão adquirida pelos grandes pensadores que nos precederam para fazer progresso”. Em minha jornada rumo a esta dissertação, tive o privilégio de me “apoiar em muitos ombros”, ombros estes que tornaram possível a jornada até aqui.

Expresso minha profunda gratidão ao Professor Dr. Alexandre D’Agostini Zottis, orientador, verdadeiro gigante cujos ensinamentos e dedicação foram fundamentais. À Professora Dra. Karina Bettega Felipe, minha coorientadora, por seus valiosos insights e expertise que tanto enriqueceram este trabalho. Ao pesquisador Dr. Jeovandro Maria Beltrame, meus sinceros agradecimentos por generosamente ceder as nanopartículas, componente essencial desta pesquisa.

Sou grato também às instituições que propiciaram este estudo: Ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Santa Catarina, por minha formação acadêmica sólida; ao CEPON, parceiro na criação do phantom; à Universidade Federal do Paraná, em especial ao Departamento de Análises Clínicas e ao Laboratório de Fisiologia e Sinalização Celular - FiSiCel, pelos ensaios biológicos cruciais para a presente pesquisa.

Minha gratidão à FAPESC, pela concessão da bolsa de pesquisa, viabilizando este projeto. À Liga Paranaense de Combate ao Câncer e ao Hospital Erasto Gaertner, pelas parcerias fundamentais e ensaios de irradiação realizados.

Por fim, às minhas amigas MSc. Dayana Ribeiro Santana e MSc. Daniela Cristina Panciera, companheiras nesta jornada, obrigado pela amizade, apoio e momentos compartilhados. Vocês duas são mulheres incríveis e me sinto honrado em conhece-las.

Aos que não foram citados, mas ajudaram de alguma forma, muito obrigado. A ajuda de vocês também foi essencial para minha caminhada. Serão sempre lembrados."

*“Eu, um universo de átomos,
um átomo no universo.”*
Richard Feynman

RESUMO

As nanopartículas de óxido de ferro têm grande potencial para aplicações biomédicas, especialmente na oncologia, onde têm sido exploradas em aplicações como agentes de contraste para imagem por ressonância magnética, hipertermia magnética para destruição seletiva de células cancerosas e transporte vetorizado de fármacos quimioterápicos, potencializando o desenvolvimento de novas técnicas de diagnóstico e tratamento do câncer. O presente estudo investigou a interação entre nanopartículas de óxido de ferro revestidas com copoliéster caprolactona modificada por cisteína e as linhagens celulares HRT-18 (câncer colorretal) e HepG2 (carcinoma hepatocelular). Contrariando as expectativas, os resultados não revelaram o padrão esperado de radiosensibilização, pois não houve um impacto significativo na viabilidade celular, mesmo após exposição a diferentes concentrações das nanopartículas, quantificados por ensaios de NRU - Neutral Red Uptake. Uma análise de Dispersão Dinâmica de Luz (DLS) sugeriu a presença de aglomerações nas nanopartículas, apresentando resultados entre 832 a 1464 nanômetros, o que pode ter limitado a capacidade de penetração nas células-alvo. Os resultados dos Testes de Potencial Zeta variaram de -19,4 a 21,24 mV, indicando uma tendência à dispersão das nanopartículas, contrariando a formação de aglomerados. Este estudo representa um ponto de partida para uma nova era de pesquisa no campo da oncologia. As descobertas deste estudo não só fornecem respostas, mas também levantam uma miríade de novas questões, incentivando futuros cientistas a explorar o vasto e promissor mundo da nanomedicina e seu papel na luta contra o câncer.

Palavras-chave: Nanopartículas superparamagnéticas de óxido de ferro. Radiossensibilização. Câncer.

RESUMEN

Las nanopartículas de óxido de hierro tienen un gran potencial para aplicaciones biomédicas, especialmente en oncología, donde se han explorado en aplicaciones como agentes de contraste para la imagen por resonancia magnética, hipertermia magnética para la destrucción selectiva de células cancerosas y transporte vectorizado de fármacos quimioterapéuticos, potenciando el desarrollo de nuevas técnicas de diagnóstico y tratamiento del cáncer. El presente estudio investigó la interacción entre nanopartículas de óxido de hierro recubiertas con copoliéster caprolactona modificada por cisteína y las líneas celulares HRT-18 (cáncer colorrectal) y HepG2 (carcinoma hepatocelular). Contrariamente a las expectativas, los resultados no revelaron el patrón esperado de radiosensibilización, ya que no hubo un impacto significativo en la viabilidad celular, incluso después de la exposición a diferentes concentraciones de nanopartículas, cuantificadas mediante ensayos de Captación de Rojo Neutro (NRU). Un análisis de Dispersión Dinámica de Luz (DLS) sugirió la presencia de aglomeraciones de nanopartículas, con resultados que oscilaron entre 832 y 1464 nanómetros, lo que puede haber limitado la capacidad de penetración en las células diana. Los resultados de las Pruebas de Potencial Zeta variaron de -19,4 a 21,24 mV, indicando una tendencia hacia la dispersión de las nanopartículas, contrariamente a la formación de aglomerados. Este estudio representa un punto de partida para una nueva era de investigación en el campo de la oncología. Los hallazgos de este estudio no solo brindan respuestas, sino que también plantean una miríada de nuevas preguntas, alentando a los futuros científicos a explorar el vasto y prometedor mundo de la nanomedicina y su papel en la lucha contra el cáncer. Palabras clave: Nanopartículas superparamagnéticas de óxido de hierro. Radiosensibilización. Cáncer.

Palabras clave: Nanopartículas superparamagnéticas de óxido de hierro. Radiosensibilización. Cáncer.

ABSTRACT

Iron oxide nanoparticles have great potential for biomedical applications, especially in oncology, where they have been explored in applications such as contrast agents for magnetic resonance imaging, magnetic hyperthermia for selective destruction of cancer cells, and vectorized transport of chemotherapeutic drugs, enhancing the development of new cancer diagnostic and treatment techniques. The present study investigated the interaction between iron oxide nanoparticles coated with cysteine-modified caprolactone copolyester and the HRT-18 (colorectal cancer) and HepG2 (hepatocellular carcinoma) cell lines. Contrary to expectations, the results did not reveal the expected pattern of radiosensitization, as there was no significant impact on cell viability, even after exposure to different concentrations of nanoparticles, quantified by Neutral Red Uptake (NRU) assays. Dynamic Light Scattering (DLS) analysis suggested the presence of nanoparticle agglomerations, with results ranging from 832 to 1464 nanometers, which may have limited the penetration capacity into target cells. The results of Zeta Potential Tests varied from -19.4 to 21.24 mV, indicating a trend toward nanoparticle dispersion, contrary to agglomerate formation. This study represents a starting point for a new era of research in the field of oncology. The findings of this study not only provide answers but also raise a myriad of new questions, encouraging future scientists to explore the vast and promising world of nanomedicine and its role in the fight against cancer.

Keywords: Superparamagnetic iron oxide nanoparticles. Radiosensitization. Cancer.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Fluxograma da sequência de eventos após a exposição de tecidos biológicos à radiação.....	34
Figura 2 - Ilustração de mecanismos de precipitações coloidais que levam a partículas monodispersas: (a) modelo de La Mer, (b) modelo de Ocaña e (c) modelo de Sugimoto	45
Figura 3 - Fluxograma da pesquisa.....	56
Figura 4 - Reentrâncias das placas de cultivo celular.	57
Figura 5 - Posicionamento e parâmetros de Irradiação das amostras	58
Figura 6 - Efeito das nanopartículas sobre a viabilidade celular da linhagem HepG2 não irradiada	61
Figura 7 - Efeito das nanopartículas sobre a viabilidade celular da linhagem HRT-18 não irradiada	62
Figura 8 - Efeito da radiação ionizante sobre a viabilidade celular da linhagem HepG2 na amostra controle (0 ppm).	63
Figura 9- Efeito da radiação ionizante sobre a viabilidade celular da linhagem HRT-18 na amostra controle (0 ppm).	63
Figura 10 - Efeito das diferentes concentrações de nanopartículas sobre a viabilidade celular na linhagem HepG2 irradiada.	64
Figura 11 - Efeito das diferentes concentrações de nanopartículas sobre a viabilidade celular na linhagem HRT-18 irradiada.....	65
Figura 12 - Resultado de ensaio de DLS das nanopartículas de óxido de ferro recobertas por copoliéster caprolactona modificada por cisteína na concentração de 2mg/mL (A) e 0,5 mg/mL (B)	66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -Classificação de Barcelona-Clinic Liver Cancer	26
Tabela 2 - Modalidades de Braquiterapia conforme a localização do tumor e métodos de implantação da fonte de radiação	28
Tabela 3 - Características das Radiações Ionizantes, Corpusculares e Eletromagnéticas.....	32
Tabela 4 - Produtos Gerados pelo processo de radiólise.....	35
Tabela 5 - Efeitos diretos da exposição à radiação e seus limites de dose	36
Tabela 6- Fases, doses e sintomas após exposição a altas doses de radiação.	37
Tabela 7 -Relação entre número de átomos e área superficial das nanopartículas	40
Tabela 8 - Métodos de preparação de nanopartículas	42
Tabela 9 - Sistemas coloidais classificados de acordo com a natureza das fases dispersa/dispersante	43
Tabela 10 - Alguns estudos sobre efeitos de radiosensibilização de nanopartículas	67
Tabela 11 - Resultados de DLS e Potencial Zeta de alguns estudos pesquisado ..	68

LISTA DE SIGLAS

BCLC - Classificação de Barcelona-Clinic Liver Cancer

BRCA1/BRCA2 - Genes supressores de tumor relacionados ao câncer de mama

CCR - Câncer Colorretal

CEP - Comitê de Ética em Pesquisa

CEPON - Centro de Pesquisas Oncológicas

cGy/min - centiGray por minuto (taxa de dose de radiação)

CHC - Carcinoma Hepatocelular

DLS - Espalhamento Dinâmico de Luz

DNA - Ácido Desoxirribonucleico

EDTA - Ácido Etilenodiamino Tetracético

Gy - Gray (unidade de medida de dose absorvida)

HepG2 - Linhagem Celular Cancinoma HepatoCelular

HRT-18 - Linhagem Celular Câncer Colorretal

IFSC - Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Santa Catarina

INCA - Instituto Nacional de Câncer

IRM - Imagem por Ressonância Magnética

MET - Microscopia Eletrônica por Transmissão

MTT - 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide

MV - Mega Volt (unidade de energia do feixe de radiação)

NPs - Nanopartículas

NRU - Neutral Red Uptake

PBS - Solução Salina Tamponada com Fosfato

PGLA - Copoliéster Caprolactona Modificada por Cisteína

PPM - Partes Por Milhão (Unidade De Concentração)

REF - Fator de Radiossensibilização

ROS - Espécies Reativas de Oxigênio

RTOG - Radiation Therapy Oncology Group

SPIONs - Nanopartículas de Óxido de Ferro Superparamagnéticas

UFPR - Universidade Federal do Paraná

UFSC - Universidade Federal de Santa Catarina

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	18
2.	JUSTIFICATIVA	21
3.	OBJETIVOS	22
3.1.	Objetivo Geral	22
3.2.	Objetivos Específicos.....	22
4.	REVISÃO DA LITERATURA.....	23
4.1	Câncer Colorretal.....	23
4.1.	Carcinoma Hepatocelular.....	24
4.2.	Radioterapia e Interação da Radiação Ionizante.....	27
4.2.1.	Interação da radiação ionizante com os tecidos	30
4.2.2.	Efeitos Radiobiológicos da Radiação Ionizante	33
4.3.	Nanopartículas	38
4.3.1.	Nanopartículas de óxido de ferro superparamagnéticas (SPIONs).	40
4.3.2.	Síntese de Nanopartículas de óxido de ferro superparamagnéticas	41
4.3.3.	Caracterização de Nanopartículas de óxido de ferro superparamagnéticas.....	46
4.4.	Radiossensibilidade Celular	48
4.4.1.	Nanopartículas de óxido de ferro como radiossensibilizadores.	50
5.	METODOLOGIA.....	52
5.1.	Nanopartículas	52
5.2.	Cultivo celular	54
5.3.	Etapas Da Pesquisa.....	55
5.3.1.	Criação e Testes de Phantom	56
5.3.2.	Ensaio de Irradiação e de citotoxicidade celular	57
5.3.3.	Caracterização Físico-Química das SPIONs	60
5.3.4	Análise Estatística.....	60
6.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	61
6.1.	Ensaio Biológicos de Citotoxicidade.....	61
6.2.	Caracterização Físico-Química.....	65
6.3.	Discussão.....	66
7.	CONCLUSÃO.....	69
7.1.	Sugestões Para Trabalhos Futuros.....	69
	REFERÊNCIAS	71

APENCICE A – MANUSCRITO A.....	75
--------------------------------	----

1. INTRODUÇÃO

O câncer é um conjunto de doenças complexas e multifatoriais que se originam a partir de células do próprio corpo que passam a se dividir de maneira descontrolada e invadem tecidos adjacentes, sendo uma das principais causas de morbidade e mortalidade em todo o mundo. (INCA, 2022) Cada tipo de câncer é caracterizado por um crescimento anormal e não regulado de células que formam tumores malignos. Estes tumores podem invadir outros tecidos e órgãos, prejudicando seu funcionamento normal. (SANTOS, et al., 2018)

No Brasil, o Instituto Nacional de Câncer (INCA, 2022) estimou para o triênio 2023-2025 cerca de 704 mil novos casos de câncer por ano, onde 70% dos casos estão previstos para as regiões Sul e Sudeste, sendo o câncer de mama e o de próstata os tipos da doença com maior incidência no país, após o câncer de pele não melanoma.

O tratamento do câncer é uma jornada complexa que pode envolver uma variedade de abordagens terapêuticas, incluindo: cirurgia, quimioterapia, imunoterapia, terapias hormonais e, fundamentalmente, radioterapia, que utiliza radiações ionizantes para destruir ou danificar as células tumorais, impedindo sua multiplicação. (SANTOS, et al., 2018)

Um dos aspectos cruciais da radioterapia é a radiosensibilidade das células tumorais (YANG, et al., 2018). Estas células são mais facilmente danificadas ou mortas pela radiação do que as células não tumorais devido a sua baixa capacidade de defesa antioxidante. A radiação ionizante age, em parte, induzindo a geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) dentro das células tumorais (LIU, et al., 2018), danificando o DNA e outras biomoléculas e consequentemente organelas e estruturas celulares, levando à morte das células tumorais.

No entanto, apesar dos benefícios significativos que a radioterapia oferece, a mesma não está isenta de riscos. As radiações ionizantes podem afetar os tecidos saudáveis próximos ao tumor, levando a efeitos colaterais consideráveis, como dermatite (BURKE, et al. 2022), fibrose (WANG, et al., 2020), linfedema (NASSIF, et al., 2020) e pneumonite (ZHOU, 2022).

O estudo aprofundado das interações entre a radiação ionizante e as células tumorais, incluindo os mecanismos de geração de EROs (SIES, et al., 2022) e radiosensibilidade (HALL, 2022), é fundamental para otimizar a eficácia deste tratamento. O desenvolvimento de radiosensibilizadores que potencializam o efeito da radiação nas células tumorais, permitindo o uso de doses menores de radiação, é, portanto, um grande avanço no tratamento de vários tipos de câncer (LIUYUN, et al., 2021).

Com esse intuito, nanopartículas metálicas, como as de ouro (CHEN, et al., 2020), platina (SACHIN, et al., 2023) e as de óxido de ferro (DUBEY, 2022), vêm sendo amplamente investigadas por seu potencial como agentes radiosensibilizadores.

Estudos demonstram que nanopartículas de óxido de ferro quando internalizadas pelas células tumorais podem amplificar a formação de EROs quando expostas à radiação ionizante, exacerbando a ocorrência de dano ao DNA e aumentando a morte celular (DUBEY, 2022, FATHY, et al., 2019, DEFU, et al., 2020). Contudo, a eficácia das nanopartículas como radiosensibilizadores pode depender de vários fatores como: dose de radiação, tamanho, forma, composição, revestimento, bem como das condições experimentais e modelo celular (GUERRA, 2021). Salienta-se ainda que há uma carência de estudos comparando seus efeitos em diferentes linhagens tumorais, bem como em células normais.

Neste contexto, este trabalho visou investigar o potencial de nanopartículas de óxido de ferro (SPIONs) revestidas com o copoliéster caprolactona modificada com cisteína em promover a radiosensibilização de linhagens celulares de alguns tipos de câncer através de experimentos *in vitro*. Desta forma, espera-se fornecer evidências sobre a aplicabilidade e limitações desta estratégia para aprimorar os resultados do tratamento radioterápico.

Em longo prazo, o desenvolvimento de nanomateriais radiosensibilizadores, poderá viabilizar tratamentos mais personalizados e efetivos. Ao amplificar a resposta tumoral à menor dose de radiação ionizante, o dano aos tecidos sadios adjacentes seria minimizado, reduzindo a sua toxicidade e

melhorando a qualidade de vida das pacientes. Assim, nano radiosensibilizadores seletivos representam uma perspectiva promissora para contribuir no tratamento contra o câncer.

2. JUSTIFICATIVA

O câncer é caracterizado como um dos principais problemas de saúde pública no Brasil e em todo o mundo. A radioterapia, uma ferramenta fundamental no tratamento de tumores, utiliza radiações ionizantes para danificar as células tumorais, porém, também afeta tecidos saudáveis próximos.

Neste cenário, nanopartículas metálicas, como as de óxido de ferro, têm sido investigadas por seu potencial radiosensibilizador (CHEN, et al., 2020, SACHIN, et al., 2023, DUBEY, 2022). Estas nanopartículas, quando internalizadas pelas células tumorais, podem aumentar a formação de EROs (SIES, et al., 2022) quando expostas à radiação ionizante, intensificando a ocorrência de danos ao DNA e outras biomoléculas nas células tumorais as levando à morte. (SHESTOVSKAYA, et al., 2023) Os resultados esperados deste trabalho não apenas poderão expandir o conhecimento sobre radiosensibilizadores nanoparticulados em linhagens tumorais específicas, mas também proporcionarão “insights” cruciais sobre a aplicabilidade clínica dessa estratégia.

A redução da dose de radiação necessária, minimizando os danos aos tecidos saudáveis, e consequentemente reduzindo os efeitos colaterais do tratamento, representa um avanço significativo na qualidade de vida dos pacientes e estabelece um caminho promissor para o avanço no tratamento do câncer no cenário médico atual.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Avaliar o potencial radiosensibilizante de nanopartículas de óxido de ferro recobertas por copoliéster caprolactona modificada por cisteína em linhagens de células tumorais de câncer colorretal (HRT-18) e carcinoma hepatocelular (HepG2), irradiadas por fótons X de 6 MV.

3.2. Objetivos Específicos

Com o intuito de alcançar o propósito principal desta pesquisa, foram estabelecidos os seguintes objetivos específicos:

- a) Avaliar a radiosensibilização mediada pelas nanopartículas superparamagnéticas estabilizadas com copoiléster por meio da determinação da viabilidade celular após o tratamento de células HRT-18 e HepG2 incubadas com as nanopartículas submetidas e não submetidas a irradiação ionizante;
- b) Interpretar os resultados obtidos, identificando diferenças significativas na radiosensibilidade entre as linhagens celulares estudadas.

4. REVISÃO DA LITERATURA

4.1 Câncer Colorretal

O câncer colorretal (CCR) emerge como uma das neoplasias mais prevalentes globalmente, tendo como epicentro de sua origem o cólon ou o reto, constituindo o segmento final do sistema digestivo. Sua evolução se desenha a partir de pólipos, formações benignas no revestimento interno do cólon ou do reto. Apesar de tratável quando identificado em estágios iniciais, permanece como uma das principais causas de morbidade e mortalidade associadas ao câncer (SIEGEL, 2023).

Com uma incidência anual ultrapassando 1,9 milhão de novos casos, o CCR figura como o terceiro tipo de câncer mais comum tanto em homens quanto em mulheres em todo o mundo. (SIEGEL, 2023) Sua distribuição geográfica exhibe variações marcantes, sendo as taxas mais elevadas reportadas em países ocidentalizados. Prevê-se que, anualmente, entre 2023 e 2025, surjam cerca de 45.630 novos casos de câncer colorretal no Brasil. Desconsiderando-se os melanomas, esse tipo de neoplasia é o terceiro mais frequente no país. (INCA, 2022)

A idade, fator determinante, tende a acentuar o risco, com a maioria dos diagnósticos ocorrendo após os 50 anos, com o risco aumentando exponencialmente com a idade. Além disso, uma história familiar de CCR, particularmente entre parentes de primeiro grau, eleva significativamente a probabilidade de diagnóstico. (INCA, 2022)

Os tipos predominantes de CCR incluem: adenocarcinoma, carcinoma de células escamosas e carcinoides (GIAQUINTO, 2022). O processo de estadiamento é crucial para determinar o prognóstico e o curso do tratamento. Utilizando uma escala de 0 a IV, o estágio 0 indica a presença de células anômalas apenas na camada mais superficial do revestimento do cólon, enquanto o estágio IV indica disseminação para órgãos distantes, indicando um quadro de metástase e avançado da doença (SIEGEL, 2023).

Os sintomas do CCR variam consideravelmente, mas podem incluir alterações nos hábitos intestinais, sangramento retal, fadiga, perda de peso

inexplicada e dor abdominal. (INCA, 2022) O diagnóstico precoce é crucial e é comumente realizado através de colonoscopia, exames de sangue específicos e tomografia computadorizada, que permitem uma avaliação detalhada da extensão da doença.

O tratamento do CCR é realizado levando em consideração diversos aspectos como o estágio da doença, sua localização e a saúde geral do paciente. As opções de tratamento incluem cirurgia, na qual o tumor e, às vezes, partes do cólon ou reto são removidos, quimioterapia, radioterapia, imunoterapia e terapias-alvo. (GIAQUINTO, 2022) (INCA, 2022)

A prevenção do CCR é multifacetada. Envolve a realização de exames de rastreamento regulares, bem como a adoção de um estilo de vida saudável, que inclui uma dieta equilibrada e a prática regular de atividades físicas, além de evitar o tabagismo e o consumo excessivo de álcool. A conscientização pública sobre os sinais e sintomas é de extrema importância para diagnósticos precoces, permitindo tratamentos mais eficazes e uma melhor qualidade de vida para os pacientes afetados por essa condição devastadora (INCA, 2022).

Em síntese, o CCR representa um desafio significativo na área da oncologia, demandando estratégias de prevenção, diagnóstico e tratamento aprimoradas. Com uma abordagem multidisciplinar, pesquisa contínua e conscientização generalizada, pode-se não apenas melhorar a detecção precoce, mas também oferecer terapias mais eficazes, conduzindo a melhores resultados e qualidade de vida para aqueles afetados por esta doença complexa e impactante.

4.1. Carcinoma Hepatocelular

O carcinoma hepatocelular (CHC) emerge como uma forma predominante de câncer primário do fígado, apresentando-se como uma ameaça substancial à saúde global. Originado a partir dos hepatócitos, as células parenquimatosas do fígado, frequentemente se desenvolve em um cenário de cirrose hepática, a qual é caracterizada por cicatrização crônica do tecido hepático. (CHEDID, 2017)

Os principais fatores de risco para o surgimento de CHC incluem cirrose hepática, hepatite B e C crônicas, consumo excessivo de álcool, obesidade, exposição a aflatoxinas (toxinas produzidas por fungos em alimentos mal armazenados) e doença hepática gordurosa não alcoólica. A prevalência de hepatite viral em muitas partes do mundo, especialmente a hepatite B e C, é uma das principais razões para a alta incidência de CHC (GANESAN, 2023).

O CHC é considerado o sexto tipo mais comum de câncer no mundo, com mais de 800 mil novos casos diagnosticados anualmente. A Ásia, particularmente países como China e Vietnã, enfrenta uma incidência elevada desse tipo de câncer devido à alta incidência de hepatite crônica na região. (SIEGEL, 2023). Estima-se que, entre 2023 e 2025, sejam diagnosticados cerca de 10.700 novos casos de câncer de fígado no Brasil. Desconsiderando-se os melanomas, esse tipo de câncer é o 15º mais comum no país. As taxas de incidência mais elevadas são observadas na Região Sul, tanto no sexo masculino quanto no feminino (INCA,2022).

Em seus estágios iniciais, o CHC pode ser assintomático, dificultando o diagnóstico precoce. À medida que progride, os sintomas podem incluir dor abdominal, perda de peso, icterícia (coloração amarela da pele e olhos), inchaço abdominal e fácil contusões. O diagnóstico envolve ultrassonografia, tomografia computadorizada, ressonância magnética, biópsia hepática e exames de sangue específicos. (GANESAN, 2023)

O estadiamento do CHC é crucial para orientar as opções de tratamento. A classificação de Barcelona-Clinic Liver Cancer (BCLC) é frequentemente usada, variando desde tumores em estágios iniciais até doença avançada. (CHEDID, 2017) As opções de tratamento incluem ressecção cirúrgica, transplante de fígado, ablação por radiofrequência, quimioembolização, terapia-alvo e imunoterapia. A escolha do tratamento depende do estágio do câncer, da saúde geral do paciente e da disponibilidade de órgãos para transplante. (Tabela 1)

Tabela 1 -Classificação de Barcelona-Clinic Liver Cancer

A	Estágio Bastante Inicial (o)	CHC único < 2 cm, Child A, ps 0.	
	Estágio Inicial (a)	Até 3 CHC, todos < 3 cm, Child A-B, ps 0.	
	Estágio Intermediário (b)	CHC grande e/ou multinodular, Child A-B, ps 1-2	
	Estágio Avançado (c)	Invasão portal, doença extra hepática, Child A-B ps 1-2.	
	Estágio Terminal (d)	Child Pugh C ps 3-4	
B	T	Tumor	
	Tx	Tumor primário não pode ser localizado	
	T0	Não há evidencia de tumor primário	
	T1	Tumor único sem invasão vascular	
	T2	Tumor único com invasão vascular ou tumores múltiplos todos < 5 cm	
	T3a	Tumores múltiplos > 5 cm	
	T3b	Tumor único ou múltiplos com invasão de ramo maior pela veia porta ou de ramo maior das veias hepáticas	
	T4	Tumor(es) com invasão direta de órgãos adjacentes, excluindo-se a vesícula biliar ou o peritônio visceral	
	N	Linfonodos Regionais	
	Nx	Linfonodos Regionais não podem ser avaliados	
	N0	Sem metástase nos Linfonodos Regionais	
	N1	Metástase nos Linfonodos Regionais	
	M	Metástase à Distancia	
	M0	Sem Metástase à Distancia	
	M1	Com Metástase à Distancia	
Estadiamento Agrupado			
Estádio	T	N	M
I	T1	N0	M0
II	T2	N0	M0
IIIA	T3a	N0	M0
IIIB	T3b	N0	M0
IIIC	T4	N0	M0
IVA	Qualquer T	N1	M0
IVB	Qualquer T	Qualquer N	M1

Fonte: adaptado de CHEDID (2017)

A prevenção do CHC está intrinsicamente ligada à prevenção da cirrose hepática e à gestão das hepatites virais. Vacinação contra hepatite B, redução do consumo de álcool, diagnóstico e tratamento precoces de hepatites crônicas são estratégias cruciais. A conscientização sobre os fatores de risco e os sintomas são vitais para garantir diagnósticos precoces, melhorando significativamente as perspectivas de tratamento e sobrevivência. (GANESAN, 2023)

O CHC continua a ser um desafio de saúde global, demandando esforços concentrados em pesquisa, prevenção e tratamento. Com intervenções eficazes, conscientização pública e acesso equitativo aos cuidados de saúde, podemos não apenas melhorar a detecção precoce, mas também oferecer tratamentos mais eficazes, proporcionando uma melhor qualidade de vida para os pacientes afetados por esta doença (CHEDID, 2017).

4.2. Radioterapia e Interação da Radiação Ionizante

A radioterapia é uma das áreas de conhecimento da radiologia, onde utiliza-se as radiações ionizantes, não com finalidade de diagnóstico, mas sim, com método terapêutico no combate de algumas patologias, principalmente, o câncer, onde tem como objetivo, impedir que células tumorais se multipliquem, ou seja, impossibilitando a mitose celular ou causando a morte das células tumorais. (BRASIL, 2022)

Existem duas técnicas principais de radioterapia: braquiterapia e teleterapia. A braquiterapia é uma terapia de curta distância onde uma fonte contendo um radioisótopo é usada para liberar radiação beta ou gama a alguns centímetros do volume do tumor. A braquiterapia possui diversas modalidades, conforme a localização do tumor, e diferentes métodos podem ser utilizados para implantar a fonte na posição estabelecida no planejamento do tratamento (Tabela 2) (BRASIL, 2023).

Tabela 2 - Modalidades de Braquiterapia conforme a localização do tumor e métodos de implantação da fonte de radiação

	Localidade	Descrição
Modalidades Braquiterapia	Superficial	• Fonte colocada sobre a superfície do tumor ou sobre a pele.
	Intracavitária	• A fonte é introduzida em cavidades do organismo (traquéia, esôfago, vagina, reto, uretra, etc) adjacentes aos tumores.
	Intraluminal	• A fonte de radiação é introduzida rapidamente dentro do lúmen ou na luz de certas cavidades do corpo, tal como a árvore brônquica.
	Intersticial	• É utilizada atualmente na forma de implantes temporários ou permanentes, através de agulhas ou tubos de material plástico que passam através do tumor
Método de Implantação das fontes	Implantação Direta	• Implantação direta de fontes em tecidos do corpo onde as próprias fontes radioativas entram em contato direto com o tecido.
	Pré-loading	• As fontes radioativas são colocadas dentro de carregadores em cavidades ou perto do tecido que se queira irradiar.
	After loading	• Método no qual os aplicadores são colocados, em cavidades ou perto do sítio de tratamento e as fontes radioativas são inseridas dentro destes aplicadores sob condições favoráveis de radioproteção.
	Remote-After loading	• É um "after loading" nos quais as fontes radioativas são carregadas nos aplicadores mecanicamente por meio de conduítes acoplados

aos aplicadores

Fonte: Adaptado de FERREIRA (2015)

Ainda, a técnica de braquiterapia, pode ser subdividida em braquiterapia de alta ou baixa taxa de dose, onde são utilizados ^{137}Cs (baixa taxa) e ^{192}Ir (alta taxa) entre outros radioisótopos (FERREIRA, 2015).

Na teleterapia, a fonte de radiação ionizante fica à distância do paciente. Nessa modalidade de radioterapia podem ser utilizados feixes de raios-X, raios gama, elétrons de alta energia e nêutrons. Para a utilização de diferentes tipos de radiação, podem ser empregado diferentes equipamentos (MORAIS, 2015). Para raios X de baixa intensidade ou de ortovoltagem são utilizados equipamentos que operam com quilovoltagem entre 10 e 100 kVp, RX superficial ou equipamentos de ortovoltagem que operam entre 100 e 300 kVp. Nessa modalidade pode-se tratar lesões superficiais de pele, ou com até 3 cm de profundidade (quelóides, hemangiomas, carcinomas basilares). Fontes de Cobalto 60 também são utilizados na teleterapia (cobaltoterapia) e emitem raios gama com energias de 1,17 MeV e 1,33 MeV. (MORAIS, 2015)

Aceleradores lineares são utilizados em radioterapia para acelerar elétrons que colidem com um alvo metálico, podendo gerar feixes de elétrons e fótons. Quando desacelerados o feixe de elétrons produz raios X por *bremsstrahlung* (FERRO, 2021) que podem gerar feixes de raio X de 4 até 24 MV de energia. No entanto, em tratamentos com elétrons, os elétrons acelerados não colidem com um alvo metálico, permitindo que o feixe de elétrons atinja diretamente o paciente em tratamento. Os tratamentos com elétrons são adequados para órgãos alvo superficiais com estruturas radiossensíveis ao redor e lesões infiltrativas de pele. A faixa de energia dos elétrons fica entre 4 e 25 MeV (Mega elétron Volt) a depender do equipamento

A teleterapia é realizada em regime ambulatorial, e a dose total do tratamento é fracionada em aplicações diárias por um período que pode variar de 2 semanas a 2 meses, dependendo das condições clínicas do paciente, estadiamento da doença e estratégia de tratamento (MORAIS, 2015; BRASIL, 2022)

Independentemente do tipo de tratamento radioterápico escolhido (teleterapia ou braquiterapia), a radioterapia poderá ser feita com a finalidade curativa ou paliativa. (MARTINS, 2020)

Quando a intensão do tratamento for a cura da neoplasia, causando a morte das células tumorais ou impossibilitando sua multiplicação, o tratamento será (BRASIL, 2022) (MARTINS, 2020):

- Adjuvante, quando se realiza tratamento local cirúrgico seguido do tratamento radioterápico ou
- Neo-adjuvante, quando é realizado o tratamento radioterápico com a intenção de reduzir o tamanho do tumor, possibilitando o tratamento cirúrgico de um câncer antes inoperável ou ainda melhorando as condições cirúrgicas para a retirada do tumor.

Para tratamento paliativo, busca-se melhorar a qualidade de vida do paciente, aliviando a dor, obstruções e compressões neurológicas causados pela doença. O tratamento dependerá das condições clínicas do paciente e do estadiamento da doença.

Sendo o tratamento curativo ou paliativo, existem sempre os efeitos tóxicos decorrentes do tratamento radioterápico. O grau e os sintomas dependerão da localização do tumor, do volume do tecido irradiado, da energia utilizada, da dose total e do estado geral do paciente. De maneira geral, os pacientes, independentemente, do local do tratamento, costumam sentir fadiga, reações na pele e inapetência. (DOS SANTOS, 2022; BRASIL, 2022) As reações podem ser agudas, quando surgem durante ou até um mês após o término do tratamento; intermediárias, entre 1 e 3 meses após o término do tratamento; e, tardias, entre 3 e 6 meses após o término do tratamento (DOS SANTOS, 2022)

4.2.1. Interação da radiação ionizante com os tecidos

A radiação ionizante é qualquer radiação que possui energia suficiente para arrancar elétrons dos átomos, deixando-os carregados positivamente, podendo essa radiação ser do tipo eletromagnética ou corpuscular (HALL, 2022).

A radiação eletromagnética refere-se à propagação de energia através de ondas eletromagnéticas, que são combinações de campos elétricos e magnéticos oscilantes, perpendicularmente entre si e à direção de propagação não precisando de um meio físico de propagação, abrangendo todo o espectro eletromagnético com uma ampla faixa de comprimentos de onda, desde ondas de rádio, micro-ondas, infravermelho, luz visível, ultravioleta, raios X até raios gama.

Cada região do espectro eletromagnético possui características distintas em termos de energia, frequência e interações com a matéria. É importante notar que a maioria das radiações presentes nesse espectro é não ionizante. No entanto, as radiações ionizantes, como os raios X e a radiação gama, possuem energia suficiente para ionizar a matéria, apresentando efeitos biológicos e propriedades de interação específicos (SIES et al., 2022).

As radiações corpusculares referem-se à emissão de partículas subatômicas, como elétrons, prótons, nêutrons, partículas alfa de uma fonte radioativa (ABIDIN et al., 2019). Essas partículas possuem massa e podem ter carga elétrica (Tabela 3). Ao contrário da radiação eletromagnética, que se propaga como ondas, a radiação corpuscular consiste em partículas que se movem através do espaço. Temos com representantes de radiação ionizantes corpusculares elétrons, prótons, partículas Alfa e Nêutrons. (SIES et al., 2022; HALL, 2022)

Tabela 3 - Características das Radiações Ionizantes, Corpusculares e Eletromagnéticas

Tipo de Radiação	Símbolo	Energia	Carga	Origem
Corpuscular				
Partículas Alfa	α	4-7 MeV	+2	Núcleo
Partículas Beta	β-	0-7 Mev	-1	Núcleo
	β+		+1	
Eletromagnéticas				
Raios Gama	γ	0-5 MeV	0	Núcleo
Raios X	X	0-25 MeV	0	Eletrosfera

Fonte: Adaptado de Dos Santos (2022)

Radiações ionizantes, corpusculares ou eletromagnéticas, interagem com tecidos transferindo sua energia através da interação com a matéria. Essa interação pode ocorrer de uma ionização direta, quando a radiação ionizante interage com elétrons da eletrosfera, transferindo energia suficiente para arrancar os elétrons do seu orbital, ionizando o átomo a qual faz parte. Outro processo físico envolve uma ionização indireta, quando radiações ionizantes interagem com a matéria, criando outras radiações ionizantes secundárias, como raios X, elétrons secundários, e esses por sua vez, ionizam outros átomos. (SIES et al., 2022; ABIDIN et al., 2019)

Essas ionizações ocorrem através de efeitos, onde sua ocorrência vai depender da faixa de energia da radiação ionizante, bem como do tipo de interação que ocorreu. Quando uma radiação ionizante arranca elétrons das camadas internas da eletrosfera, cedendo toda a sua energia, a vaga deixada é preenchida por elétrons das camadas superiores, que por sua vez precisam emitir energia na forma de radiação ionizante (raios X) para poder mudar para um orbital energético mais baixo, esta interação é chamada de efeito fotoelétrico (SCHÄFER, 2017)

Já o Efeito Compton Erro! Fonte de referência não encontrada. é um fenômeno observado na dispersão de raios X ou raios gama por elétrons livres ou fracamente ligados em átomos. Um fóton de raios X ou raios gama incide sobre um elétron em

um átomo. Durante a interação, parte da energia da radiação ionizante incidente é transferida para o elétron. O elétron, agora com mais energia, é ejetado do átomo com uma direção e velocidade características, e é conhecido como elétron-Compton, e também fótons com comprimento de onda maior constituem a radiação espalhada, constituindo o espalhamento Compton.

Tem-se também o efeito de criação de pares. Este é um processo físico no qual uma radiação ionizante de alta energia é absorvida pelo núcleo do átomo alvo tendo sua energia convertida em matéria, gerando um par elétron-pósitron. O processo de criação de pares ocorre em situações em que a energia do fóton é suficientemente alta, geralmente acima de 1,02 MeV (megaelétron-volts). Nele um fóton de alta energia incide sobre um campo elétrico forte, do núcleo atômico com carga positiva. O fóton converte sua energia em um par elétron-pósitron na proximidade do núcleo. O elétron e o pósitron recém-criados são então ejetados em direções opostas.

Os elétrons que resultam da produção de pares perdem energia através de excitação, de ionização e, eventualmente, preenchem vacâncias de camadas atômicas. O pósitron se une com um elétron livre, e a massa de ambos é convertida em energia, na forma de duas radiações gamas com direção opostas, em um processo chamado radiação de aniquilação.

4.2.2. Efeitos Radiobiológicos da Radiação Ionizante

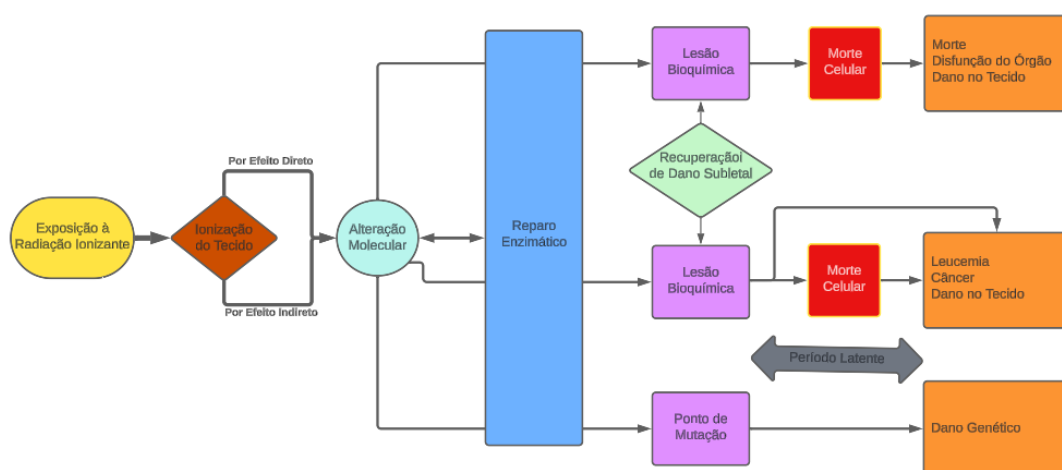
Para radiação ionizante e suas interações, não há diferença entre tecido orgânico e qualquer outro material. Os efeitos, ocorrem em nível atômico. Essas interações atômicas assumem a forma de ionização ou excitação de elétrons orbitais e resultam na deposição de energia no tecido.

Essa energia depositada pode produzir uma mudança molecular, cujas consequências podem ser mensuráveis através da avaliação da viabilidade celular (ŞAHİN, 2023). Quando um átomo é ionizado, as propriedades das suas ligações químicas se modificam. Quando presente em uma molécula, a ionização atômica pode resultar na quebra da molécula ou na realocação do átomo dentro da molécula,

o que pode alterar suas características. A molécula modificada passa a funcionar de maneira inapropriada ou até perder sua função, resultando em desajustes funcionais podendo levar a célula a morte (HALL, 2022).

A Figura 1 apresenta um fluxograma que mostra a sequência de eventos após a exposição de tecidos biológicos à radiação.

Figura 1- Fluxograma da sequência de eventos após a exposição de tecidos biológicos à radiação



Fonte: Adaptado de Dos Santos (2022)

Quando um material biológico é irradiado *in vivo*, os efeitos nocivos da irradiação se devem aos danos causados a biomoléculas sensíveis a radiação, como o DNA. O efeito da radiação é considerado direto se o evento inicial de ionização causou o dano na molécula com a qual interagiu. Se a radiação ionizante interage com uma molécula distante, modificando sua estrutura, ou até mesmo quebrando-a, e esta molécula alterada gerar danos a moléculas importantes (por exemplo o DNA) para o funcionamento celular, dizemos que é um efeito indireto. Embora contraintuitivo, são os efeitos indiretos da interação da radiação ionizantes com tecido biológico que causa mais danos aos seres vivos (HALL, 2022).

Os danos, diretos e indiretos, podem ocorrer em moléculas de proteínas, lipídios, carboidratos ácidos nucleicos e água. Tais macromoléculas podem sofrer

um serie de danos na sua estrutura, podendo ocorrer a cisão da molécula, mudança nas ligações, ocorrendo a ligação cruzada da molécula ou ainda danos pontuais na sua estrutura.

Como os seres humanos são constituídos de aproximadamente 60% de água, estando ela diretamente envolvida em um número gigantesco de processos bioquímicos, a irradiação água representa a principal interação da radiação ionizante no organismo. Os efeitos sobre a molécula de água são completamente diferentes dos efeitos da radiação ionizante sobre macromoléculas. Quando a água é irradiada, ela se dissocia em outros produtos moleculares através da radiólise

O resultado final da radiólise da água é a formação de um par de íons, H^+ e OH^- , e dois radicais livres, $H^\bullet$ e $OH^\bullet$. Um radical livre é uma molécula de carga elétrica total nula que contém um elétron desemparelhado na camada externa, sendo extremamente reativos. Os radicais livres contêm energia em excesso que pode ser transferida para outras moléculas a uma certa distância do evento inicial de ionização (Efeito Indireto), podendo levar à ruptura de ligações químicas e, conseqüentemente, à produção de pontos de lesão. $H^\bullet$ e $OH^\bullet$ não são os únicos radicais livres que são produzidos durante a radiólise da água (DUBEY, 2022). A Tabela 4 apresenta alguns dos produtos da radiólise, todos tóxicos para células humanas.

Tabela 4 - Produtos Gerados pelo processo de radiólise

Produtos Gerados pela Radiólise	
Peróxido de Hidrogênio	$OH^\bullet + OH^\bullet \rightarrow H_2O_2$
Hidroperoxila	$H^\bullet + O_2 \rightarrow HO_2^\bullet$
Peróxido de Hidrogênio	$HO_2^\bullet + HO_2^\bullet \rightarrow H_2O_2 + O_2$
Radicais Livres Orgânicos (com H)	$RH + RH^\bullet \rightarrow H^\bullet + R^\bullet$
Radicais Livres Orgânicos (com O)	$R^\bullet + O_2 \rightarrow RO_2^\bullet$

Fonte: Adaptado de Souza (2021)

Todos esses produtos gerados a partir da radiólise da água tem potencial para causar danos a outras macromoléculas, em especial ao DNA.

De maneira geral, os efeitos dos danos causados por esses produtos serão tão maiores quanto maior for a dose de radiação que a pessoa foi exposta. Não existe limites de doses 100% seguras. Os efeitos podem ser imediatos, descritos como determinísticos, ou tardios, denominados estocásticos (LIMA, 2021).

Os efeitos determinísticos estão diretamente ligados a um limiar de dose de radiação, a qual, quando ultrapassado, começam aparecer os primeiros efeitos imediatos da exposição. A Tabela 5 apresenta alguns efeitos diretos e com seus respectivos limiares de dose.

Tabela 5 - Efeitos diretos da exposição à radiação e seus limites de dose

Efeito	Local Anatômico	Dose Limiar
Morte	Corpo inteiro	200 rad / 2 Gy
Depressão hematológica	Corpo inteiro	25 rad / 250 mGy
Eritema da pele	Campo pequeno	200 rad / 2 Gy
Epilação	Campo pequeno	300 rad / 3 Gy
Aberração cromossômica	Corpo inteiro	5 rad / 50 mGy
Disfunção das gônadas	Tecido local	10 rad / 100 mGy

Fonte: Adaptado de Lima (2021).

A exposição a altas doses de radiação ionizante pode levar a síndrome aguda da radiação, que é uma condição médica grave causada pela exposição aguda a doses elevadas de radiação ionizante em um curto período. A Tabela 6 apresenta as fases, doses e seus sintomas.

Tabela 6- Fases, doses e sintomas após exposição a altas doses de radiação.

Período	Dose Aproximada (rad.)	Tempo Médio de Sobrevivência (dias)	Sintomas Clínicos
Prodrômico	>100	-	Náusea, vômito, diarreia
Latente	100 a 10000	-	Nenhum
Hematológico	200 a 1000	10 a 60	Náusea, vômito, diarreia, anemia, leucopenia, hemorragia, febre, infecção
Gastrointestinal	1000 a 5000	4 a 10	Os mesmos que na síndrome hematológica mais desequilíbrio eletrolítico, letargia, fadiga, choque.
Sistema Nervoso Central	> 5000	0 a 3	O mesmo da síndrome gastrointestinal mais ataxia, edema, vasculite do sistema, meningite

Fonte: Adaptado de Lima (2021).

Os efeitos estocásticos da radiação, ou efeitos tardios, são aqueles que têm uma probabilidade de ocorrer, mas cuja gravidade não depende da dose de radiação recebida (ABIDIN et al., 2019). Não há um limiar claro de dose abaixo do qual não haja risco, e quanto maior a dose, maior a probabilidade de o efeito ocorrer. Esses efeitos estão relacionados principalmente à exposição a radiações ionizantes, como raios X e raios gama.

Os efeitos estocásticos resultam de alterações genéticas aleatórias nas células expostas à radiação (REZAEI et al., 2019). Diferentemente dos efeitos determinísticos, nos quais a severidade do dano aumenta com a dose, os efeitos estocásticos estão associados a mudanças que podem levar ao desenvolvimento do câncer ou a outras condições genéticas. A probabilidade de ocorrência desses

efeitos aumenta com a dose, mas não há um limiar claro abaixo do qual não haja risco.

O efeito estocástico mais significativo é o aumento na probabilidade de desenvolvimento do câncer (SCHÄFER, 2017; LIMA, 2021). As células danificadas pelo processo estocástico podem sofrer mutações que levam ao crescimento descontrolado e formação de tumores. Além disso, alterações no material genético podem ocorrer em células reprodutivas, resultando em efeitos hereditários que podem ser transmitidos à descendência (AHAMED et al., 2019).

Os efeitos estocásticos podem se manifestar ao longo da vida do indivíduo, não necessariamente imediatamente após a exposição.

4.3. Nanopartículas

Desde o surgimento dos primeiros estudos voltados ao desenvolvimento de nanotecnologias, uma infinidade de materiais com características e aplicações já bem definidas até então, voltaram a ser objeto de estudo por apresentarem características diferentes em escala nanométrica possibilitando a criação de novas aplicações tecnológicas. Um bom exemplo, é o composto Fe_3O_4 (óxido de ferro II, III) que possui características magnéticas permanentes e é ferrimagnético, mas quando em escala nanométrica apresenta propriedade superparamagnética.

O termo nanotecnologia foi utilizado pela primeira vez numa conferência de engenharia em 1974, pelo professor Norio Taniguchi, que expôs seu trabalho sobre semicondutores por uso de práticas de deposição de filmes e feixes de energia com controle nanométrico das dimensões (SCHÄFER, 2017).

Hoje, a nanotecnologia é um novo campo de pesquisa, investigação e elaboração de materiais industriais com base na criação de estruturas moleculares que mostram avanços que prometem afetar muitas áreas da ciência e da tecnologia (CÂNDIDO et al., 2022).

São considerados nanomateriais os sistemas que possuem ao menos uma de suas dimensões espaciais entre 1 e 100 nm (SCHÄFER, 2017) e que apresentem suas propriedades físicas e químicas diferentes dos seus equivalentes com dimensões convencionais como consequência da sua dimensão nanométrica. Para sistemas considerados nano, características como reatividade (SACHIN et al., 2023), toxicidade, absorção/espalhamento de luz, magnetização de saturação (DUBEY, 2022), ponto de fusão, entre outras, são consideravelmente diferentes de porções maiores dos mesmos materiais “bulk”, tornando tais propriedades únicas, podendo ser determinadas pelo tamanho, estrutura superficial e interações entre as partículas.

A dimensão das partículas influenciará nas propriedades ópticas, magnéticas e catalíticas do nano material. Na área de catálise, constatou-se que a utilização de nanopartículas como um catalisador aumenta consideravelmente sua atividade catalítica. Esta atividade catalítica particular das nanopartículas pode ser atribuída em função de suas estruturas superficiais, pelos estados eletrônicos e pela grande área superficial que apresenta. (SACHIN et al., 2023)

O tamanho reduzido confere a essas partículas uma área superficial extraordinariamente alta em relação ao seu volume, intensificando sua reatividade química e suas interações com outras substâncias. A elevada razão área superficial/volume das nanopartículas, resultado da diminuição do tamanho de partícula, aumenta o percentual de átomos na superfície da mesma (TJONG; CHEN, 2004) (Tabela 7). Esses átomos da superfície estão mais propícios a interagir e participar dos processos físico-químicos.

Tabela 7 -Relação entre número de átomos e área superficial das nanopartículas

	Número Total de Átomos	Átomos na Superfície (%)
	13	92
	55	76
	147	63
	309	52
	561	45
	1415	35

Fonte: TJONG; CHEN (2004).

Estas nanopartículas, além de apresentarem propriedades magnéticas, mecânicas e térmicas, oferecem um alto potencial para diversas aplicações, tais como descontaminação ambiental, fluidos magnéticos, processos catalíticos, coloração de imagens, tintas magnéticas e agentes de contraste em ressonância magnética de imagem (DUBEY, 2022). Suas características magnéticas fazem das nanopartículas magnéticas um agente de contraste positivo, caso do gadolínio, ou negativo, caso das NP de óxido de ferro, com aplicações no diagnóstico por IRM de diversas patologias (SHESTOVSKAYA et al., 2023).

4.3.1. Nanopartículas de óxido de ferro superparamagnéticas (SPIONs).

O ferro (Fe) é um elemento químico de número atômico 26 e massa atômica 56 unidades massa atômica (SACHIN et al., 2023). Este metal de transição é encontrado no grupo 8 (VIII B) da tabela periódica. É o quarto elemento mais

abundante da crosta terrestre (AL-ABADLEH, 2015). Pode ser encontrado em minerais, como o óxido de ferro, nas suas formas de hematita (Fe_2O_3), maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) a magnetita (Fe_3O_4), goethita ($\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$) (CÂNDIDO et al., 2022).

O uso de óxido de ferro para síntese de nanopartículas superparamagnéticas têm sido extensivamente investigadas como novos agentes de contraste em IRM (SHESTOVSKAYA et al., 2023). O óxido de ferro tem características biocompatíveis (com uma toxicidade menor) mais interessantes que o gadolínio, uma vez que é encontrado de forma natural no nosso organismo, sendo eliminado pelo sistema de ferritina (DUBEY, 2022). Além disso, as SPIONs apresentam propriedades superparamagnéticas por conta do seu tamanho de proporções nano e biodegradabilidade, podendo ser recobertas com diversos polímeros (DEFU et al., 2020) e funcionalizadas para as mais diferentes aplicações.

As SPIONs têm sido estudadas como veículo de diagnóstico e tratamento para os mais variados tipos de câncer (FATHY et al., 2019). Em resumo, o óxido de ferro, especialmente na forma de nanopartículas superparamagnéticas, tem demonstrado grande potencial como agente de contraste em imagem por ressonância magnética devido a suas propriedades únicas em escala nanométrica. Sua biocompatibilidade, capacidade de funcionalização e efeitos no tempo de relaxação tornam as nanopartículas de óxido de ferro candidatas promissoras para aplicações teranósticas, permitindo não apenas o diagnóstico, mas também o tratamento direcionado de diversos tipos de câncer. Contudo, são necessários mais estudos *in vitro* e *in vivo* para investigar questões como estabilidade coloidal, distribuição sistêmica e efeitos adversos a longo prazo antes da efetiva translação das nanopartículas superparamagnéticas à base de óxido de ferro para a prática clínica.

4.3.2. Síntese de Nanopartículas de óxido de ferro superparamagnéticas

Com o avanço da nanociência a busca por novos materiais estimulou o desenvolvimento de novos métodos para síntese e caracterização de nanopartículas. Para (SCHÄFER, 2017), a obtenção de nanopartículas pode ocorrer através de métodos mecânicos denominados “top down” onde se manipula materiais

com dimensões “bulk”, não nanométricas, e através de processos físicos tenta-se chegar a dimensões menores, nanométricas. Já por métodos químicos, conhecidos por “bottom up”, são construções que ocorrem da escala nano através da nucleação de compostos químicos, com a formação de numerosos cristalitos iniciais, seguido de um processo de crescimento das partículas em direção à escala micro e macro. A Tabela 8 apresenta alguns processos de preparo de NPs e suas descrições. (ZOTTIS et al., 2015)

As formas de preparação das SPIONs (Tabela 8) envolvendo solução aquosa que mais se destacam são os métodos de solvotérmica, decomposição térmica (RIBEIRO, 2017) e coprecipitação (ZULKIFLI et al., 2018). A síntese por coprecipitação é a mais utilizada e simples, dentre as citadas, em função de possuir um elevado rendimento, relativo controle do tamanho, baixo custo e por ser menos agressiva ao meio ambiente, pois não utiliza solventes orgânicos (LIMA-TENÓRIO et al., 2015).

Tabela 8 - Métodos de preparação de nanopartículas

Métodos		Descrição
Mecânico	Moagem Mecânica	➤ Reduz o tamanho das partículas até a escala nanométrica utilizando moinhos.
	Filmes finos nanoestruturados	➤ Utiliza a técnica de pulverização catódica.
Químico	Microemulsão	➤ Sistema estável e translúcido de dois líquidos imiscíveis.
	Processo sol-gel	➤ Formação de uma suspensão (sol), através de policondensação que forma

uma matriz sólida (gel), logo após secagem.

Coprecipitação

- Materiais são dissolvidos em um solvente e precipitados pela adição de outro composto químico.

Fonte: adaptado SCHÄFER (2017)

O desenvolvimento da química coloidal teve um papel primordial no desenvolvimento da nanotecnologia sendo praticamente impossível estudar e desenvolver nanocomponentes sem um conhecimento mínimo dessa área. Tal área de estudo possibilitou desenvolver métodos de produção “bottom-up” de nanopartículas, tornando possível o controle de características físicas e químicas de materiais nanométricos permitindo a acessibilidade à sua superfície e possibilitando processos de estabilização (RIBEIRO et al., 2017).

Define-se como um coloide um sistema composto por ao menos duas fases, sendo uma contínua (dispersante) e uma ou mais fases descontínuas (partículas dispersas) que possuem pelo menos uma de suas dimensões entre 1 nm e 1 μ m, ou um sistema cujas descontinuidades encontram-se nessa faixa de tamanho (ZOTTIS, 2015). Os diferentes sistemas coloidais possíveis são atualmente classificados de acordo com a natureza das fases dispersa/dispersante envolvidas sendo apresentados na Tabela 9.

Tabela 9 - Sistemas coloidais classificados de acordo com a natureza das fases dispersa/dispersante

Coloides de Acordo com seus Constituintes	Fase Dispersa (descontínua)		
	GÁS	LÍQUIDO	SÓLIDO
GÁS	-	Aerossol Líquido	Aerossol Sólido
Fase Dispersante (contínua)	LÍQUIDO	Espuma	Sol
	SÓLIDO	Espuma Sólida	Gel
			Sol Sólido

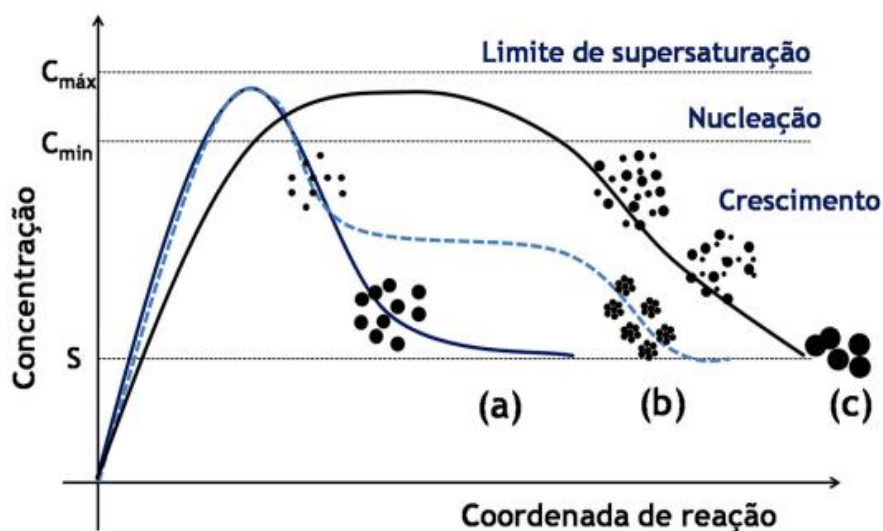
Fonte: SOUSA FILHO (2015)

No que tange à síntese de nanopartículas inorgânicas, sistemas coloidais consistem em uma fase sólida, obtida por uma reação de precipitação, suspensa em uma fase contínua líquida, apresentando alto grau de dispersão das partículas e baixa taxa de aglomeração e sedimentação (SOUSA FILHO, 2015). Durante a síntese coloidal de nanopartículas, há dois processos, que ocorrem de maneira praticamente simultânea, a serem considerados: a nucleação que é a formação de numerosos cristalitos iniciais, em equilíbrio instável com o líquido e o crescimento das partículas (ABIDIN et al., 2019; SOUSA FILHO, 2015).

A primeira teoria a tratar da influência de tais processos na obtenção de suspensões coloidais é o modelo de La Mer, atualmente, sabe-se que tal modelo é muito particular a esses sistemas e não se aplica diretamente à maioria dos coloides. (SOUSA FILHO, 2015). Todavia, por sua ideia central de separação temporal entre nucleação e crescimento, o modelo serve de base para a elaboração de outros modelos bem como para o desenvolvimento de várias metodologias para a obtenção de coloides monodispersos.

No modelo de La Mer considera-se que a etapa de nucleação é rápida e de curta duração. Já o processo de Ocaña também se considera a ocorrência de um processo rápido de nucleação com a geração das partículas finais ocorrendo através da agregação dos germes iniciais e das partículas menores. (Figura 2)

Figura 2 - Ilustração de mecanismos de precipitações coloidais que levam a partículas monodispersas: (a) modelo de La Mer, (b) modelo de Ocaña e (c) modelo de Sugimoto



Fonte: SOUSA FILHO (2015)

Para o modelo de Sugimoto assume-se uma etapa muito lenta de nucleação, levando à formação de germes polidispersos. O crescimento é, então, explicado pela coalescência limitada por difusão dos germes menores (mais instáveis) em favor do aumento das partículas maiores, através do processo de Ostwald ripening (“maturação de Ostwald”) (SOUSA FILHO, 2015). O processo de Ostwald ripening consiste em um fenômeno em que partículas pequenas em suspensão tendem a se redissolver e depositar sua massa em partículas maiores, minimizando a área interfacial para que se atinja um sistema de maior estabilidade termodinâmica.

Para se obter uma baixa polidispersidade de partículas, os núcleos de todas as espécies devem ser formados simultaneamente, sem haver a nucleação posterior de partículas menores. Além disso, para a obtenção de nanopartículas homogeneamente dispersas, o processo de nucleação deve ser rápido, enquanto o de crescimento deve ser lento. (ZOTTIS, 2015)

Uma reação de precipitação sem controle das etapas de nucleação e crescimento leva a um precipitado formado pela aglomeração não controlada das partículas. O que vai diferenciar uma precipitação comum de uma precipitação

coloidal (de micro ou nanopartículas bem dispersas) é uma etapa adicional de estabilização de superfície, de modo a se evitar seu crescimento posterior e sua agregação em suspensão. (RIBEIRO, 2017).

Como já mencionado, a técnica de coprecipitação é uma das mais simples e eficientes para obtenção de nanopartículas de óxido de ferro. A obtenção de partículas de Fe_3O_4 envolve uma mistura aquosa de hidrato de sais férricos, como $\text{FeCl}_3 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ou $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ e ferrosos, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ou $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ou $\text{Fe}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ em solução ácida em meio aquoso e se inicia com a adição de uma base, podendo ser NaOH , KOH ou ainda NH_4OH para o pH da solução ficar entre 8 e 14 com uma relação molar recomendada entre Fe^{3+} e Fe^{2+} de 2:1 (SOUSA FILHO, 2015). Para o recobrimento, a técnica utilizada dependerá do material recobridor. Geralmente uma solução contendo certa concentração molar do material recobridor dissolvido em solução é adicionado aos poucos na reação anterior contendo a solução ácida de Fe bivalente e a base. A variação da razão molar, entre as duas espécies de Fe^{3+} , bem como, o tempo de reação, temperatura, pH são parâmetros que estão diretamente relacionadas ao controle do tamanho do core, da monodispersividade, das NPs, diâmetro hidrodinâmico, formato, espessura de recobrimento entre outras características (ZOTTIS, 2015). Após a reação de recobrimento as NPs passam por processos, como lavagem, centrifugação e liofilização para realização das análises subsequentes e para análise físico-química (SCHÄFER, 2017).

Atualmente, NPs podem ser recobertas com uma grande variedade de materiais, cada qual com suas características e propriedades que dependerão do uso que será dado a elas.

4.3.3. Caracterização de Nanopartículas de óxido de ferro superparamagnéticas

Uma parte crucial na pesquisa com nanopartículas é sua caracterização, que comprova suas propriedades físico-químicas através de análises diversas, permitindo estimar o tamanho do núcleo, o tamanho hidrodinâmico, além de avaliar

a curva de histerese para determinar se foram adequadamente estabilizadas com polímero, e identificar seus grupos químicos, entre outros aspectos.

As análises de espectrometria no Infravermelho têm como princípio medir a absorção de radiação de diferentes comprimentos de onda da amostra estudada. Este método possibilita a variação contínua do comprimento de onda e a medição ao longo de toda região espectral dos ângulos nos quais ocorre a absorção para cada comprimento de onda, obtendo assim um espectro característico da amostra (KELLY, 2017). Esta análise é essencial para identificar os grupos químicos presentes no material de recobrimento, confirmando a estabilização das nanopartículas pelo polímero utilizado.

Com a Análise de Magnetização de Amostra Vibrante (VSM) é possível inferir sobre a histerese, que é a tendência de um material conservar suas propriedades magnéticas na ausência de um estímulo externo. A curva de histerese completa é uma espécie de resumo das propriedades magnéticas de um material ferromagnético ordenado (AMORIM, 2011). Verificar uma curva de histerese nula confirmaria o comportamento superparamagnético das amostras estudadas, uma característica de nanopartículas com núcleo de óxido de ferro, confirmando sua dimensão nanométrica (FRANCISQUINI et al., 2015).

O Microscópio Eletrônico de Transmissão (MET) utiliza um feixe de elétrons que interage com a amostra. A interação dos elétrons transmitidos através da amostra forma uma imagem que é ampliada e focada em um dispositivo de imagem (Cordeiro, 2015). Com sua resolução muito maior do que os microscópios ópticos, o MET permite a identificação da estrutura e morfologia para estimar o diâmetro dos núcleos das nanopartículas estudadas.

A técnica de Difração de Raios X é amplamente utilizada para determinação de fases cristalinas em materiais. Ela utiliza a difração gerada por um feixe de raio X que incide sobre a amostra (ALBERS, 2002). Esta análise complementa a técnica por MET para confirmar o diâmetro dos núcleos estudados.

A análise de Dispersão Dinâmica de Luz (DLS) permite estimar o tamanho total das nanopartículas em solução (aquosa ou orgânica) pelo diâmetro

hidrodinâmico (diâmetro do núcleo das nanopartículas mais o tamanho do recobrimento). Além disso, o potencial de carga efetiva (neutra, negativa e positiva) pode auxiliar na identificação das características do recobrimento e das condições de estabilização, como os polímeros e ligantes moleculares, e também permitir uma estimativa da espessura do recobrimento.

4.4. Radiossensibilidade Celular

O conceito de radiossensibilidade pode ser descrito como uma característica intrínseca, a qual é associada com o surgimento dos efeitos adversos da radiação ionizante sobre o corpo humano (REZAEI et al., 2019).

A radiossensibilidade celular, é um fenômeno fundamental no tratamento do câncer, e refere-se à suscetibilidade das células aos danos causados pela radiação ionizante (KIRAKLI et al., 2018). Esse processo complexo envolve uma intrincada rede de mecanismos moleculares e bioquímicos. Um dos principais mecanismos é a fragmentação do DNA, evento que pode levar a mutações genéticas e à morte celular. Além disso, a radiação também pode afetar a maquinaria celular, induzindo tanto a parada do ciclo celular quanto a apoptose, um programa de morte celular programado (LIMA, 2021).

Os trabalhos de Bergonié e Tribondeau sobre os efeitos biológicos das radiações ionizantes em tecidos representam um marco nos estudos da radiossensibilidade. Esses autores afirmaram que a sensibilidade é uma função do estado metabólico do tecido, além da diferenciação e proliferação das células que estão sendo irradiadas (ARENA, 1971 apud STELL, 1996). Este conceito tornou-se conhecido como a “Lei de Bergonié e Tribondeau”, e estabelece que a radiossensibilidade dos tecidos vivos pode variar em função de vários fatores. A taxa de proliferação celular é crucial, pois as células em divisão são mais sensíveis à radiação. A vascularização do tecido tumoral, a presença de oxigênio, ou a falta dele, é outro elemento vital: as células anaeróbicas são mais resistentes à radiação do que as células aeróbicas. A radiossensibilidade também está relacionada a diversas proteínas e vias de sinalização.

No entanto, a radiosensibilidade celular não é apenas uma questão de fragmentação de DNA e resposta a vias de sinalização específicas. Envolve também a geração de espécies EROs e radicais livres (AHAMED et al., 2019). A radiação ionizante pode induzir a formação excessiva de EROs no interior das células. As EROs e os radicais livres são moléculas altamente reativas contendo oxigênio ou nitrogênio, capazes de danificar uma variedade de componentes celulares, incluindo proteínas, lipídios e DNA (LIMA, 2021). Esse dano celular é particularmente significativo, pois as células tumorais frequentemente têm sistemas antioxidantes deficientes, tornando-as mais vulneráveis ao estresse oxidativo.

A compreensão detalhada desses processos moleculares é vital, não apenas para entender a radiosensibilidade celular, mas também para desenvolver estratégias terapêuticas inovadoras. A radiosensibilização, é um campo de pesquisa em rápido crescimento, envolvendo o uso de agentes que aumentam a resposta das células à radiação, como o uso de nanopartículas. Estas minúsculas estruturas, com dimensões na escala nanométrica, apresentam propriedades únicas que podem ser aproveitadas para aumentar a eficácia da radioterapia (FATHY et al., 2019).

Algumas nanopartículas têm a capacidade de criar EROs quando expostas à radiação ionizante (DUBEY, 2022). Ao introduzir nanopartículas durante a radioterapia, pode haver um aumento significativo na produção de EROs nas proximidades das células tumorais. Este aumento de EROs, leva a indução de estresse oxidativo e a ocorrência de danos ainda mais severos nas estruturas celulares, incluindo proteínas, lipídios e, principalmente, o DNA.

As células tratadas com nanopartículas respondem de maneira diferenciada ao dano causado pela radiação. Algumas nanopartículas, especialmente aquelas funcionalizadas com agentes específicos, podem inibir a ação de proteínas reparadoras do DNA. Como resultado, as células tumorais não conseguem reparar de forma eficiente o dano ao DNA induzido pela radiação, levando a um aumento na mortalidade celular. Além disso, as nanopartículas podem servir como transportadoras de fármacos (SHESTOVSKAYA et al., 2023), entregando agentes quimioterápicos diretamente às células tumorais. Esse

direcionamento específico aumenta a eficácia da quimioterapia, especialmente quando combinada com a radioterapia.

Compreender como as nanopartículas interagem com as células tumorais e como influenciam as respostas celulares à radiação é crucial. Estas investigações não apenas expandem o conhecimento fundamental sobre a radiosensibilidade celular, mas também abrem caminho para tratamentos mais eficazes e personalizados. O uso estratégico de nanopartículas como radiosensibilizadores oferece uma nova esperança para pacientes que enfrentam essa doença desafiadora, representando um avanço significativo na luta contra o câncer.

4.4.1. Nanopartículas de óxido de ferro como radiosensibilizadores.

O uso de nanopartículas metálicas como radiosensibilizadores tem emergido como uma estratégia promissora para potencializar a eficácia da radioterapia no tratamento do câncer. Diversos estudos têm demonstrado o potencial de nanopartículas de ouro, prata, platina e óxidos metálicos em aumentar a formação de EROs e a indução de dano ao DNA quando células tumorais são irradiadas na presença dessas nanopartículas (CHEN et al., 2020; GONG et al., 2021).

As nanopartículas possuem propriedades físicas e químicas que as tornam agentes de radiosensibilização atraentes. Elas têm uma elevada área de superfície em relação ao seu volume, o que maximiza interações com biomoléculas. Além disso, suas dimensões nanométricas facilitam a internalização celular. Dentro das células, as SPIONs interagem com a radiação ionizante, amplificando a produção de radicais livres e EROs, o que causa danos exacerbados no DNA e organelas celulares (DUBEY et al., 2022).

Dentre os diversos tipos de nanopartículas estudadas, aquelas à base de óxido de ferro têm demonstrado resultados promissores como agentes radiosensibilizantes. As SPIONs possuem propriedades únicas que as tornam adequadas para esta aplicação (KIRAKLI, 2018). Elas são biocompatíveis e biodegradáveis, o que minimiza sua toxicidade. Elas podem ser funcionalizadas com diferentes revestimentos para aumentar sua estabilidade e direcionamento tumoral.

Além disso, estudos mostraram que SPIONs recobertas com sílica podem aumentar significativamente a eficácia da radioterapia em diversas linhagens de câncer (FATHY et al., 2019).

5. METODOLOGIA

5.1. Nanopartículas

As nanopartículas de óxido de ferro revestidas com copoliéster de caprolactona modificada por cisteína, foram produzidas em colaboração com o grupo de pesquisa NANOTEC no Laboratório de Química Orgânica do Instituto Federal de Santa Catarina (IFSC) - Campus Florianópolis (BELTRAME, 2022) e gentilmente cedidas para a execução deste trabalho.

O método de produção utilizado por Beltrame envolveu algumas etapas enumeradas abaixo:

1. Síntese Enzimática do Copolímero:

➤ Polimerização Enzimática por Abertura de Anel (e-ROP):

- Foi realizada a síntese de poli(globalida-co- ϵ -caprolactona) (PGICL) usando os monômeros globalida (GI) e ϵ -caprolactona (CL).
- A polimerização ocorreu em tolueno como solvente, com uma razão de comonômero GI/CL de 50/50, catalisada por enzimas.

2. Modificação do Polímero:

➤ Reação Tiol-Ene:

- O copolímero PGICL foi modificado com cisteína (Cys) para obter PGICLCys e com N-acetilcisteína (NAC) para obter PGICLNAC.
- A modificação envolveu uma fotoreação tiol-eno entre a insaturação do monômero de GI e o grupo tiol (S-H) das moléculas de NAC e Cys, resultando em copolímeros mais hidrofílicos e menos cristalinos.

3. Caracterização dos Copolímeros Modificados:

- Os copolímeros modificados PGICLCys e PGICLNAC foram caracterizados utilizando técnicas de espectrometria,

calorimetria e espectroscopia para avaliar o grau de funcionalização e outras propriedades físico-químicas.

4. Produção de Scaffolds:

➤ Eletrofiação (Electrospinning):

- Usando o PGICLNAC, foram produzidos scaffolds pela técnica de eletrofiação.
- Esses scaffolds foram avaliados quanto à cristalinidade e hidrofiliicidade, e foram realizados ensaios de citotoxicidade biológica e clonogênica para testar a biocompatibilidade das membranas produzidas.

5. Estabilização de Nanopartículas Magnéticas (SPIONs):

➤ Coprecipitação:

- As nanopartículas magnéticas de óxido de ferro (SPIONs) foram estabilizadas usando o polímero modificado com cisteína (PGICLCys).
- As SPIONs foram caracterizadas quanto à morfologia, diâmetro, potencial de superfície, diâmetro hidrodinâmico e magnetismo.
- A superfície das SPIONs foi modificada quimicamente usando a reação de carbodiimida para incorporação de biomoléculas, seguida por ensaios de citotoxicidade e testes de liberação de biomoléculas.

A escolha do recobrimento com copoliéster de caprolactona modificado por cisteína para as nanopartículas de óxido de ferro foi baseada em várias razões importantes. Primeiramente, a modificação dos copolímeros com cisteína (Cys) e N-acetilcisteína (NAC) aumenta a hidrofiliicidade dos polímeros. Isso é crucial para aplicações biomédicas, pois materiais mais hidrofílicos tendem a ser mais compatíveis com o corpo humano e menos propensos a causar reações indesejadas.

Além disso, a cisteína e a N-acetilcisteína têm propriedades biológicas benéficas, como a capacidade de atuar como antioxidantes e promover a adesão celular.

A técnica usada para modificar o poli(globalida-co- ϵ -caprolactona) (PGICL) com NAC e Cys, conhecida como reação tiol-eno, resulta em um copolímero amorfo. Isso significa que o material se torna menos cristalino, o que é desejável porque aumenta a flexibilidade e a capacidade de processamento do material, além de acelerar sua degradação no corpo. Essas características são particularmente importantes para materiais usados temporariamente, como os scaffolds de regeneração tecidual.

Outro benefício significativo é que os grupos tiol (S-H) presentes nas moléculas de cisteína e N-acetilcisteína facilitam a modificação química das nanopartículas. Isso permite que as nanopartículas sejam personalizadas para aplicações específicas, como a entrega direcionada de medicamentos ou a imobilização de enzimas. O recobrimento com PGICLCys também garante que as nanopartículas magnéticas de óxido de ferro (SPIONs) permaneçam estáveis na forma de suspensão coloidal. Manter a dispersão uniforme das nanopartículas em meios biológicos é crucial para sua funcionalidade e eficiência.

Além disso, a modificação da superfície das SPIONs com cisteína permite a incorporação e a liberação controlada de medicamentos. Isso é especialmente vantajoso em terapias direcionadas, onde a liberação precisa de agentes terapêuticos pode maximizar a eficácia do tratamento e minimizar os efeitos colaterais. Por todas essas razões, a escolha do recobrimento com copoliéster de caprolactona modificado por cisteína se mostrou altamente vantajosa, destacando-se pela biocompatibilidade, funcionalidade, estabilidade e seu grande potencial para aplicações em nanomedicina e engenharia de tecidos.

5.2. Cultivo celular

As linhagens celulares HRT-18 (câncer colorretal) e HepG2 (carcinoma hepatocelular) foram adquiridas do banco de células do Rio de Janeiro.

As linhagens foram cultivadas em meio RPMI 1640 suplementado com soro fetal bovino (10%), solução de penicilina-streptomicina (100 U/mL; 100 mg/mL-1 %), bicarbonato de sódio, Hepes e glutamina (2 mM), em estufa a temperatura de 37°C e atmosfera contendo 5% de CO₂ e 95% de umidade.

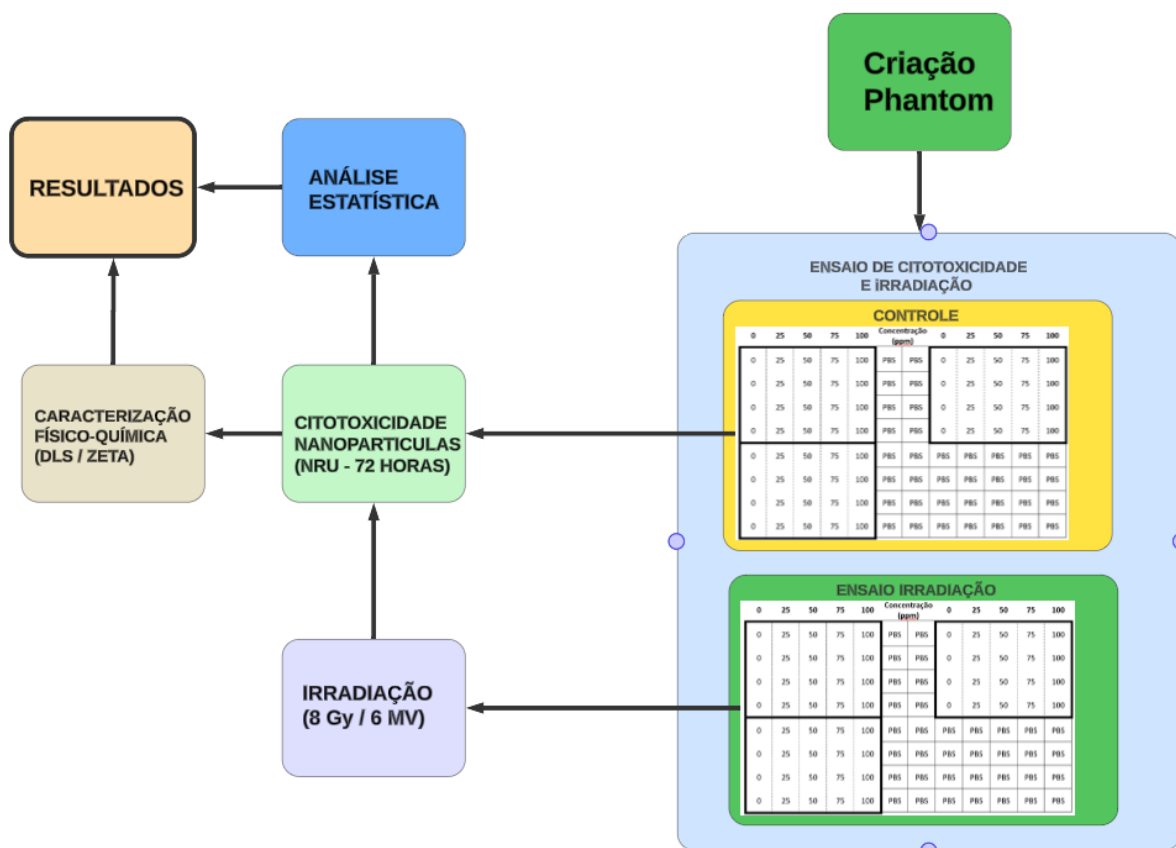
Tanto o cultivo celular, quanto os experimentos envolvendo o mesmo, foram realizados no Laboratório de Fisiologia e Sinalização Celular (FisiCel), localizado no Departamento de Análises Clínicas da Universidade Federal do Paraná.

5.3. Etapas Da Pesquisa

O desenvolvimento do estudo foi realizado de acordo com as seguintes etapas e pode ser visualizado de forma geral no fluxograma da Figura 3.

- Criação de Phantom;
- Ensaio de Irradiação;
- Ensaio de citotoxicidade (NRU) - Radiossensibilização;
- Caracterização físico-química das nanopartículas;
- Análise Estatística;
- Resultados.

Figura 3 - Fluxograma da pesquisa



Fonte: Do Autor (2023).

5.3.1. Criação e Testes de Phantom

A construção do phantom foi essencial para verificar e avaliar as interações das radiações ionizantes com as células. Essas interações podem criar heterogeneidades significativas, comprometendo a precisão no cálculo da dose. Tal incerteza interfere na distribuição da dose, especialmente em áreas com espaços de ar, como nas reentrâncias das placas de cultivo celular (Figura 4). Os espaços de ar formam interfaces entre materiais de diferentes densidades, resultando em um aumento nas doses secundárias devido ao espalhamento Compton, que é a principal interação nesse contexto..

Figura 4 - Reentrâncias das placas de cultivo celular.



Fonte: Do Autor (2023).

Para minimizar a presença de ar nos espaços entre os poços da placa, que estava interferindo na distribuição da dose de irradiação, esses espaços foram preenchidos. Esse processo foi realizado em uma cabine de segurança biológica para evitar contaminação dos poços.

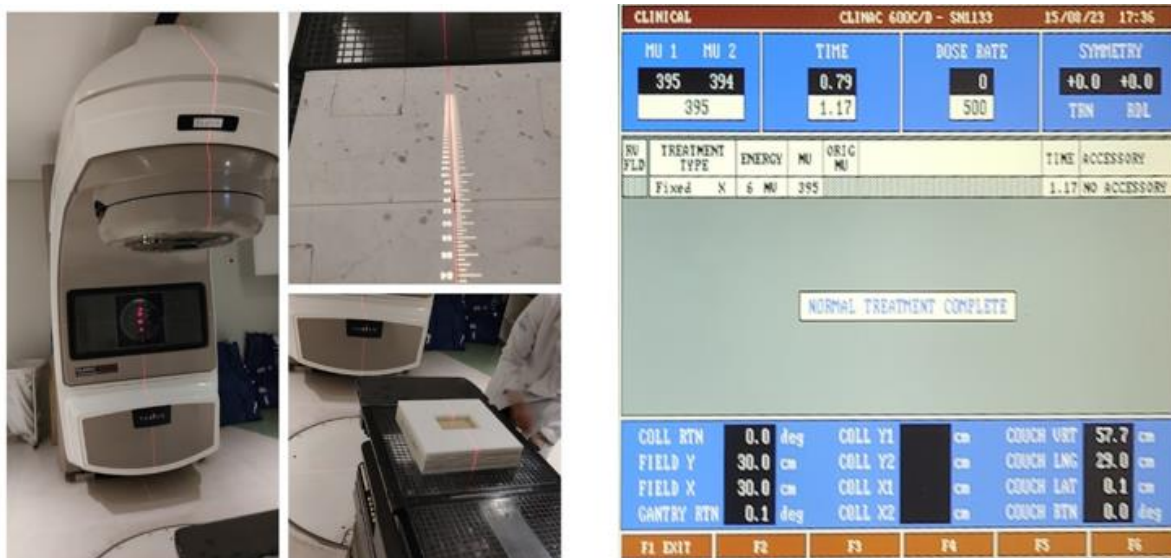
5.3.2. Ensaio de Irradiação e de citotoxicidade celular

A avaliação da viabilidade celular foi verificada pela execução do método do NRU (Neutral Red Uptake), de acordo com metodologia proposta por Gonçalves e Sobral, 2020, com modificações.

Células HRT-18 e HepG2 foram semeadas na densidade celular de 5000 células por poço em placas de 96 poços previamente preenchidas com resina e incubadas em estufa pelo período de 24 h para a ocorrência de adesão celular. Transcorrido esse intervalo de tempo, cada linhagem celular foi exposta a diferentes concentrações de nanopartículas (0, 25, 50, 75, 100 ppm), diluídas em meio de cultivo e obtidas a partir de uma solução mãe de 2000 ppm, preparada pela suspensão das nanopartículas em PBS. Dessa forma, como controle foi utilizado meio de cultivo contendo PBS (5%).

Após as incubações das nanopartículas, as placas foram irradiadas, sendo este procedimento realizado no Hospital Erasto Gaertner. Cada phantom foi exposto a um feixe de fótons de 6,0 MV proveniente de um acelerador linear (CLINAC 600 CD) e dose de 8 Gy. Durante a irradiação, cada placa de cultivo foi posicionada a uma distância de 94 cm da fonte do feixe de fótons, em um campo de exposição de 30 x 30 cm e uma taxa de dose de 500 cGy/min. **(Erro! Fonte de referência não encontrada.)**

Figura 5 - Posicionamento e parâmetros de Irradiação das amostras



Fonte: Do Autor (2023).

Os valores de dose, energia e taxa de dose foram criteriosamente selecionados para potencializar os possíveis efeitos de radiosensibilização. A energia empregada é a mesma utilizada na maioria dos tratamentos clínicos que fazem uso de raios X de alta energia, representando uma condição realista e translacional. Energias superiores não seriam representativas dos procedimentos terapêuticos convencionais. Por outro lado, doses mais elevadas poderiam mascarar efeitos sutis de radiosensibilização promovidos pelas nanopartículas, visto que doses muito altas tendem a reduzir drasticamente a viabilidade celular por si só. Os parâmetros escolhidos visaram maximizar a capacidade de detecção de eventuais efeitos radiosensibilizadores conferidos pelos nanomateriais, preservando a relevância clínica dos ensaios realizados.

Após a irradiação, as placas foram novamente incubadas em estufa por 72 horas. Cabe salientar que, para cada placa irradiada, uma permaneceu incubada na estufa sem ser submetida a tal processo, para atuar dessa forma, como controle do processo de irradiação.

Após as 72h de incubação, as placas foram retiradas da estufa, e o meio contendo as nanopartículas ou veículo foi descartado. A seguir, os poços foram lavados 2 vezes com 200 µl de PBS e adicionado aos mesmos, 100 µl da solução de NRU (40 µg/mL). Posteriormente, as placas foram incubadas em estufa pelo período de 2 h, quando a solução de NRU foi retirada e os poços novamente lavados 2 vezes com 200 µl de PBS. Foram acrescentados 100 µl de solução reveladora (50% de etanol 96%, 49% de água deionizada e 1% de ácido acético glacial) em cada um dos poços da placa, sendo está colocada em um agitador por 10 min. O conteúdo presente em cada um dos poços foi transferido para uma nova placa de 96 poços, sendo realizada a leitura dos mesmos em absorbância de 540 nM em espectrofotômetro de placa.

O percentual de viabilidade celular dos tratamentos foi determinado pela seguinte fórmula (equação 1):

$$ViabilidadeCelular = \frac{Absorbância do tratamento(Xppm)}{Absorbância controle(0ppm)} \times 100 \quad (1)$$

5.3.3. Caracterização Físico-Química das SPIONs

A caracterização das nanopartículas de óxido de ferro revestidas com caprolactona modificada por cisteína foram avaliadas por meio da determinação do Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS) e do Potencial Zeta.

As medidas de diâmetro hidrodinâmico e carga superficial foram realizadas em um analisador Zetasizer 3000HSA Malvern do LaCBIO do Departamento de Química da UFSC, equipado com laser He/Ne de comprimento de onda de 633 nm.

As amostras em pó foram dispersas em solução tampão (PBS), filtradas usando filtro de 400 nm nas concentrações finais de 2mg/mL e 0,5mg/mL, mantidos por 10 min em banho ultrassom. Todas análises foram realizadas em triplicata e concomitantemente foram obtidas o valor do diâmetro hidrodinâmico e do potencial zeta das nanopartículas.

5.3.4 Análise Estatística

A análise estatística foi expressa em função da média e desvio padrão relacionados aos valores de viabilidade celular, calculados através dos resultados de absorbância obtidos por meio de ensaio de NRU.

Os dados em triplicata foram analisados quanto a sua normalidade de distribuição pelo método de Shapiro-Wilk. Após a confirmação do tipo de distribuição dos dados, as médias das triplicatas foram tabeladas e a significância estatística das diferenças entre as médias foi determinado através do teste One-way ANOVA. Valores de $p < 5$ (*), $p < 0,01$ (**) e $p < 0,001$ (***) foram considerados significativos. O GraphPad O software Prism 10 foi utilizado para análise estatística.

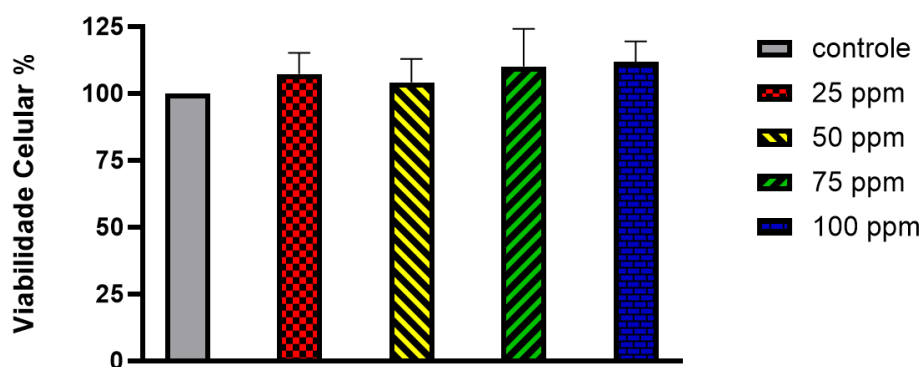
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1. Ensaios Biológicos de Citotoxicidade.

O efeito radiosensibilizador das nanopartículas foi avaliado mediante a análise do impacto causada pelas mesmas na viabilidade de células HRT-18 e HepG2, após a exposição à radiação. Tal viabilidade foi determinada por meio dos valores de absorbância obtidos nos ensaios de NRU, sendo os resultados demonstrados abaixo.

As Figuras 6 e 7 mostram que as nanopartículas, em nenhuma das concentrações testadas, foram capazes de induzir citotoxicidade em nenhuma das linhagens celulares avaliadas, sugerindo que nestas concentrações, as nanopartículas foram inertes para as células tumorais e que poderiam necessitar de radiação para serem ativadas e promoverem algum efeito deletério. Nesse sentido, Beltrame e colaboradores (2022), apresentam resultados semelhantes, com células fibroblásticas (L929) e células de carcinoma da mama (MDA-MB 231), mostrando, através de ensaio de MTT, que para estas linhagens, as nanopartículas de óxido de ferro recobertas por copoliéster caprolactona modificada por cisteína, também não apresentam citotoxicidade.

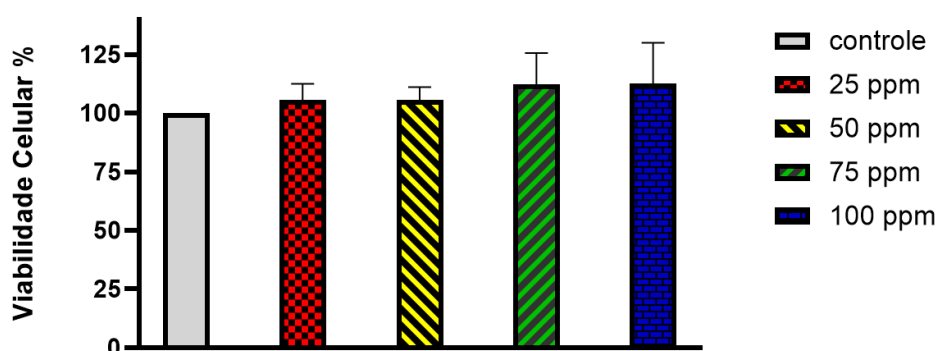
Figura 6 - Efeito das nanopartículas sobre a viabilidade celular da linhagem HepG2 não irradiada



Fonte: Do Autor (2024).

Legenda: Gráfico comparativo do efeito de radiosensibilização induzida pelas nanopartículas nas concentrações de 25, 50, 75 e 100 ppm em relação a amostra controle (0 ppm) sobre as células HRT-18 não irradiadas. Os valores, de $p = 0,5350$ e de $R^2 = 0,2496$, indicam que não existe diferença estatística entre as condições avaliadas. .

Figura 7 - Efeito das nanopartículas sobre a viabilidade celular da linhagem HRT-18 não irradiada



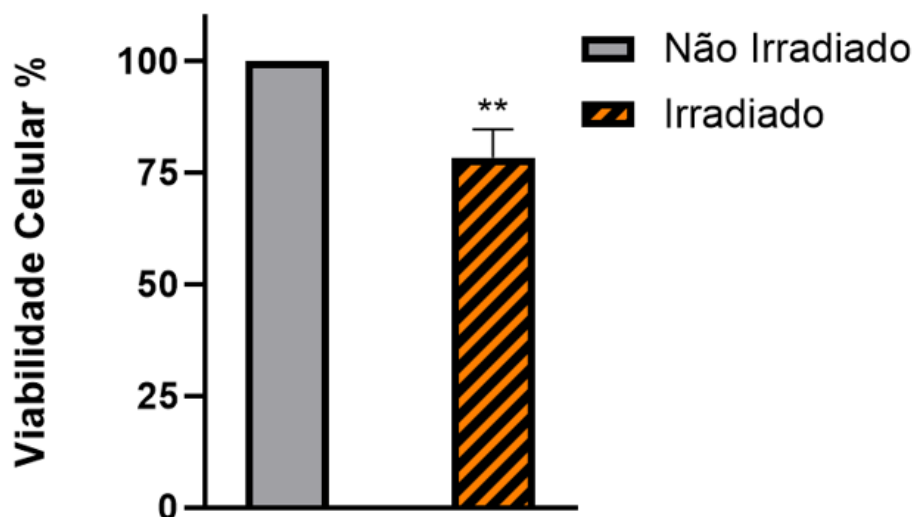
Fonte: Do Autor (2024).

Legenda: Gráfico comparativo do efeito de radiosensibilização induzida pelas nanopartículas nas concentrações de 25, 50, 75 e 100 ppm em relação a amostra controle (0 ppm) sobre as células HRT-18 não irradiadas. Os valores, de $p = 0,5750$ e de $R^2 = 0,2329$, indicam que não existe diferença estatística entre as condições avaliadas.

Em contextos clínicos de tratamento radioterápico, espera-se que as células tumorais irradiadas sofram uma redução na viabilidade devido aos efeitos nocivos da radiação ionizante (MARTINS, 2020). A fim de verificar a radiosensibilidade das linhagens celulares utilizadas, comparou-se a viabilidade celular das amostras controle (0 ppm) não irradiadas, com as amostras controle irradiadas (0 ppm).

As Figuras 8 e 9 mostram uma redução na viabilidade celular das amostras irradiadas em relação as células não irradiadas, demonstrando que as linhagens estudadas são radiosensíveis, independentemente da presença de nanopartículas.

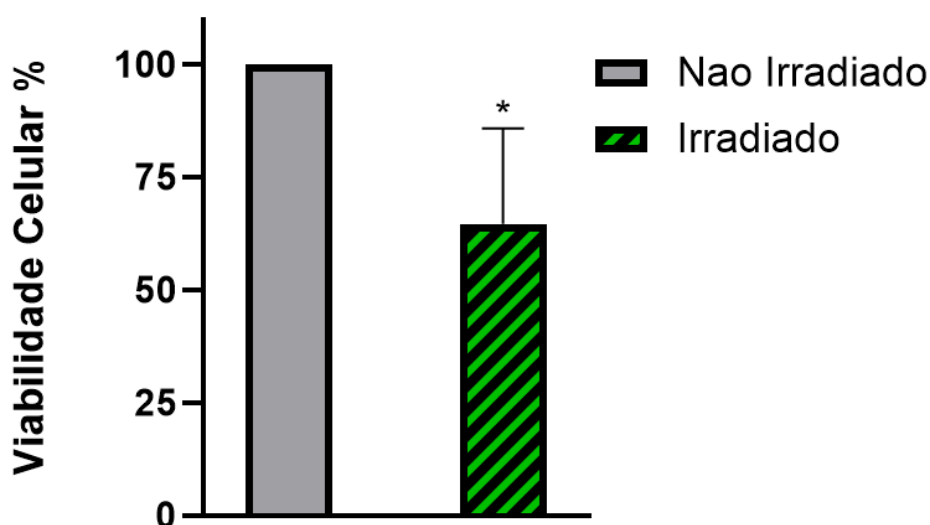
Figura 8 - Efeito da radiação ionizante sobre a viabilidade celular da linhagem HepG2 na amostra controle (0 ppm).



Fonte: Do Autor (2024).

Legenda: Gráfico comparativo do efeito de radiosensibilização, induzida pela radiação ionizante nas amostras controle (0 ppm) irradiadas em relação a amostra controle (0 ppm) não irradiadas nas células HepG2. Os resultados da análise de uma one-way ANOVA, revelaram um valor de p significativamente baixo, $p = 0,0041$ e um coeficiente R quadrado de 0,8978. Devido ao valor de p abaixo do nível de significância (0,05), os resultados são considerados estatisticamente significativos.

Figura 9- Efeito da radiação ionizante sobre a viabilidade celular da linhagem HRT-18 na amostra controle (0 ppm).

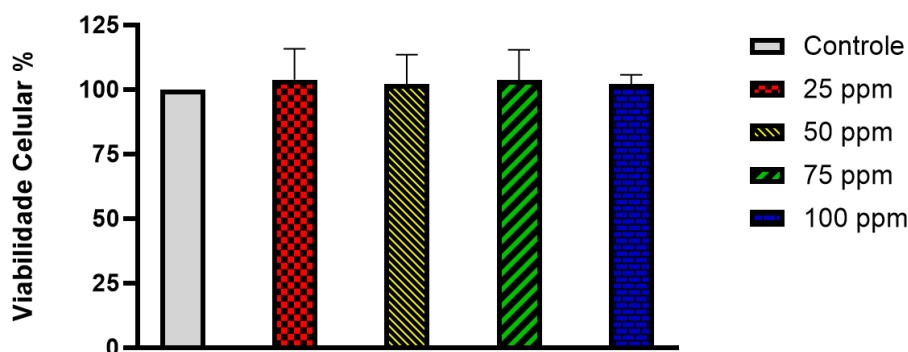


Fonte: Do Autor (2024).

Legenda: Gráfico comparativo do efeito de radiosensibilização, induzida pela radiação ionizante nas amostras controle (0 ppm) irradiadas em relação a amostra controle (0 ppm) não irradiadas nas células HRT-18. Os resultados da análise de uma one-way ANOVA, revelaram um valor de p significativamente baixo, $p = 0,0447$ e um coeficiente R quadrado de 0,06758. Devido ao valor de p abaixo do nível de significância (0,05), os resultados são considerados estatisticamente significativos.

Como descrito anteriormente, conduziu-se o ensaio de NRU em células irradiadas e expostas a diversas concentrações de nanopartículas. Nesse sentido, surpreendentemente, observou-se uma elevação na viabilidade, sugerindo a ocorrência de indução de proliferação celular sem uma diminuição da viabilidade das linhagens celulares avaliadas (Figuras 10 e 11).

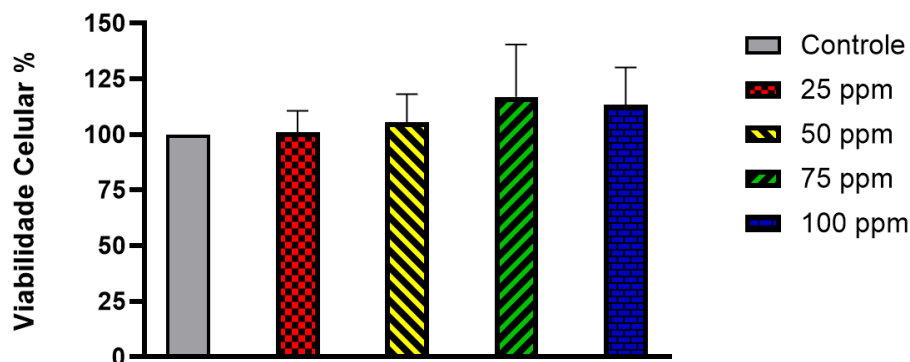
Figura 10 - Efeito das diferentes concentrações de nanopartículas sobre a viabilidade celular na linhagem HepG2 irradiada.



Fonte: Do Autor (2024).

Legenda: Gráfico comparativo do efeito de radiosensibilização, induzida pelas nanopartículas nas concentrações de 25, 50, 75 e 100 ppm em relação a amostra controle (0 ppm) sobre as células HepG2 irradiadas. Os valores, de $p = 0,9861$ e de $R^2 = 0,03181$, indicam que não existe diferença estatística entre as condições avaliadas.

Figura 11 - Efeito das diferentes concentrações de nanopartículas sobre a viabilidade celular na linhagem HRT-18 irradiada.



Fonte: Do Autor (2024).

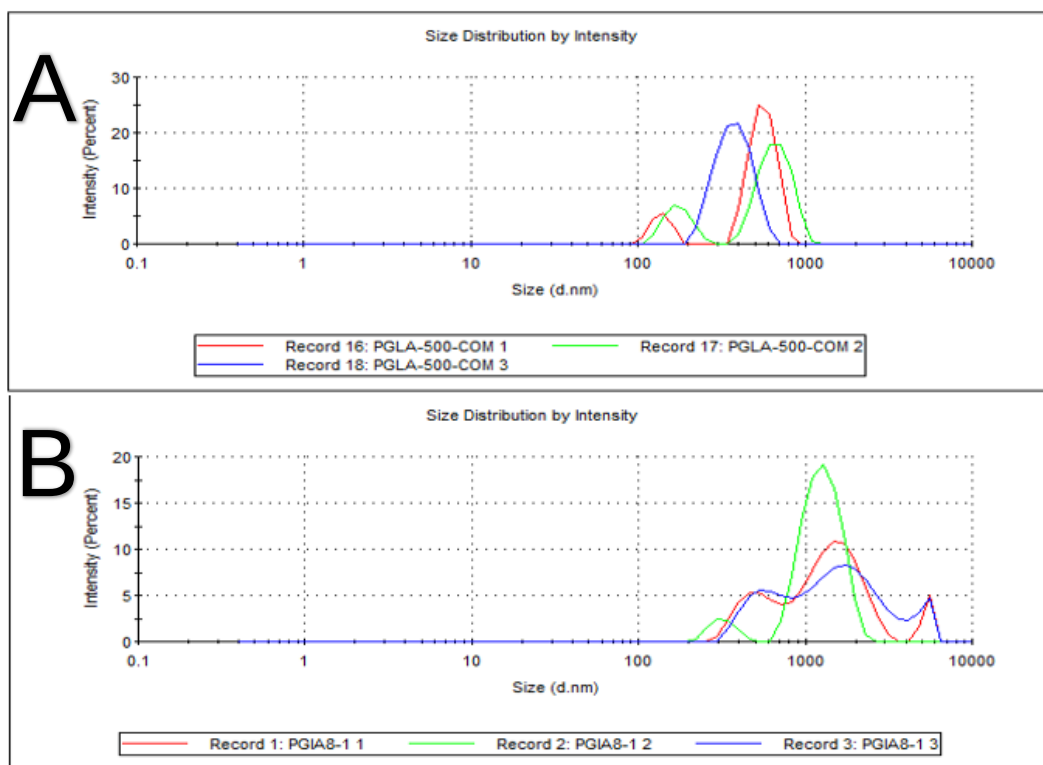
Legenda: Gráfico comparativo do efeito de radiosensibilização, induzida pelas nanopartículas nas concentrações de 25, 50, 75 e 100 ppm em relação a amostra controle (0 ppm) sobre as células HRT-18 irradiadas. Os valores, de $p = 0,5640$ e de $R^2 = 0,2374$, indicam que não existe diferença estatística entre as condições avaliadas. .

6.2. Caracterização Físico-Química

Para entender melhor os resultados de viabilidade celular e radiosensibilização obtidos com a realização deste estudo, bem como para compreender as propriedades dessas nanopartículas, foram realizados dois ensaios de caracterização: Dispersão Dinâmica de Luz (DLS) e Medição de Potencial Zeta.

No primeiro ensaio, utilizando uma concentração de 2mg/mL, observamos um tamanho médio de partícula em torno de 1464,34 nm (nanômetros) Figura 12B. No segundo teste, conduzido com uma concentração de 0,5mg/mL e após a filtração da solução por um filtro de 400 nm, a média das triplicatas ficou em 831,20 nm, Figura 12A. Essas dimensões, relativamente grandes, sugerem a presença de aglomerações ou conglomerados, o que pode ter um impacto significativo no comportamento das nanopartículas em meio as linhagens celulares estudadas, ou, ainda, tamanho hidrodinâmico fora das definições de nanopartículas.

Figura 12 - Resultado de ensaio de DLS das nanopartículas de óxido de ferro recobertas por copoliéster caprolactona modificada por cisteína na concentração de 2mg/mL (A) e 0,5 mg/mL (B)



Fonte: Do Autor (2023).

Além disso, analisamos o Potencial Zeta das amostras. No primeiro caso, o Potencial Zeta foi registrado como -19,4 mV, indicando uma carga superficial negativa nas partículas. No segundo caso, o Potencial Zeta foi de -21,24 mV, confirmando a estabilidade coloidal das nanopartículas em suas soluções.

6.3. Discussão

A análise dos ensaios de Citotoxicidade (NRU) revelou que 72 horas após a incubação das células com diferentes concentrações de nanopartículas e exposição a irradiação, não ocorreu uma redução significativa na viabilidade celular, evidenciando a ausência de radiosensibilização. Esse fenômeno inesperado indica

uma não interação entre as células e as nanopartículas, sugerindo resistência ou barreiras à sua internalização.

Este estudo baseou-se em uma ampla revisão de literatura que abordou diversas pesquisas com nanopartículas como radiosensibilizadores. Estes trabalhos, que utilizaram diferentes tipos de nanopartículas e métodos, apresentaram resultados positivos na radiosensibilização celular (Tabela 10).

Tabela 10 - Alguns estudos sobre efeitos de radiosensibilização de nanopartículas

Autor	Nano	Recobrimento	Radiossensibilidade
REZAEI et al. (2019)	Óxido de ferro	Dextrana	
FATHY et al. (2019)	Óxido de ferro	Sílica	
ABIDIN et al. (2019)	Óxido de bismuto	PEG	
TALIK et al. (2019)	Óxido de bismuto		

Fonte: Do Autor (2023).

Os valores de potencial zeta encontrados, estão de acordo com o que vem sendo verificado em outros estudos. A distribuição de carga negativa na superfície das nanopartículas é vital para evitar a aglomeração das partículas, garantindo sua dispersão homogênea nas amostras e, por conseguinte, sua interação eficaz com as células-alvo durante os ensaios de radiosensibilização. No entanto, se o tamanho hidrodinâmico for muito grande, a distribuição de cargas negativas na superfície das nanopartículas, pode não ser suficiente para uma distribuição homogeneia. Como mostrado, os valores de DLS, que nos dá o tamanho hidrodinâmico (núcleo + revestimento), estão muito fora se comparados com outras pesquisas. (Tabela 11Tabela 11).

Tabela 11 - Resultados de DLS e Potencial Zeta de alguns estudos pesquisado

Nano	DLS (nm)	Zeta (mV)	Autor
Óxido Ferro	18,17	-32	Fathy et al (2019)
	164,18	-41	
GNP@PEG1	27,2	-15,3	Guerra (2021)
GNP-naked	31,8	18,8	
Fe ₃ O ₄ @Pheo	90,75	-38,1	Zottis (2015)
Fe ₃ O ₄ @Cisteína	1464,34	-19,4	Autor
	831,20	-21,24	

Fonte: Do Autor (2023).

Dessa forma, sugere-se que a resistência aparente das linhagens celulares às nanopartículas pode ser atribuída, pelo menos em parte, às aglomerações presentes, limitando sua entrada eficaz nas células. Estes resultados desafiadores fornecem uma base sólida para investigações futuras, que podem se concentrar em estratégias para melhorar a dispersão das nanopartículas, reduzir aglomerações e, assim, aumentar sua eficácia como agentes de radiosensibilização. Esse aprofundamento é crucial para desbloquear o potencial total dessas tecnologias no contexto do tratamento do câncer.

7. CONCLUSÃO

Diante dos resultados obtidos neste estudo, é evidente que a interação entre nanopartículas de óxido de ferro revestidas com copoliéster caprolactona modificada por cisteína e as linhagens celulares HRT-18 (câncer colorretal) e HepG2 (carcinoma hepatocelular) não seguiu o padrão esperado de radiosensibilização. A ausência de impacto significativo na viabilidade celular, mesmo após exposição a diferentes concentrações das nanopartículas, levanta questionamentos profundos sobre os mecanismos de interação celular com as nanopartículas e características físico-químicas subjacentes a essa interação.

A presença de aglomerações nas nanopartículas, como indicado pelos resultados de DLS, parece ser um fator chave que limitou sua capacidade de penetração nas células-alvo. A falta de internalização das nanopartículas, que acarreta na ausência da geração de EROs, contribuiu para falta do efeito de radiosensibilização das amostras celulares.

7.1. Sugestões Para Trabalhos Futuros

- Otimização da dispersão nanopartícula. Investigar métodos para melhorar a dispersão das nanopartículas, reduzindo aglomerações e, conseqüentemente, permitindo sua internalização eficaz nas células tumorais.
- Técnicas de revestimento ou modificações na superfície das nanopartículas podem ser exploradas para melhorar sua compatibilidade com o ambiente celular.
- Avaliação de outros tipos de nanopartículas. Diferentes tipos de nanopartículas e revestimentos podem ser explorados para determinar se outras composições têm um impacto mais

significativo na radiosensibilização. Experimentos comparativos podem fornecer *insights* valiosos sobre as características ideais para essa aplicação.

- Avaliação *in vivo*. Estudos *in vivo* são essenciais para validar os resultados obtidos *in vitro*. Modelos de camundongos xenogênicos ou outras abordagens *in vivo* podem oferecer uma compreensão mais holística do comportamento das nanopartículas no ambiente tumoral.
- Realização de Análises Físico Químicas. É crucial realizar análises físico-químicas detalhadas das nanopartículas antes de sua aplicação nos ensaios biológicos. Estas análises fornecem uma base sólida, eliminando qualquer incerteza sobre as características intrínsecas das nanopartículas que poderiam influenciar drasticamente os resultados experimentais.

REFERÊNCIAS

BELTRAME, Jeovandro Maria et al. Modification of polyesters and nanomaterial production for biomedical applications. 2022.

Bin WANG, Jinlong Wei, Lingbin Meng, Huanhuan Wang, Chao Qu, Xiang Chen, Ying Xin, Xin Jiang, Advances in pathogenic mechanisms and management of radiation-induced fibrosis, *Biomedicine & Pharmacotherapy*, Volume 121, 2020, 109560, ISSN 0753-3322, <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.109560>.

BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer. Estimativa 2023 : incidência de câncer no Brasil. 160 p. : il. color.2. INCA, 2022.

BURKE, S. Faithfull, H. Probst, Radiation induced skin reactions during and following radiotherapy: A systematic review of interventions, *Radiography*, Volume 28, Issue 1, 2022, Pages 232-239, ISSN 1078-8174. <https://doi.org/10.1016/j.radi.2021.09.006>.

CÂNDIDO, M.A., Rost, N.C., Ferreira, V.R., & Raniero, L.J. (2022). Síntese de nanopartículas de óxido de ferro estabilizadas com citrato de sódio e TMAOH. *Research, Society and Development*.

CHEDID, Marcio F. et al. Carcinoma hepatocelular: diagnóstico e manejo cirúrgico. *ABCD. Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva (São Paulo)*, v. 30, p. 272-278, 2017.

DEFU Zhi, Ting Yang, Jian Yang, Shuang Fu, Shubiao Zhang, Targeting strategies for superparamagnetic iron oxide nanoparticles in cancer therapy, *Acta Biomaterialia*, Volume 102, 2020, Pages 13-34, ISSN 1742-7061, <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2019.11.027>.

DOS SANTOS, Lucas Luan et al. EFEITOS BIOLÓGICOS DA RADIAÇÃO IONIZANTE NAS CÉLULAS. *Revista Atenas Higeia*, v. 4, n. 1, 2022.

DUBEY, P.; Sertorio, M.; Takiar, V. Therapeutic Advancements in Metal and Metal Oxide Nanoparticle-Based Radiosensitization for Head and Neck Cancer Therapy. *Cancers* **2022**, *14*, 514. <https://doi.org/10.3390/cancers14030514>

ELDER, David E. et al. The 2018 World Health Organization classification of cutaneous, mucosal, and uveal melanoma: detailed analysis of 9 distinct subtypes defined by their evolutionary pathway. *Archives of pathology & laboratory medicine*, v. 144, n. 4, p. 500-522, 2020.

FATHY, Mohamed M. et al. Silica-coated iron oxide nanoparticles as a novel nano-radiosensitizer for electron therapy. *Life sciences*, v. 234, p. 116756, 2019.

Fontham, ETH, Wolf, AMD, Church, TR, et al. Cervical Cancer Screening for Individuals at Average Risk: 2020 Guideline Update from the American Cancer Society. *CA Cancer J Clin*. 2020. <https://doi.org/10.3322/caac.21628>.

GANESAN, Previn; KULIK, Laura M. Hepatocellular carcinoma: new developments. **Clinics in liver disease**, v. 27, n. 1, p. 85-102, 2023.

GIAQUINTO, Angela N. et al. Breast cancer statistics, 2022. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 72, n. 6, p. 524-541, 2022.

GONÇALVES, Juan Carlos Ramos; SOBRAL, Marianna Vieira. Cultivo de células, da teoria à bancada. **Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa. EDITORA UFPB**, 2020.

Guerra, D. B. (2021). Nanoparticles for radiation therapy enhancement: Investigation of radiosensitization induced by gold and iron oxide nanoparticles in glioblastoma cells exposed to photon and proton beams.

HALL, E. J. (2022). **Radiobiology for the radiologist (8th ed.)**. Philadelphia, PA: Wolters Kluwer.

ILLES, E.; TOMBACZ, E. The effect of humic acid adsorption on pHdependent surface charging and aggregation of magnetite nanoparticles. **J Colloid Interface Sci**, v. 295, n. 1, p. 115-23, Mar 1 2006.

KABAKOV, Alexander E.; YAKIMOVA, Anna O. Hypoxia-induced cancer cell responses driving radioresistance of hypoxic tumors: Approaches to targeting and radiosensitizing. **Cancers**, v. 13, n. 5, p. 1102, 2021.

KIM, Jong Yeob et al. Environmental risk factors and biomarkers for autism spectrum disorder: an umbrella review of the evidence. **The Lancet Psychiatry**, v. 6, n. 7, p. 590-600, 2019.

KUMAR, Vinay. **Robbins & cotran-patologia bases patológicas das doenças 8a edição**. Elsevier Brasil, 2010.

LIMA, Francisco Ficardo de Souza. Proteção radiológica na radioterapia. 2021.

LINEHAN, W.M., Ricketts, C.J. The Cancer Genome Atlas of renal cell carcinoma: findings and clinical implications. *Nat Rev Urol* **16**, 539–552 (2019). <https://doi.org/10.1038/s41585-019-0211-5>

Liu, Y-P, Zheng, C-C, Huang, Y-N, Xu, WW, Li, B. Molecular mechanisms of chemo- and radiotherapy resistance and the potential implications for cancer treatment. *MedComm*. 2021; 2: 315–340. <https://doi.org/10.1002/mco2.55>

Liuyun Gong, Yujie Zhang, Chengcheng Liu, Mingzhen Zhang & Suxia Han (2021) Application of Radiosensitizers in Cancer Radiotherapy, *International Journal of Nanomedicine*, 16:, 1083-1102, DOI: [10.2147/IJN.S290438](https://doi.org/10.2147/IJN.S290438)

NASSIF, T.M., Brunelle, C.L., Gillespie, T.C. et al. Breast Cancer-Related Lymphedema: a Review of Risk Factors, Radiation Therapy Contribution, and Management Strategies. *Curr Breast Cancer Rep* **12**, 305–316 (2020). <https://doi.org/10.1007/s12609-020-00387-8>

PAVLOPOULOU, Athanasia et al. Molecular determinants of radiosensitivity in normal and tumor tissue: A bioinformatic approach. **Cancer letters**, v. 403, p. 37-47, 2017.

PECORINO, Lauren. **Molecular biology of cancer: mechanisms, targets, and therapeutics**. Oxford university press, 2021.

SACHIN T. Yerpude, Ajay K. Potbhare, Pavan Bhilkar, Alok R. Rai, Raghvendra P. Singh, Ahmed A. Abdala, Rameshwar Adhikari, Rohit Sharma, Ratiram G. Chaudhary, Biomedical, clinical and environmental applications of platinum-based nanohybrids: An updated review, *Environmental Research*, Volume 231, Part 2, 2023, 116148, , <https://doi.org/10.1016/j.envres.2023.116148>.

Santos, J.B., Sacramento, S.A., & Errante, P.R. (2018). ABORDAGENS TERAPÊUTICAS DO MELANOMA CUTÂNEO E METASTÁTICO. *UNILUS Ensino e Pesquisa*, 14, 200-214.

SHESTOVSKAYA, M.V.; Luss, A.L.; Bezborodova, O.A.; Makarov, V.V.; Keskinov, A.A. Iron Oxide Nanoparticles in Cancer Treatment: Cell Responses and the Potency to Improve Radiosensitivity. *Pharmaceutics* **2023**, 15, 2406. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15102406>

SIEGEL, Rebecca L. et al. Cancer statistics, 2023. **Ca Cancer J Clin**, v. 73, n. 1, p. 17-48, 2023.

Siegel, RL, Miller, KD, Fuchs, HE, Jemal, A. Cancer statistics, 2022. *CA Cancer J Clin*. 2022. <https://doi.org/10.3322/caac.21708>

SIES, H., Belousov, V.V., Chandel, N.S. et al. Defining roles of specific reactive oxygen species (ROS) in cell biology and physiology. *Nat Rev Mol Cell Biol* **23**, 499–515 (2022). <https://doi.org/10.1038/s41580-022-00456-z>

Soerjomataram, I., Bray, F. Planning for tomorrow: global cancer incidence and the role of prevention 2020–2070. *Nat Rev Clin Oncol* **18**, 663–672 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41571-021-00514-z>

SOUZA, Thiago Rocha Girão et al. Radiólise da água e a eficiência na produção de H₂. 2021.

Yang H, Villani RM, Wang H, Simpson MJ, Roberts MS, Tang M, Liang X. The role of cellular reactive oxygen species in cancer chemotherapy. *J Exp Clin Cancer Res*. 2018 Nov 1;37(1):266. doi: 10.1186/s13046-018-0909-x. PMID: 30382874; PMCID: PMC6211502.

Yao CHEN, Juan Yang, Shaozhi Fu & Jingbo Wu (2020) Gold Nanoparticles as Radiosensitizers in Cancer Radiotherapy, *International Journal of Nanomedicine*, 15:, 9407-9430, DOI: [10.2147/IJN.S272902](https://doi.org/10.2147/IJN.S272902)

ZHOU, C, Yu, J. Chinese expert consensus on diagnosis and treatment of radiation pneumonitis. *Prec Radiat Oncol*. 2022; 6:262–271. <https://doi.org/10.1002/pro6.1169>

APENCICE A – MANUSCRITO A

ESTUDO DA RADIOSSENSIBILIZAÇÃO DE CÉLULAS TUMORAIS DE CÂNCER COLORRETAL (HRT-18) E CARCINOMA HEPATOCELULAR (HEPG2) COM NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS ESTABILIZADAS COM COPOILÉSTER.***STUDY OF RADIOSENSITIZATION OF COLORECTAL CANCER TUMOR CELLS (HRT-18) AND HEPATOCELLULAR CARCINOMA (HEPG2) WITH MAGNETIC NANOPARTICLES STABILIZED WITH COPOLYESTER***

Eduardo Sant’Ana Ricardo¹
Dr. Alexandre D’Agostini Zottis²
Dr^a. Karina Bettega Felipe³

Resumo:

As nanopartículas de óxido de ferro têm grande potencial para aplicações biomédicas, especialmente na oncologia, onde têm sido exploradas em aplicações como agentes de contraste para imagem por ressonância magnética, hipertermia magnética para destruição seletiva de células cancerosas e transporte vetorizado de fármacos quimioterápicos, potencializando o desenvolvimento de novas técnicas de diagnóstico e tratamento do câncer. O presente estudo investigou a interação entre nanopartículas de óxido de ferro revestidas com copoliéster caprolactona modificada por cisteína e as linhagens celulares HRT-18 (câncer colorretal) e HepG2 (carcinoma hepatocelular). Contrariando as expectativas, os resultados não revelaram o padrão esperado de radiosensibilização, pois não houve um impacto significativo na viabilidade celular, mesmo após exposição a diferentes concentrações das

-
- 1 Físico/Tecnólogo em Radiologia, Mestrando do Programa de Pós-Graduação em Tecnologias Radiológicas do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Santa Catarina – IFSC – eduardoufsc@gmail.com
 - 2 Professor Departamento Acadêmico de Saúde do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Santa Catarina – IFSC - adz@ifsc.edu.br
 - 3 Professora do Departamento de Análises Clínicas da Universidade Federal do Paraná – UFPR - karinabettega@ufpr.br

nanopartículas, quantificados por ensaios de NRU - Neutral Red Uptake. Uma análise de Dispersão Dinâmica de Luz (DLS) sugeriu a presença de aglomerações nas nanopartículas, apresentando resultados entre 832 a 1464 nanômetros, o que pode ter limitado a capacidade de penetração nas células-alvo. Os resultados dos Testes de Potencial Zeta variaram de -19,4 a 21,24 mV, indicando uma tendência à dispersão das nanopartículas, contrariando a formação de aglomerados. Este estudo representa um ponto de partida para uma nova era de pesquisa no campo da oncologia. As descobertas deste estudo não só fornecem respostas, mas também levantam uma miríade de novas questões, incentivando futuros cientistas a explorar o vasto e promissor mundo da nanomedicina e seu papel na luta contra o câncer.

Palavras-chave: Nanopartículas superparamagnéticas de óxido de ferro 1. Radiossensibilização 2. Câncer 3.

Abstract:

Iron oxide nanoparticles have great potential for biomedical applications, especially in oncology, where they have been explored in applications such as contrast agents for magnetic resonance imaging, magnetic hyperthermia for selective destruction of cancer cells, and vectorized transport of chemotherapeutic drugs, enhancing the development of new cancer diagnostic and treatment techniques. The present study investigated the interaction between iron oxide nanoparticles coated with cysteine-modified caprolactone copolyester and the HRT-18 (colorectal cancer) and HepG2 (hepatocellular carcinoma) cell lines. Contrary to expectations, the results did not reveal the expected pattern of radiosensitization, as there was no significant impact on cell viability, even after exposure to different concentrations of nanoparticles, quantified by Neutral Red Uptake (NRU) assays. Dynamic Light Scattering (DLS) analysis suggested the presence of nanoparticle agglomerations, with results ranging from 832 to 1464 nanometers, which may have limited the penetration capacity into target cells. The results of Zeta Potential Tests varied from -19.4 to 21.24 mV, indicating a trend toward nanoparticle dispersion, contrary to agglomerate formation. This study represents a starting point for a new era of research in the field of oncology. The findings of this study not only provide answers but also raise a myriad of new questions, encouraging future scientists

to explore the vast and promising world of nanomedicine and its role in the fight against cancer.

Keywords: Superparamagnetic iron oxide nanoparticles 1. Radiosensitization 2. Cancer 3.

1. INTRODUÇÃO

O câncer é um conjunto de doenças complexas e multifatoriais que se originam a partir de células do próprio corpo que passam a se dividir de maneira descontrolada e invadem tecidos adjacentes. Cada tipo de câncer é caracterizado por um crescimento anormal e incontrolável de células que formam tumores malignos. Estes tumores podem invadir outros tecidos e órgãos, prejudicando seu funcionamento. (SANTOS, et al., 2018)

O tratamento é uma jornada complexa que pode envolver uma variedade de abordagens terapêuticas, incluindo cirurgia, quimioterapia, terapias hormonais e, fundamentalmente, radioterapia, que utiliza radiações ionizantes para destruir ou danificar as células cancerosas, impedindo sua capacidade de se multiplicar. (SANTOS, et al., 2018)

Um dos aspectos cruciais da radioterapia é a radiosensibilidade das células cancerosas (YANG, et al., 2018). Estas células são mais facilmente danificadas ou mortas pela radiação do que as células normais. A radiação ionizante age, em parte, induzindo a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) dentro das células cancerígenas (LIU, et al., 2018), aumentando o dano ao DNA e outras estruturas celulares, levando à morte as células cancerosas.

As radiações ionizantes podem afetar os tecidos normais próximos ao tumor, levando a efeitos colaterais consideráveis, como dermatite (BURKE, et al. 2022), fibrose (WANG, et al., 2020), linfedema (NASSIF, et al., 2020) e pneumonite (ZHOU, 2022).

O estudo aprofundado das interações entre a radiação ionizante e as células cancerígenas, incluindo os mecanismos de geração de ROS (SIES, et al., 2022) e radiosensibilidade (HALL, 2022), é fundamental para otimizar a eficácia do tratamento. O

desenvolvimento de radiosensibilizadores que potencializam o efeito da radiação nas células cancerosas, permitindo o uso de doses menores, é, portanto, um grande avanço no tratamento de vários tipos de câncer (LIUYUN, et al., 2021).

Com esse intuito, nanopartículas metálicas, como as de ouro (CHEN, et al., 2020), platina (SACHIN, et al., 2023) e óxido de ferro (DUBEY, 2022), vêm sendo amplamente investigadas por seu potencial como agentes radiosensibilizadores.

Estudos demonstram que nanopartículas de óxido de ferro quando internalizadas pelas células cancerosas podem amplificar a formação de ROS quando expostas à radiação ionizante, exacerbando os danos no DNA e aumentando a morte celular (DUBEY, 2022), (FATHY, et al., 2019) (DEFU, et al., 2020). Contudo, a eficácia das nanopartículas como radiosensibilizadores pode depender de vários fatores como dose de radiação, tamanho, forma, composição, revestimento, assim como das condições experimentais e modelo celular (GUERRA, 2021).

Neste contexto, esta pesquisa buscou investigar o potencial das nanopartículas de óxido de ferro revestidas com o copoliéster caprolactona modificada com cisteína para radiosensibilização de linhagens celulares de câncer através de experimentos *in vitro*. Foram utilizadas células tumorais das linhagens HRT-18 (câncer colorretal) e HepG2 (carcinoma hepatocelular). Os ensaios avaliaram parâmetros como citotoxicidade e radiosensibilização com e sem irradiação. Os resultados permitiram elucidar se essas nanopartículas potencializam os efeitos de radiosensibilização causados pela radiação ionizante nas linhagens celulares utilizadas.

Em longo prazo, o desenvolvimento de nanomateriais radiosensibilizadores, poderá viabilizar tratamentos mais personalizados e efetivos. Ao amplificar a resposta tumoral à menor dose de radiação ionizante, o dano aos tecidos sadios adjacentes seria minimizado, melhorando a qualidade de vida das pacientes.

2. METODOLOGIA

2.1. Nanopartículas

As nanopartículas de óxido de ferro revestidas com copoliéster de caprolactona modificado por cisteína foram produzidas em colaboração com o grupo de pesquisa

NANOTEC no IFSC - Campus Florianópolis (BELTRAME, 2022). A produção envolveu a síntese enzimática do copolímero poli(globalida-co- ϵ -caprolactona) (PGlCL) por polimerização por abertura de anel (e-ROP) dos monômeros globalida (Gl) e ϵ -caprolactona (CL). O copolímero PGlCL foi então modificado com cisteína (Cys) e N-acetilcisteína (NAC) através de uma fotoreação tiol-eno, resultando em copolímeros mais hidrofílicos e menos cristalinos.

Os copolímeros modificados foram caracterizados e utilizados para produzir scaffolds via eletrofiação, que foram avaliados quanto à cristalinidade, hidrofiliidade e biocompatibilidade. As nanopartículas magnéticas de óxido de ferro (SPIONs) foram estabilizadas com PGlCLCys e caracterizadas quanto à morfologia e propriedades de superfície. A superfície das SPIONs foi modificada para incorporação de biomoléculas, seguida por testes de citotoxicidade e liberação controlada de medicamentos.

A escolha do recobrimento com copoliéster de caprolactona modificado por cisteína foi baseada em sua capacidade de aumentar a hidrofiliidade e biocompatibilidade dos polímeros, tornando-os mais adequados para aplicações biomédicas. Além disso, a modificação facilita a personalização das nanopartículas para entrega de fármacos e outras aplicações específicas, garantindo estabilidade e funcionalidade aprimoradas, essenciais para nanomedicina e engenharia de tecidos.

2.2. Criação e Testes de Phantom

A construção do phantom foi essencial para verificar e avaliar as interações das radiações ionizantes com as células. Essas interações podem criar heterogeneidades significativas, comprometendo a precisão no cálculo da dose. Tal incerteza interfere na distribuição da dose, especialmente em áreas com espaços de ar, como nas reentrâncias das placas de cultivo celular (Figura 12). Os espaços de ar formam interfaces entre materiais de diferentes densidades, resultando em um aumento nas doses secundárias devido ao espalhamento Compton, que é a principal interação nesse contexto.

Para minimizar a presença de ar nos espaços entre os poços da placa, que estava interferindo na distribuição da dose de irradiação, esses espaços foram preenchidos. Esse

processo foi realizado em uma cabine de segurança biológica para evitar contaminação dos poços.

2.3. Cultura Celular e Preparação das Amostras

As linhagens celulares HRT-18 (câncer colorretal) e HepG2 (carcinoma hepatocelular) foram adquiridas do banco de células do Rio de Janeiro.

As linhagens foram cultivadas em meio RPMI 1640 suplementado com soro fetal bovino (10%), solução de penicilina-streptomicina (100 U/mL; 100 mg/mL- 1 %), bicarbonato de sódio, Hepes e glutamina (2 mM), em estufa a temperatura de 37°C e atmosfera contendo 5% de CO₂ e 95% de umidade.

Tanto o cultivo celular, quanto os experimentos envolvendo o mesmo, foram realizados no Laboratório de Fisiologia e Sinalização Celular (FisiCel), localizado no Departamento de Análises Clínicas da Universidade Federal do Paraná.

2.4. Irradiação das Nanopartículas Óxido Metálicas.

A preparação das amostras celulares ocorreu 24 horas antes do ensaio de irradiação no Laboratório de Hematologia do Departamento de Análises Clínicas da UFPR – campus Jardim Botânico e a irradiação foi conduzida no Hospital Erasto Gaertner, localizado no mesmo bairro do campus Jardim Botânico da UFPR.

Antes da irradiação, dois phantoms foram incubados com células da linhagem especificada para o ensaio e colocada em contato com diferentes concentrações de nanopartículas durante 24 horas. Um dos phantoms serviu como controle e não foi irradiado, permanecendo na estufa no Laboratório de Hematologia. O segundo phantom foi conduzido ao Hospital Erasto Gaertner para o ensaio de irradiação.

Cada phantom representando uma triplicata foi exposto a um feixe de fótons de 6,0 MV proveniente de um acelerador linear (CLINAC 600 CD) e dose de 8 Gy. Durante a irradiação, cada amostra do grupo foi posicionada a uma distância de 94 cm da fonte do feixe de fótons, em um campo de exposição de 30x30 cm e uma taxa de dose de 500 cGy/min.

Após o ensaio de irradiação, as amostras foram devolvidas ao laboratório de hematologia e incubadas novamente por 72 horas para só então serem feitos os ensaios de citotoxicidade e radiosensibilização.

2.5 Análise Estatística

A análise estatística foi expressa em função da média e desvio padrão relacionados aos valores de viabilidade celular, calculados através dos resultados de absorbância obtidos por meio de ensaio de NRU.

Os dados em triplicata foram analisados quanto a sua normalidade de distribuição pelo método de Shapiro-Wilk. Após a confirmação do tipo de distribuição dos dados, as médias das triplicatas foram tabeladas e a significância estatística das diferenças entre as médias foi determinado através do teste One-way ANOVA. Valores de $p < 5$ (*), $p < 0,01$ (**) e $p < 0,001$ (***) foram considerados significativos. O GraphPad O software Prism 10 foi utilizado para análise estatística.

3. DISCUSSÃO E ANÁLISE DOS RESULTADO

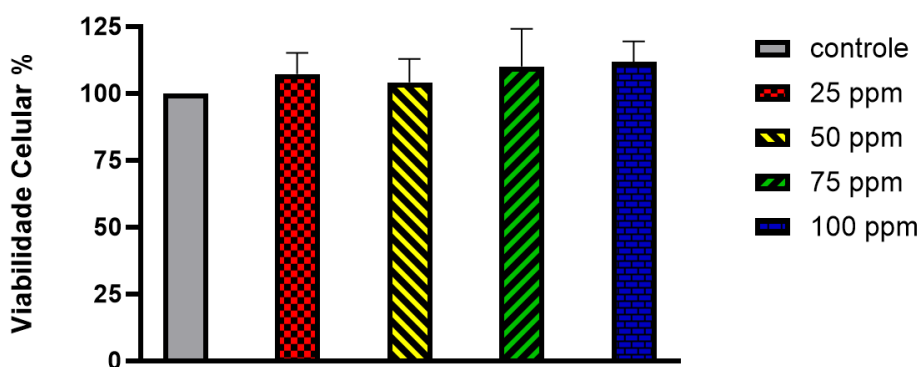
3.1. Ensaio Biológicos de Citotoxicidade.

O efeito radiosensibilizador das nanopartículas foi avaliado mediante a análise do impacto causada pelas mesmas na viabilidade de células HRT-18 e HepG2, após a exposição à radiação. Tal viabilidade foi determinada por meio dos valores de absorbância obtidos nos ensaios de NRU, sendo os resultados demonstrados abaixo.

O Gráfico 1 e Gráfico 2 mostram que as nanopartículas, em nenhuma das concentrações testadas, foram capazes de induzir citotoxicidade em nenhuma das linhagens celulares avaliadas, sugerindo que nestas concentrações, as nanopartículas foram inertes para as células tumorais e que poderiam necessitar de radiação para serem ativadas e promoverem algum efeito deletério. Nesse sentido, Beltrame e colaboradores (2022), apresentam resultados semelhantes, com células fibroblásticas (L929) e células de carcinoma da mama (MDA-MB 231), mostrando, através de ensaio de MTT, que para estas linhagens, as nanopartículas de

óxido de ferro recobertas por copoliéster caprolactona modificada por cisteína, também não apresentam citotoxicidade.

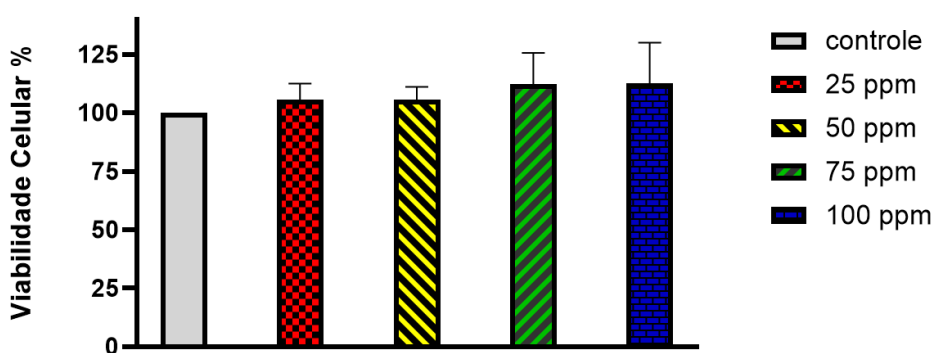
Gráfico 1 - Efeito das nanopartículas sobre a viabilidade celular da linhagem HepG2 não irradiada



Fonte: Do Autor (2024).

Legenda: Gráfico comparativo do efeito de radiosensibilização induzida pelas nanopartículas nas concentrações de 25, 50, 75 e 100 ppm em relação a amostra controle (0 ppm) sobre as células HRT-18 não irradiadas. Os valores, de $p = 0,5350$ e de $R^2 = 0,2496$, indicam que não existe diferença estatística entre as condições avaliadas.

Gráfico 2 - Efeito das nanopartículas sobre a viabilidade celular da linhagem HRT-18 não irradiada



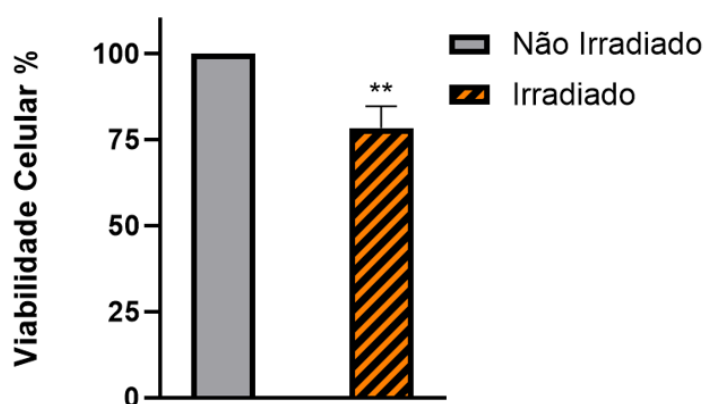
Fonte: Do Autor (2024).

Legenda: Gráfico comparativo do efeito de radiosensibilização induzida pelas nanopartículas nas concentrações de 25, 50, 75 e 100 ppm em relação a amostra controle (0 ppm) sobre as células HRT-18 não irradiadas. Os valores, de $p = 0,5750$ e de $R^2 = 0,2329$, indicam que não existe diferença estatística entre as condições avaliadas.

Em contextos clínicos de tratamento radioterápico, espera-se que as células tumorais irradiadas sofram uma redução na viabilidade devido aos efeitos nocivos da radiação ionizante (MARTINS, 2020). A fim de verificar a radiosensibilidade das linhagens celulares utilizadas, comparou-se a viabilidade celular das amostras controle (0 ppm) não irradiadas, com as amostras controle irradiadas (0 ppm).

O Erro! Fonte de referência não encontrada. e Erro! Fonte de referência não encontrada.4 mostram uma redução na viabilidade celular das amostras não irradiadas, das células irradiadas, demonstrando que as linhagens estudadas são radiosensíveis, independentemente da presença de nanopartículas.

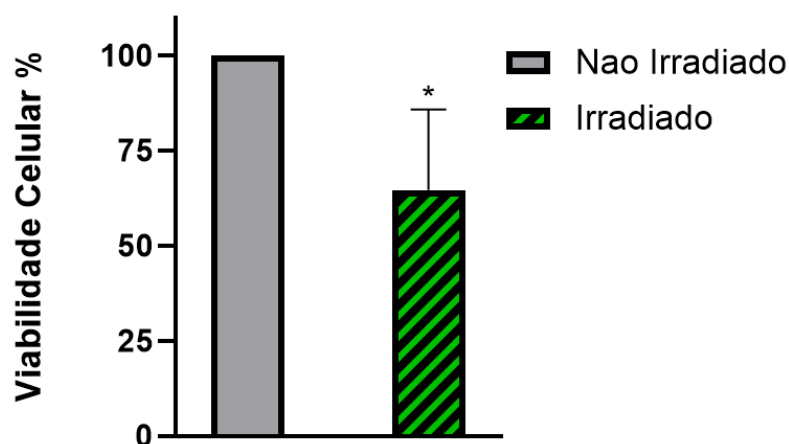
Gráfico 3 - Efeito da radiação ionizante sobre a viabilidade celular da linhagem HepG2 na amostra controle (0 ppm).



Fonte: Do Autor (2024).

Legenda: Gráfico comparativo do efeito de radiosensibilização, induzida pela radiação ionizante nas amostras controle (0 ppm) irradiadas em relação a amostra controle (0 ppm) não irradiadas nas células HepG2. Os resultados da análise de uma one-way ANOVA, revelaram um valor de p significativamente baixo, $p = 0,0041$ e um coeficiente R quadrado de 0,8978. Devido ao valor de p abaixo do nível de significância (0,05), os resultados são considerados estatisticamente significativos.

Gráfico 4 - Efeito da radiação ionizante sobre a viabilidade celular da linhagem HRT-18 na amostra controle (0 ppm).

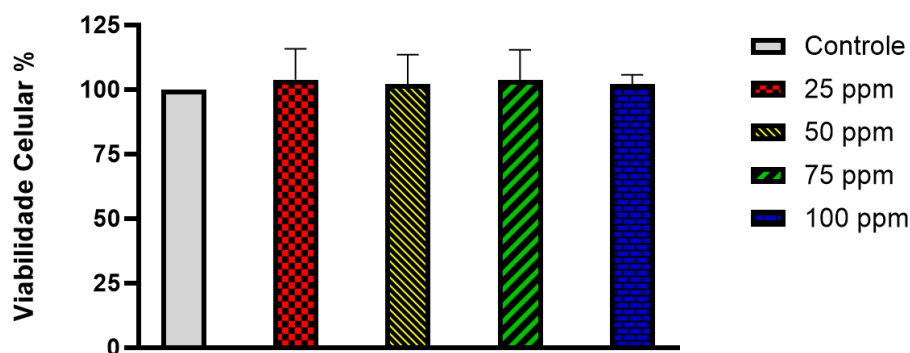


Fonte: Do Autor (2024).

Legenda: Gráfico comparativo do efeito de radiosensibilização, induzida pela radiação ionizante nas amostras controle (0 ppm) irradiadas em relação a amostra controle (0 ppm) não irradiadas nas células HRT-18. Os resultados da análise de uma one-way ANOVA, revelaram um valor de p significativamente baixo, $p = 0,0447$ e um coeficiente R quadrado de 0,06758. Devido ao valor de p abaixo do nível de significância (0,05), os resultados são considerados estatisticamente significativos.

Conduziu-se o ensaio de NRU em células irradiadas e expostas a diversas concentrações de nanopartículas. Observou-se uma elevação na viabilidade, sugerindo a ocorrência de indução de proliferação celular sem uma diminuição da viabilidade das linhagens celulares avaliadas (Gráficos 5**Erro! Fonte de referência não encontrada.** e 6).

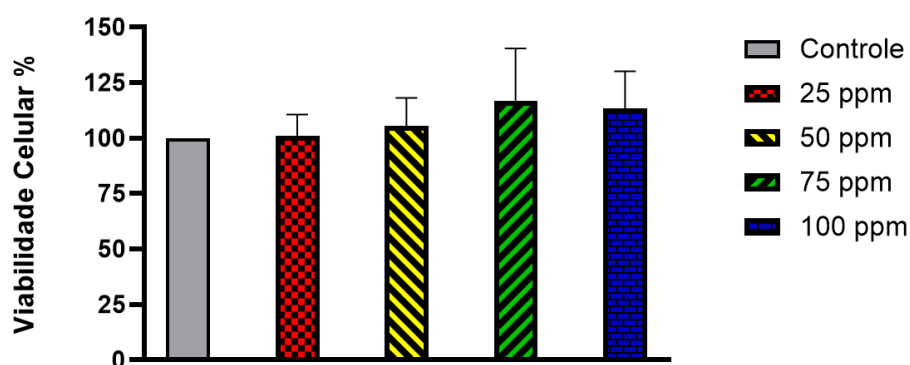
Gráfico 5 – Efeito das diferentes concentrações de nanopartículas sobre a viabilidade celular na linhagem HepG2 irradiada.



Fonte: Do Autor (2024).

Legenda: Gráfico comparativo do efeito de radiosensibilização, induzida pelas nanopartículas nas concentrações de 25, 50, 75 e 100 ppm em relação a amostra controle (0 ppm) sobre as células HepG2 irradiadas. Os valores, de $p = 0,9861$ e de $R^2 = 0,03181$, indicam que não existe diferença estatística entre as condições avaliadas.

Gráfico 6 - Efeito das diferentes concentrações de nanopartículas sobre a viabilidade celular na linhagem HRT-18 irradiada.



Fonte: Do Autor (2024).

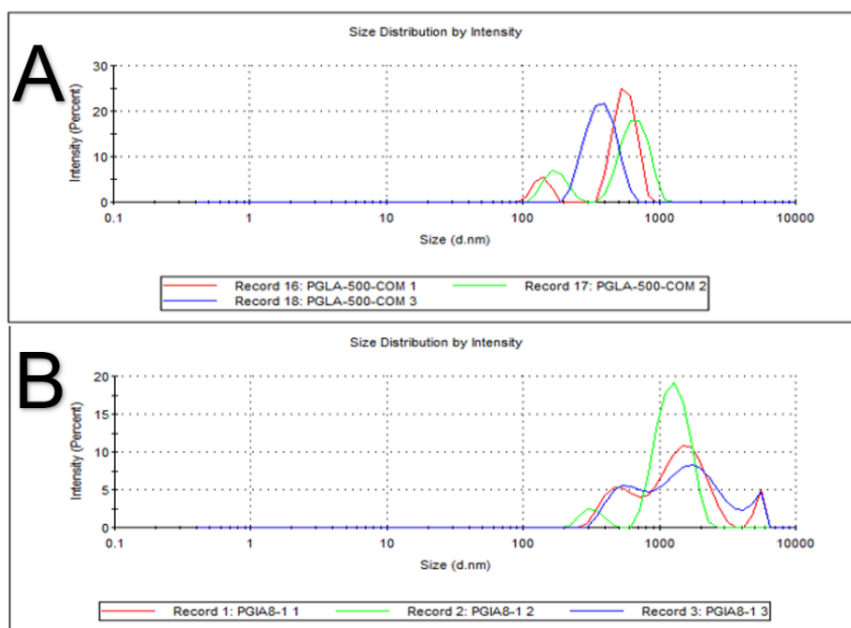
Legenda: Gráfico comparativo do efeito de radiosensibilização, induzida pelas nanopartículas nas concentrações de 25, 50, 75 e 100 ppm em relação a amostra controle (0 ppm) sobre as células HRT-18 irradiadas. Os valores, de $p = 0,5640$ e de $R^2 = 0,2374$, indicam que não existe diferença estatística entre as condições avaliadas.

3.2 Caracterização Físico-Química

Para entender melhor os resultados de viabilidade celular e radiosensibilização obtidos com a realização deste estudo, bem como para compreender as propriedades dessas nanopartículas, foram realizados dois ensaios de caracterização: Dispersão Dinâmica de Luz (DLS) e Medição de Potencial Zeta.

No primeiro ensaio, utilizando uma concentração de 2mg/mL, observamos um tamanho médio de partícula em torno de 1464,34 nm (nanômetros) Gráfico 7**Erro! Fonte de referência não encontrada.**B. No segundo teste, conduzido com uma concentração de 0,5mg/mL e após a filtração da solução por um filtro de 400 nm, a média das triplicatas ficou em 831,20 nm, Gráfico 7**Erro! Fonte de referência não encontrada.**A . Essas dimensões, relativamente grandes, sugerem a presença de aglomerações ou conglomerados, o que pode ter um impacto significativo no comportamento das nanopartículas em meio as linhagens celulares estudadas, ou, ainda, tamanho hidrodinâmico fora das definições de nanopartículas.

Gráfico 7 - Resultado de ensaio de DLS das nanopartículas de óxido de ferro recobertas por copoliéster caprolactona modificada por cisteína na concentração de 2mg/mL (B) e 0,5 mg/mL (A)



Fonte: Do Autor (2024).

Além disso, analisamos o Potencial Zeta das amostras. No primeiro caso, o Potencial Zeta foi registrado como -19,4 mV, indicando uma carga superficial negativa nas partículas. No segundo caso, o Potencial Zeta foi de -21,24 mV, confirmando a estabilidade coloidal das nanopartículas em suas soluções.

3.3 Discussão

A análise dos ensaios de Citotoxicidade (NRU) revelou que 72 horas após a incubação das células com diferentes concentrações de nanopartículas e exposição a irradiação, não ocorreu uma redução significativa na viabilidade celular, evidenciando a ausência de radiosensibilização. Esse fenômeno inesperado indica uma não interação entre as células e as nanopartículas, sugerindo resistência ou barreiras à sua internalização.

Os valores de potencial zeta encontrados, estão de acordo com o que vem sendo verificado em outros estudos. A distribuição de carga negativa na superfície das nanopartículas é vital para evitar a aglomeração das partículas, garantindo sua dispersão homogênea nas amostras e, por conseguinte, sua interação eficaz com as células-alvo durante os ensaios de radiosensibilização. No entanto, se o tamanho hidrodinâmico for muito grande, a distribuição de cargas negativas na superfície das nanopartículas, pode não ser suficiente para uma distribuição homogênea. Como mostrado, os valores de DLS, que nos dá o tamanho hidrodinâmico (núcleo + revestimento), estão muito fora se comparados com outras pesquisas

Tabela 1

Tabela 1 - Resultados de DLS e Potencial Zeta de alguns estudos pesquisado

Nano	DLS (nm)	Zeta (mV)	Autor
Óxido Ferro	18,17	-32	Fathy et al (2019)
	164,18	-41	
GNP@PEG1	27,2	-15.3	Guerra (2021)
GNP-naked	31,8	18,8	

Fe ₃ O ₄ @Pheo	90,75	-38,1	Zottis (2015)
Fe ₃ O ₄ @Cisteína	1464,34	-19,4	Autor
	831,20	-21,24	

Fonte: Do Autor (2024).

Dessa forma, sugere-se que a resistência aparente das linhagens celulares às nanopartículas pode ser atribuída, pelo menos em parte, às aglomerações presentes, limitando sua entrada eficaz nas células. Estes resultados desafiadores fornecem uma base sólida para investigações futuras, que podem se concentrar em estratégias para melhorar a dispersão das nanopartículas, reduzir aglomerações e, assim, aumentar sua eficácia como agentes de radiosensibilização. Esse aprofundamento é crucial para desbloquear o potencial total dessas tecnologias no contexto do tratamento do câncer.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Diante dos resultados obtidos neste estudo, é evidente que a interação entre nanopartículas de óxido de ferro revestidas com copoliéster caprolactona modificada por cisteína e as linhagens celulares HRT-18 (câncer colorretal) e HepG2 (carcinoma hepatocelular) não seguiu o padrão esperado de radiosensibilização. A ausência de impacto significativo na viabilidade celular, mesmo após exposição a diferentes concentrações das nanopartículas, levanta questionamentos profundos sobre os mecanismos biológicos e físico-químicos subjacentes a essa interação.

A presença de aglomerações ou tamanho hidrodinâmico fora dos padrões nanométricos, das nanopartículas, como indicado pelos resultados da Dispersão Dinâmica de Luz (DLS), parece ser um fator chave que limita sua capacidade de penetração nas células-alvo. A falta de internalização das nanopartículas, evidenciada pela ausência de geração de espécies reativas de oxigênio, contribui para a falta de impacto na viabilidade celular.

REFERÊNCIAS

BELTRAME, Jeovandro Maria et al. Modification of polyesters and nanomaterial production for biomedical applications. 2022.

Bin WANG, Jinlong Wei, Lingbin Meng, Huanhuan Wang, Chao Qu, Xiang Chen, Ying Xin, Xin Jiang, Advances in pathogenic mechanisms and management of radiation-induced fibrosis, *Biomedicine & Pharmacotherapy*, Volume 121, 2020, 109560, ISSN 0753-3322, <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.109560>.

BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer. ABC do câncer: abordagens básicas para o controle do câncer. 2. ed. Rio de Janeiro: INCA, 2012b.

BURKE, S. Faithfull, H. Probst, Radiation induced skin reactions during and following radiotherapy: A systematic review of interventions, *Radiography*, Volume 28, Issue 1, 2022, Pages 232-239, ISSN 1078-8174. <https://doi.org/10.1016/j.radi.2021.09.006>.

CÂNDIDO, M.A., Rost, N.C., Ferreira, V.R., & Raniero, L.J. (2022). Síntese de nanopartículas de óxido de ferro estabilizadas com citrato de sódio e TMAOH. *Research, Society and Development*.

CHEDID, Marcio F. et al. Carcinoma hepatocelular: diagnóstico e manejo cirúrgico. *ABCD. Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva (São Paulo)*, v. 30, p. 272-278, 2017.

DEFU Zhi, Ting Yang, Jian Yang, Shuang Fu, Shubiao Zhang, Targeting strategies for superparamagnetic iron oxide nanoparticles in cancer therapy, *Acta Biomaterialia*, Volume 102, 2020, Pages 13-34, ISSN 1742-7061, <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2019.11.027>.

DUBEY, P.; Sertorio, M.; Takiar, V. Therapeutic Advancements in Metal and Metal Oxide Nanoparticle-Based Radiosensitization for Head and Neck Cancer Therapy. *Cancers* **2022**, 14, 514. <https://doi.org/10.3390/cancers14030514>

ELDER, David E. et al. The 2018 World Health Organization classification of cutaneous, mucosal, and uveal melanoma: detailed analysis of 9 distinct subtypes defined by their evolutionary pathway. *Archives of pathology & laboratory medicine*, v. 144, n. 4, p. 500-522, 2020.

FATHY, Mohamed M. et al. Silica-coated iron oxide nanoparticles as a novel nano-radiosensitizer for electron therapy. *Life sciences*, v. 234, p. 116756, 2019.

FONTHAM, ETH, Wolf, AMD, Church, TR, et al. Cervical Cancer Screening for Individuals at Average Risk: 2020 Guideline Update from the American Cancer Society. *CA Cancer J Clin*. 2020. <https://doi.org/10.3322/caac.21628>.

GANESAN, Previn; KULIK, Laura M. Hepatocellular carcinoma: new developments. *Clinics in liver disease*, v. 27, n. 1, p. 85-102, 2023.

GUERRA, D. B. (2021). Nanoparticles for radiation therapy enhancement: Investigation of radiosensitization induced by gold and iron oxide nanoparticles in glioblastoma cells exposed to photon and proton beams.

GIAQUINTO, Angela N. et al. Breast cancer statistics, 2022. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 72, n. 6, p. 524-541, 2022.

HALL, E. J. (2022). **Radiobiology for the radiologist (8th ed.)**. Philadelphia, PA: Wolters Kluwer.

ILLES, E.; TOMBACZ, E. The effect of humic acid adsorption on pHdependent surface charging and aggregation of magnetite nanoparticles. *J Colloid Interface Sci*, v. 295, n. 1, p. 115-23, Mar 1 2006.

KABAKOV, Alexander E.; YAKIMOVA, Anna O. Hypoxia-induced cancer cell responses driving radioresistance of hypoxic tumors: Approaches to targeting and radiosensitizing. **Cancers**, v. 13, n. 5, p. 1102, 2021.

KIM, Jong Yeob et al. Environmental risk factors and biomarkers for autism spectrum disorder: an umbrella review of the evidence. **The Lancet Psychiatry**, v. 6, n. 7, p. 590-600, 2019.

KUMAR, Vinay. **Robbins & cotran-patologia bases patológicas das doenças 8a edição**. Elsevier Brasil, 2010.

LINEHAN, W.M., Ricketts, C.J. The Cancer Genome Atlas of renal cell carcinoma: findings and clinical implications. *Nat Rev Urol* **16**, 539–552 (2019). <https://doi.org/10.1038/s41585-019-0211-5>

LIU, Y-P, Zheng, C-C, Huang, Y-N, Xu, WW, Li, B. Molecular mechanisms of chemo- and radiotherapy resistance and the potential implications for cancer treatment. *MedComm*. 2021; 2: 315–340. <https://doi.org/10.1002/mco2.55>

LIUYUN Gong, Yujie Zhang, Chengcheng Liu, Mingzhen Zhang & Suxia Han (2021) Application of Radiosensitizers in Cancer Radiotherapy, *International Journal of Nanomedicine*, 16:, 1083-1102, DOI: [10.2147/IJN.S290438](https://doi.org/10.2147/IJN.S290438)

NASSIF, T.M., Brunelle, C.L., Gillespie, T.C. *et al*. Breast Cancer-Related Lymphedema: a Review of Risk Factors, Radiation Therapy Contribution, and Management Strategies. *Curr Breast Cancer Rep* **12**, 305–316 (2020). <https://doi.org/10.1007/s12609-020-00387-8>

PAVLOPOULOU, Athanasia et al. Molecular determinants of radiosensitivity in normal and tumor tissue: A bioinformatic approach. **Cancer letters**, v. 403, p. 37-47, 2017.

PECORINO, Lauren. **Molecular biology of cancer: mechanisms, targets, and therapeutics**. Oxford university press, 2021.

SACHIN T. Yerpude, Ajay K. Potbhare, Pavan Bhilkar, Alok R. Rai, Raghvendra P. Singh, Ahmed A. Abdala, Rameshwar Adhikari, Rohit Sharma, Ratiram G. Chaudhary, Biomedical, clinical and environmental applications of platinum-based nanohybrids: An updated review, *Environmental Research*, Volume 231, Part 2, 2023, 116148, , <https://doi.org/10.1016/j.envres.2023.116148>.

SANTOS, J.B., Sacramento, S.A., & Errante, P.R. (2018). ABORDAGENS TERAPÊUTICAS DO MELANOMA CUTÂNEO E METASTÁTICO. *UNILUS Ensino e Pesquisa*, 14, 200-214.

SHESTOVSKAYA, M.V.; Luss, A.L.; Bezborodova, O.A.; Makarov, V.V.; Keskinov, A.A. Iron Oxide Nanoparticles in Cancer Treatment: Cell Responses and the Potency to Improve Radiosensitivity. *Pharmaceutics* **2023**, 15, 2406. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15102406>

SIEGEL, Rebecca L. et al. Cancer statistics, 2023. **Ca Cancer J Clin**, v. 73, n. 1, p. 17-48, 2023.

SIEGEL, RL, Miller, KD, Fuchs, HE, Jemal, A. Cancer statistics, 2022. *CA Cancer J Clin*. 2022. <https://doi.org/10.3322/caac.21708>

SIES, H., Belousov, V.V., Chandel, N.S. *et al.* Defining roles of specific reactive oxygen species (ROS) in cell biology and physiology. *Nat Rev Mol Cell Biol* **23**, 499–515 (2022). <https://doi.org/10.1038/s41580-022-00456-z>

SOERJOMATARAM, I., Bray, F. Planning for tomorrow: global cancer incidence and the role of prevention 2020–2070. *Nat Rev Clin Oncol* **18**, 663–672 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41571-021-00514-z>

YANG H, Villani RM, Wang H, Simpson MJ, Roberts MS, Tang M, Liang X. The role of cellular reactive oxygen species in cancer chemotherapy. *J Exp Clin Cancer Res*. 2018 Nov 1;37(1):266. doi: 10.1186/s13046-018-0909-x. PMID: 30382874; PMCID: PMC6211502.

yao CHEN, Juan Yang, Shaozhi Fu & Jingbo Wu (2020) Gold Nanoparticles as Radiosensitizers in Cancer Radiotherapy, *International Journal of Nanomedicine*, 15:, 9407-9430, DOI: [10.2147/IJN.S272902](https://doi.org/10.2147/IJN.S272902)

ZHOU, C, Yu, J. Chinese expert consensus on diagnosis and treatment of radiation pneumonitis. *Prec Radiat Oncol*. 2022; 6:262–271. <https://doi.org/10.1002/pro6.1169>