



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

**Miméticos de hemácias como sistemas de liberação de
hidrolisados de hemoglobina com atividades antitumorais *in vitro***

Cíntia Caetano Bonatto

**Brasília
2013**



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

**Miméticos de hemácias como sistemas de liberação de
hidrolisados de hemoglobina com atividades antitumorais *in vitro***

Cíntia Caetano Bonatto

Dissertação de mestrado submetida ao Programa de Pós-graduação em Biologia Animal da Universidade de Brasília como parte integrante dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Biologia Animal.

**Orientador: Dr. Luciano Paulino da Silva
Co-Orientadora: Dra. Graziella Anselmo Joanitti**

Brasília, março de 2013

*“Ensinar é um exercício de imortalidade.
De alguma forma continuamos a viver naqueles cujos olhos aprenderam a ver o
mundo pela magia da nossa palavra. O professor, assim, não morre jamais...”*

Rubem Alves

Agradecimentos...

À Deus por me abençoar e iluminar meus caminhos.

Aos meus amados pais, Lúcia e Marcos, e irmã Raquel, pela confiança, ensinamentos, incentivo, amizade, companheirismo e a todo o amor dedicado a mim, pois sem vocês eu não seria simplesmente nada.

A todos meus familiares em especial Terezinha (in memorian), Maria de Lourdes, Ermes (in memorian), Euripedes (in memorian), Alice, Rosiane, Valdete, Gladys, Angelo Plínio e Sista, por compartilhar de diversos momentos da minha vida.

Ao meu orientador Luciano Paulino da Silva pela oportunidade, apoio, ensinamentos, paciência, compreensão, incentivo e amizade.

A minha co-orientadora Graziella Anselmo Joanitti pela disposição, paciência, ensinamentos e amizade.

Aos meus queridos amigos e amigas: Danielle Vasconcelos, Flávia Soares, Glenda Lopes, Janaína Fernandes, Paula Emmert, Tainá Batista, Thaiana Corrêa, Thaiz Armond, Thiago Antunes, Rodrigo Borges e Zara Guimarães, simplesmente por existirem e fazerem parte da minha vida.

Ao querido Luciano Gonçalves, in memorian, por me ensinar que a vida pode ser curta e os sentimentos podem ser eternos.

A todos os colegas do grupo Nanobiotec da Embrapa.

Ao Dr. Carlos Bloch e todos os colegas do laboratório de espectrometria de massa da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

A Dra. Maria Luiza Franscinelli pela ajuda com o manuseio e coleta de material biológico dos animais.

Ao Professor Ricardo Bentes de Azevedo e a todos os colegas do laboratório de Morfologia e Morfogênese, onde foram realizados os ensaios antitumorais.

A Professora Maria Rita Avanzi e a todos os colegas do Núcleo de Educação Científica do Instituto de Biologia.

A Dra Carla Nunes Araújo da Faculdade de Ceilândia da Universidade de Brasília, pela oportunidade, ensinamentos e confiança.

A Professora Sonia Maria de Freitas e todos do laboratório de Biofísica da Universidade de Brasília.

A Professora Sônia Nair Bão e a todos os integrantes do laboratório de Microscopia Eletrônica da Universidade de Brasília.

Ao Professor Bergmann Morais Ribeiro e a todos do laboratório de Virologia da Universidade de Brasília.

As Professoras Dra(s) Márcia Renata Mortari e Karla Graziella Moreira do Departamento de Ciências Fisiológicas da Universidade de Brasília pelos ensinamentos e auxílio na lida com os animais.

Aos Pesquisadores Dr(a). Thales Lima Rocha e Vera Lucia Perussi Polez da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, pelos ensinamentos, confiança e incentivos.

Ao Professor Jaime Martins de Santana e a todos do laboratório de Interação Parasito-Hospedeiro da Universidade de Brasília.

As funcionárias Ilenice, Antônia e Terezinha da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

As secretárias Daniele e Ana Paula do Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, pelo auxílio durante todo o período de realização desse trabalho.

A Universidade de Brasília.

A todos os professores do curso de ciências biológicas da Universidade de Brasília

A todos os colegas da graduação, em especial Gabriella Carlos, Guilherme Menegói, João Lucas, Luísa Andrade e Marco Henrique.

A todos que direta ou indiretamente fizeram parte dessa caminhada.

Às agências de fomento CAPES, CNPq e FAPDF pelo auxílio financeiro o qual permitiu a realização desse estudo.

SUMÁRIO

COMITÊ DE ÉTICA	x
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	xi
LISTA DE FIGURAS	xii
RESUMO	xvii
ABSTRACT	xviii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Câncer	2
1.2 Nanobiotecnologia e o câncer	5
1.3 Hemácias	7
1.4 Lipossomos	9
1.5 Nanopartículas Poliméricas	10
1.6 Peptídeos bioativos	11
1.7 Hemoglobina	12
2. JUSTIFICATIVA	14
3. OBJETIVOS	16
3.1 Objetivo Geral	17
3.2 Objetivos Específicos	17
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	18
4.1 Equipamentos, Materiais e Reagentes utilizados	19
4.1.1 Equipamentos	19
4.1.2 Materiais	19
4.1.3 Reagentes	19
4.2 Obtenção de Sangue	20
4.2.1 Coleta de sangue dos animais	20
4.3 Mecanismo de esvaziamento das hemácias	21
4.3.1 Retirada do soro	21
4.3.2 Esvaziamento das hemácias	21
4.3.3 Avaliação indireta das hemácias	21
4.3.4 Quantificação de hemoglobina liberada	22
4.4 Peptídeos antitumorais	22
4.4.1 Obtenção dos peptídeos	22

4.4.2	Espectrometria de massa	23
4.4.3	Cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa - RP-HPLC	24
4.5	Miméticos de hemácias.....	24
4.6	Lipossomos	25
4.7	Nanopartículas de Quitosana	26
4.8	Nanopartículas de Quitosana e Polietilenoglicol (PEG)	27
4.9	Eficiência de Encapsulamento	27
4.10	Caracterização estrutural das células intactas e estruturas formadas após o esvaziamento de hemácias	28
4.10.1	Microscopia de força atômica	28
4.10.2	Microscopia eletrônica de varredura	29
4.10.3	Espalhamento de luz dinâmico e determinação do potencial Zeta de superfície.....	29
4.11	Ensaio de atividade biológica	30
4.11.1	Manutenção das linhagens celulares	30
4.11.2	Testes de atividade antitumoral <i>in vitro</i>	30
4.11.3	Integridade da membrana plasmática	31
4.11.4	Proliferação celular	32
4.12	Análise de perfil proteico por método Biotyper	33
4.13	Análise estatística	34
5.	RESULTADOS	35
5.1	Obtenção de material biológico para a formação de nanossistemas	36
5.1.1	Avaliação indireta da liberação de hemoglobina das hemácias	36
5.1.2	Quantificação direta de hemoglobina liberada das hemácias	37
5.2	Isolamento, fracionamento e identificação de peptídeos presentes no hidrolisado de hemoglobina	38
5.3	Ensaio de atividade anticâncer <i>in vitro</i> do hidrolisado de hemoglobina	42
5.4	Purificação dos peptídeos derivados da hemoglobina murina hidrolisada	43
5.5	Ensaio dos efeitos da hemoglobina comercial intacta e hidrolisada sobre a de viabilidade celular	50
5.6	Desenvolvimento e caracterização de nanossistemas à base de miméticos de hemácias, lipossomos e quitosana	59
5.7	Avaliação dos efeitos dos nanossistemas desenvolvidos sobre a viabilidade	

Celular.....	64
5.7.1 Miméticos de hemácia	64
5.7.2 Lipossomos	66
5.7.3 Nanopartículas poliméricas de quitosana	67
5.7.4 Nanopartículas poliméricas de Quitosana PEG	69
5.8 Avaliação dos efeitos das nanopartículas poliméricas de quitosana desenvolvidas sobre a proliferação celular	71
5.9 Avaliação dos efeitos das nanopartículas poliméricas de quitosana desenvolvidas sobre a integridade de membrana plasmática.....	72
5.10 Avaliação dos efeitos das nanopartículas poliméricas de quitosana desenvolvidos sobre o perfil proteico das células após o tratamento	73
6. DISCUSSÃO	76
7. CONCLUSÃO	92
8. PERSPECTIVAS	94
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	96
10. ANEXOS.....	105
10.1 Participação em eventos científicos	106
10.2 Publicações.....	106

COMITÊ DE ÉTICA



Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Comitê de Ética no Uso Animal

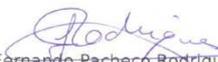
Brasília, 08 de janeiro de 2013.



DECLARAÇÃO

Declaramos que o projeto intitulado **"INVESTIGAÇÃO DOS EFEITOS FARMACOLÓGICOS IN VITRO, IN SITU E IN VIVO DE COMPOSTOS BIOATIVOS LIVRES OU ENCAPSULADOS EM NANOSSISTEMAS DE LIBERAÇÃO SUSTENTADA."**, UnBDOC n.º 131758/2012, sob responsabilidade do pesquisador Luciano Paulino da Silva foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília.




Prof. Fernando Pacheco Rodrigues
Vice-Coordenador da CEUA

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- DAN - 1,5-diaminonaftaleno
- DLS - Espalhamento de luz dinâmico
- DMEM - Meio Dulbecco Mem
- DMSO - Dimetilsulfóxido
- EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético
- EPR - *Enhanced Permeability and Retention*
- INCA - Instituto Nacional do Câncer
- ISD - *in-source decay* ou decaimento de íons na fonte
- MALDI-TOF MS - Espectrometria de massa por ionização/dessorção de matriz assistida por laser com separação por tempo de voo
- MEV - Microscopia eletrônica de varredura
- MFA - Microscopia de força atômica
- MTT - Brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio
- m/z - Razão massa/carga
- NaCl - Cloreto de sódio
- NSF - National Science Foundation
- NST - Nano Separation Technologies
- OMS - Organização Mundial de Saúde
- PEG - Polietilenoglicol
- PBS - Tampão fosfato de sódio salino
- RP-HPLC - Cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa
- TFA - Ácido trifluoroacético
- tpp - Techno Plastic Products
- TPP - Tripolifosfato de sódio
- 4T1 - Linhagem de células de câncer de mama murino
- NIH3T3 - Linhagem de células de fibroblasto murino

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Imagens topográficas tridimensionais de hemácias de diferentes espécies de mamíferos obtidas por microscopia de força atômica (MFA) em modo contato. Bovina (A), camundongo (B), coelho (C) e humana (D). Áreas de $26,6 \mu\text{m} \times 26,6 \mu\text{m}$.

Figura 2. Representação de lipossomos. (A) Lipossomo unilamelar. (B) Lipossomo multilamelar.

Figura 3. Esquema representativo da utilização de hemácias como fornecedor de componentes moleculares e para aplicação terapêutica.

Figura 4. Perfil indireto de liberação da hemoglobina pelas hemácias quando na presença de diferentes concentrações de NaCl (0,50 e 0,75%), PBS ou água monitorada por 2 horas por espectrofotometria de absorção a 630 nm.

Figura 5. Liberação de hemoglobina das hemácias expostas a diferentes soluções contendo diferentes concentrações de NaCl (0,25, 0,50 e 0,75%) por 2 horas, avaliado por espectrofotometria de absorção na região do visível em 540 e 580 nm.

Figura 6. Espectro de massa MALDI-TOF de extrato total de hemoglobina murina obtido em modo linear positivo na faixa m/z 2000-20000 sendo assinalados íons referentes aos estados monocarregados $[M+H]^+ = 14971 / 15715$ das cadeias α e β da hemoglobina (Hb) murina e seus respectivos estados duplamente $[M+2H]^+ = 7485 / 7859$, triplamente $[M+3H]^+ = 4990 / 5240$ e quadruplamente $[M+4H]^+ = 3737 / 3929$, carregados.

Figura 7. Espectro de massa da cadeia α da hemoglobina murina. Espectro de massa obtido por meio de espectrometria de massa MALDI-TOF/TOF operada em modo ISD, com o equipamento operando em modo refletido/positivo de amostra proveniente do lisado de hemácias, sendo assinalados os íons da série c.

Figura 8. Espectros de massa de fragmento tríptico da cadeia β da hemoglobina murina. Espectro de massa obtido por meio de espectrometria de massa MALDI-TOF/TOF operada em modo LIFT™ a partir de íon precursor de $[M+H]^+ = 1274,8$, sendo assinalados íons da série y.

Figura 9. Avaliação de viabilidade de células de câncer de mama murino da linhagem 4T1 por ensaio MTT após 24 h de tratamento com a hemoglobina total não hidrolisada ou com os hidrolisados de hemoglobina resultantes de diferentes processos de variação de pH e hidrólise enzimática da hemoglobina murina.

Figura 10. Perfil cromatográfico dos fragmentos peptídicos da hemoglobina murina hidrolisada com tripsina e eluídas em coluna semipreparativa de fase reversa (NST C₁₈) sob gradiente linear de acetonitrila (5 a 95% em 80 min) e fluxo contínuo de 1 mL/min. Monitoramento realizado nos comprimentos de onda de 216 nm (preto) e 280 nm (vermelho).

Figura 11. Avaliação de viabilidade de células de fibroblastos murinos normais (NIH3T3) e de câncer de mama murino (4T1) pelo ensaio de MTT após 24 h de tratamento com as frações obtidas por separação cromatográfica da hemoglobina hidrolisada por tripsina obtida a partir do esvaziamento das hemácias.

Figura 12. Alinhamento das sequências de resíduos de aminoácidos das cadeias α (A) e β (B) constituintes da molécula de hemoglobina de camundongo, bovina e humana. Barras vermelhas indicam as regiões conservadas dos peptídeos neoquiotorfina e hemorfina gerados após clivagem enzimática por tripsina das cadeias α e β , respectivamente.

Figura 13. Espectro de massa MALDI-TOF de extrato total de hemoglobina comercial bovina em modo linear positivo na faixa m/z 2000-20000 sendo assinalados íons referentes aos estados monocarregados $[M+H]^+ = 14971 / 15715$ das cadeias α e β da hemoglobina (Hb) murina e seus respectivos estados duplamente $[M+2H]^+ = 7485 / 7859$, triplamente $[M+3H]^+ = 4990 / 5240$ carregados.

Figura 14. Espectro de massa da hemoglobina comercial bovina obtido por meio de espectrometria de massa MALDI-TOF/TOF operada em modo ISD, com o equipamento operando em modo refletido/positivo de amostra proveniente do lisado de hemácias, sendo assinalados os íons da série c, referentes às cadeias α (superior) e β (inferior).

Figura 15. Espectro de massa de hidrolisado trípico de hemoglobina comercial bovina obtido por meio de espectrometria de massa MALDI-TOF/TOF operada em modo LIFT™ a partir de íon precursor de $[M+H]^+ = 1275,1$ sendo assinalados íons da série y.

Figura 16. Avaliação de viabilidade de células de câncer de mama (4T1) e fibroblastos murinos normais (NIH3T3) pelo ensaio de MTT após 24, 48 e 72 horas de tratamento com hemoglobina comercial intacta, não submetida ao processo de hidrólise enzimática.

Figura 17. Avaliação de viabilidade de células de câncer de mama (4T1) e fibroblastos murinos normais (NIH3T3) pelo ensaio de MTT após 24, 48 e 72 horas de tratamento com os peptídeos resultantes da hidrólise da hemoglobina comercial por tripsina.

Figura 18. Avaliação de viabilidade de células de câncer de mama (4T1) e fibroblastos murinos normais (NIH3T3) pelo ensaio de MTT após 24, 48 e 72 horas de tratamento com hemoglobina comercial intacta, não submetida ao processo de hidrólise enzimático e tripsina livre.

Figura 19. Avaliação de viabilidade de células de câncer de mama (4T1) e fibroblastos murinos normais (NIH3T3) pelo ensaio de MTT após 24, 48 e 72 horas de tratamento com os peptídeos resultantes da hidrólise da hemoglobina comercial por tripsina e inibidor de proteases.

Figura 20. Imagens obtidas por meio de microscopia eletrônica de varredura e microscopia de força atômica a partir de hemácias intactas e após processo de esvaziamento.

Figura 21. Imagens topográficas adquiridas por meio de microscopia de força atômica operada em modo contato de hemácias (A) e hemácias lavadas com PBS (a); miméticos de hemácias (B) e miméticos de hemácias com hidrolisado de hemoglobina (Mimético-Pep) (b); lipossomos (C) e lipossomos com hidrolisados de hemoglobina (Lipossomo-Pep) (c); e partículas de quitosana (D) e quitosana com hidrolisado de hemoglobina (Quitossana-Pep) (d).

Figura 22. Histogramas de distribuição de classes referentes aos valores de altura das partículas, sendo hemácias (A) e hemácias lavadas com PBS (a); miméticos de hemácias (B) e miméticos de hemácias com hidrolisado de hemoglobina (mimético-Pep) (b); lipossomos (C) e lipossomos hidrolisados de hemoglobina (lipossomo-Pep) (c); e partículas de quitosana (D) e quitosana com hidrolisado de hemoglobina (quitossana-Pep) (d).

Figura 23. Avaliação de viabilidade de células de câncer de mama (4T1) e fibroblastos murinos normais (NIH3T3) pelo ensaio de MTT após 24 horas de tratamento com Mimético e Mimético-Pep.

Figura 24. Avaliação da viabilidade de células de câncer de mama 4T1 pelo ensaio de MTT após 24 h de tratamento com Lipossomos e Lipossomos-Pep.

Figura 25. Avaliação da viabilidade de células de câncer de mama 4T1 pelo ensaio de MTT após 24 h de tratamento com nanopartícula de Quitossana e Quitossana-Pep.

Figura 26. Avaliação da viabilidade de células de câncer de mama 4T1 pelo ensaio de MTT após 24 h de tratamento com nanopartícula de Quitossana PEG e Quitossana PEG Pep em diferentes concentrações.

Figura 27. Número de células de câncer de mama (4T1) na ausência ou presença dos peptídeos e partículas de Quitossana e Quitossana Pep após 24 horas de tratamento.

Figura 28. Integridade de membrana de células de câncer de mama (4T1) na ausência ou presença dos peptídeos e partículas de Quitossana e Quitossana Pep após 24 horas de tratamento.

Figura 29. Espectros de massa dos perfis proteicos de hidrolisado de hemoglobina livre e células 4T1 após exposição aos tratamentos obtidos por meio de espectrometria de massa MALDI-TOF operada em modo linear positivo na faixa m/z 2000-22000. (A)

Perfil proteico das células sem exposição ao tratamento. (B) Perfil proteico das células após o tratamento com hidrolisado de hemoglobina livre. (C) Perfil proteico das células após o tratamento com partículas de quitosana. (D) Perfil proteico das células após o tratamento com partículas de quitosana contendo hidrolisado de hemoglobina. (E) Perfil proteico do hidrolisado de hemoglobina.

Figura 30. Dendrograma a partir do agrupamento de espectros de massa referentes aos perfis proteicos do hidrolisado de hemoglobina livre, células 4T1 controle, células 4T1 após incubação com hidrolisado de hemoglobina livre, partícula de Quitosana (sem hidrolisado de hemoglobina) e Quitosana Pep (com hidrolisado de hemoglobina).

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Nomenclatura utilizada para os sistemas desenvolvidos.

Tabela 2. Características físico-químicas dos miméticos de hemácias, miméticos de hemácia com peptídeo, lipossomo e lipossomo com peptídeo, quitosana e quitosana com peptídeo, quitosana revestida com polietilenoglicol (PEG) e quitosana revestida com polietilenoglicol com hidrolisado de hemoglobina revestida com polietilenoglicol. Eficiência de encapsulamento (E.E.). Índice de polidispersividade (PdI). Valores referentes a médias de três leituras independentes.

Tabela 3. Sumário dos principais achados para os ensaios de atividade biológica com hemoglobina e hemoglobina hidrolisada.

Tabela 4. Sumário com as principais características dos sistemas desenvolvidos.

RESUMO

Devido à alta taxa de mortalidade por câncer todos os anos e em virtude dos tratamentos frequentemente utilizados causarem severos efeitos adversos devido à sua ação em células sadias, surge a necessidade pela busca por agentes ativos mais específicos para as células tumorais bem como a busca por mecanismos de transportes de bioativos mais eficientes. Nesse sentido o desenvolvimento de sistemas estruturados em hemácias torna-se promissor uma vez que essas células podem fornecer o arcabouço para o transporte desses ativos bem como fornecer peptídeos com atividade antitumoral a partir da hidrólise da hemoglobina. O objetivo do presente estudo foi desenvolver sistemas de liberação e entrega de hidrolisados de hemoglobina com ações antitumorais utilizando hemácias e avaliar seus efeitos sobre linhagens de células tumorais (4T1) e normais de mamíferos (NIH3T3), *in vitro*. O hidrolisado de hemoglobina livre, bem como o hidrolisado encapsulado em sistemas miméticos baseados em hemácias, lipossomos, partículas de quitosana e partículas de quitosana com polietilenoglicol tiveram suas características avaliadas por microscopia de força atômica, microscopia eletrônica de varredura, espalhamento de luz dinâmico e suas possíveis atividades foram testadas contra células de câncer de mama e fibroblasto. O hidrolisado trípico de hemoglobina livre não diminuiu expressivamente *in vitro* a viabilidade de células 4T1 e NIH3T3. Os miméticos de hemácias na ausência e presença do hidrolisado de hemoglobina apresentaram formas irregulares, tamanho micrométrico, alta polidispersividade (0,66 a 1,0) e citotoxicidade contra células NIH3T3 (17%) na ausência do hidrolisado de hemoglobina e contra células 4T1 na presença do hidrolisado. Os miméticos de hemácias bem como os lipossomos também apresentaram carga de superfície negativa e se mostraram instáveis coloidalmente. Adicionalmente, apresentaram tamanhos micrométricos e nanométricos, respectivamente. Todos os outros sistemas apresentaram tamanhos nanométricos, polidispersividade na faixa de 0,34 a 1,0 e boa estabilidade coloidal (± 40 a $> \pm 60$). Partículas de quitosana e quitosana com PEG apresentaram carga superficial positiva e alta estabilidade coloidal. Todos os sistemas nanométricos (lipossomos e baseados em quitosana) apresentaram taxa de encapsulamento entre 78-89%, sendo que os lipossomos induziram maior diminuição na viabilidade (51%, $P < 0,05$) de células 4T1. A partir dos resultados obtidos foi possível observar que apesar da maioria dos sistemas testados não terem alterado expressivamente a viabilidade das células tumorais, o desenvolvimento de nanossistemas a partir de componentes moleculares encontrados endogenamente nos organismos, como as hemácias, torna-se promissor como tratamentos anticarcinogênicos alternativos e/ou complementares aos já existentes.

ABSTRACT

Due to the high mortality rate from cancer every year and because of the treatments commonly used cause severe adverse effects due to their action in healthy cells, there is a need for the search for more specific active agents towards tumor cells as well as the search for more efficient mechanisms of bioactive transport. In this sense the development of structured systems in erythrocytes becomes promising since these cells can provide the framework for transport as well as provide peptides with antitumor activity derived from hemoglobin hydrolysis. The aim of this study was to develop delivery systems of antitumor hemoglobin hydrolysate using erythrocytes as carriers and evaluate their *in vitro* effects on tumor cell lines (4T1) and normal mammalian (NIH3T3). The free hemoglobin hydrolysate and the hydrolysate encapsulated in hemoglobin-based red cell mimetic systems, liposomes, chitosan particles and chitosan particles with polyethylene glycol had their characteristics evaluated by atomic force microscopy, scanning electron microscopy, dynamic light scattering and their possible activities were tested against breast cancer cells and fibroblasts. The erythrocyte mimetics and liposomes also showed negative surface charge and proved to be colloiddally unstable and additionally presented micrometric and nanometric sizes, respectively. The tryptic hydrolysate of free hemoglobin did not significantly decrease the *in vitro* viability of 4T1 and NIH3T3 cells. The erythrocyte mimetics in the absence and presence of hemoglobin hydrolysate showed irregular shapes, were micrometer-sized, displayed high polydispersity (0.66 to 1.0) and cytotoxicity against NIH3T3 cells (17%) in the absence of hemoglobin hydrolysate and against 4T1 cells in the presence of hydrolyzed hemoglobin. All other systems presented nanometric sizes (liposomes and chitosan-based), polydispersity in the range 0.34 to 1.0, and good colloidal stability (± 40 to $>\pm 60$). Chitosan and chitosan particles with PEG showed positive surface charge and high colloidal stability. All systems showed nanosized encapsulation rate between 78-89%, and the liposomes induced greater decrease in viability (51%, $P < 0.05$) of 4T1 cells. From the results, it was observed that although most of the tested systems have not significantly altered the viability of tumor cells, the development of nanosystems using building-blocks endogenously found in organisms, such as red blood cells, is a promising strategy as alternative and / or complementary anticarcinogenic treatments.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Câncer

O câncer provavelmente existe desde a origem da humanidade, uma vez que as primeiras descrições conhecidas relacionam-se a datas remotas. A mais antiga descrição conhecida de câncer humano foi encontrada em papiros egípcios datados como tendo sido escritos entre 3000-1500 a.C., os quais contêm detalhes de condições que são consistentes com as descrições modernas de câncer, e descrevem casos de tumores de mama, além de relatarem que não existiam tratamentos para esta condição e recomendavam apenas o uso de cauterização como paliativo. Adicionalmente, lesões de câncer foram encontradas nos restos do crânio de uma mulher que data de 1900-1600 a.C. Restos de esqueletos Incas encontrados no Peru, os quais datam de aproximadamente 2400 anos atrás, continham anormalidades sugestivas de envolvimento com melanoma maligno (*AMERICAN CANCER SOCIETY*, 2012).

Hipócrates, grande médico grego (460-370 a.C.), conseguiu reconhecer claramente a diferença entre tumores benignos e malignos. Seus escritos também incluíram a descrição de cânceres que envolviam vários locais do corpo, e nomeou os tumores os quais podiam ou não evoluir para ulceração como doença de Karkkinos (nome grego do caranguejo). No curso da história, médicos de Constantinopla, Cairo, Alexandria e Atenas explicavam a causa do câncer como sendo resultado de um excesso do que denominaram bílis negra (*KARDINAL & YARBRO*, 1979).

A partir do século XV, com o avanço nos conhecimentos de anatomia e fisiologia do corpo humano, ocorreram avanços em cirurgias e o desenvolvimento de terapias racionais baseadas em observações clínicas. Durante o século XVI, perdurou a teoria da bílis negra, apesar de ter ocorrido o aparecimento de uma série de cremes e pastas contendo arsênio para aplicação local (*KARDINAL & YARBRO*, 1979).

O advento das autópsias, ampliando a visão a respeito do sistema circulatório; e a descoberta do sistema linfático, no século XVII, acarretaram no fim da teoria da bílis negra como a causa do câncer. Dessa forma, surgiu uma nova teoria que sugere as anormalidades no sistema linfático como a principal causa de câncer. O tumor surgia localmente como uma massa rígida, em crescimento, sendo esse não tratável com drogas, e deveria ser removido com todos os seus "filamentos" (OLSZEWSKI, 2010).

No século 18, foram dados os primeiros passos rumo ao surgimento da oncologia experimental, a qual foi seguida por muitos médicos desde então, sempre visando à busca por melhores diagnósticos, prognósticos, tratamentos e compreensão das causas do câncer. Nesse período, também foi sugerido que alguns cânceres poderiam ser curados por cirurgia e foram descritos métodos pelos quais era possível determinar os tumores cirurgicamente removíveis, ou seja, aqueles que eram passíveis de remoção caso ainda não tivesse invadido o tecido adjacente (OLSZEWSKI, 2010).

A descoberta da anestesia no século XIX possibilitou a realização de operações clássicas de cirurgia como, por exemplo, a mastectomia total. Além disso, com o avanço na tecnologia dos microscópios, foi possível a realização de estudos detalhados sobre a morfologia das células cancerosas os quais identificaram diferenças na morfologia dessas células em comparação com as células normais circundantes que lhes deram origem. Nessa época surgiu a patologia celular, e então passou a ser possível avaliar a margem cirúrgica após a retirada do tumor e o patologista era capaz de dizer ao cirurgião se o procedimento havia removido o tumor completamente (*AMERICAN CANCER SOCIETY*, 2012).

No século XX, pesquisadores sugeriram diferentes teorias para a origem do câncer, submetendo suas hipóteses para a investigação sistemática e experimentação. Como resultado foi identificada a existência de muitos agentes químicos, físicos e

biológicos capazes de levar ao desenvolvimento de células cancerígenas, sendo que neste período ocorreu uma melhora significativa na compreensão dos mecanismos relacionados ao crescimento e divisão celular, identificação de fatores que reprimem e ativam estes processos, bem como possibilitar avanço significativo nas formas de tratamento levando ao aumento da sobrevida dos pacientes.

Nas últimas décadas, o câncer ganhou uma dimensão maior, convertendo-se em um evidente problema de saúde pública mundial. A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima a ocorrência, para o ano de 2030, de cerca de 27 milhões de novos casos incidentes, 17 milhões de mortes e 75 milhões de pessoas vivendo com algum tipo de câncer (INCA, 2011).

Atualmente, a palavra câncer é utilizada para designar um conjunto de mais de cem doenças que possuem em comum pelo menos o crescimento desordenado de células, que invadem tecidos e órgãos (INCA, 2011). As causas de câncer são as mais diversas, sendo estas externas, referindo-se ao ambiente e aos hábitos ou costumes próprios de uma sociedade, ou internas, as quais na maioria das vezes são geneticamente pré-determinadas, como erros em mecanismos de reparo que podem estar relacionados à capacidade do organismo de se defender das agressões externas (INCA, 2011).

Neoplasia, conhecida popularmente como tumor, corresponde a uma proliferação anormal do tecido, que evade parcial ou totalmente ao controle do organismo e tende à autonomia e à perpetuação, com efeitos agressivos sobre o hospedeiro (PÉREZ-TAMAYO, 1985; COLLINS *et al.*, 2000). Tumores em geral apresentam uma densidade vascular diminuída em relação aos tecidos normais (HANAHAN *et al.*, 2011). Os tecidos tumorais possuem número significativo de *shunts* (desvios sanguíneos) arteriovenosos. Esses *shunts* são responsáveis pela menor

resistência ao fluxo, e facilitam a passagem direta de sangue do suprimento arterial para a drenagem venosa sem a passagem por capilares sanguíneos (FERREIRA, 2006). Esta característica tem sido levada em consideração para inúmeras abordagens terapêuticas.

O tratamento de patologias neoplásicas tem sido baseado atualmente principalmente em cirurgia, quimioterapia e radioterapia. Contudo, essas intervenções não são seletivas para as células tumorais, atingindo também muitas células normais e levando a severos efeitos adversos, que resultam em desfiguração do paciente, alterações gastrointestinais e alopecia (ALVES *et al.*, 2004). Sendo assim, o desenvolvimento de formas alternativas de terapias para o tratamento de neoplasias faz-se necessário no intuito de melhorar as formas convencionais de tratamento, visando a minimizar efeitos adversos o que reflete em uma melhor qualidade de vida dos pacientes. Nesse sentido, grandes avanços tem sido possíveis com a utilização da nanobiotecnologia.

1.2 Nanobiotecnologia e o câncer

A nanotecnologia relaciona-se ao entendimento, ao controle e a exploração de materiais e sistemas cujas estruturas e componentes apresentam propriedades e fenômenos físicos, químicos e/ou biológicos que são significativamente novos e/ou modificados devido à sua escala nanométrica (1-100 nm) (NSF, 2012). Quando a nanotecnologia é aplicada nas ciências da vida, recebe a denominação nanobiotecnologia, onde uma de suas vertentes busca principalmente o desenvolvimento de novos fármacos, bem como o desenvolvimento de sistemas eficientes e específicos na administração de medicamentos (*drug delivery systems* ou sistemas de entrega de drogas).

Nas últimas décadas têm crescido consideravelmente o interesse pelo desenvolvimento de sistemas de liberação sustentada e entrega de fármacos, devido à necessidade de medicamentos seguros e capazes de atingir o alvo, minimizando assim os efeitos adversos. Estes sistemas, em geral, podem ser utilizados para proporcionar a entrega dirigida (celular ou tecidual) de fármacos, aumentar o tempo de permanência na circulação de forma que sua dose se mantenha dentro da janela terapêutica e aperfeiçoar a biodisponibilidade. Além disso, os sistemas de entrega podem ser adaptados para proteger os agentes terapêuticos contra a degradação enzimática, por exemplo, nucleases e proteases (GE *et al.*, 2002). Alguns sistemas podem ainda extravasar através do endotélio em sítios inflamatórios, epitélio, tumores e penetrar em microcapilares (SINGH & SINGH, 2009).

Os sistemas de transporte de fármacos são baseados em duas principais estratégias de entrega: ativo ou passivo. No sistema passivo o fármaco é carregado por transportador biocompatível o qual circula pela corrente sanguínea e são acumulados dentro do tumor por meio do efeito de permeabilidade e retenção aumentada (*enhanced permeability and retention* (EPR)) (GANTA *et al.*, 2008). No sistema ativo o carreador possui conjugado a ele um ligante o qual reconhece especificamente marcadores expressos pelas células que se pretende atingir. A liberação do fármaco no alvo específico ocorrerá em resposta a algum estímulo específico seja ele biológico ou externo (GANTA *et al.*, 2008).

Atualmente, existem diversos sistemas de transporte e entrega de ativos, desde conjugação com macromoléculas solúveis (tais como anticorpos monoclonais, polímeros sintéticos, polissacarídeos e polímeros naturais biodegradáveis) ou estruturas mais complexas constituídas por multicomponentes incluindo micro- e nanocápsulas,

micro- e nanopartículas, lipoproteínas, lipossomos e até mesmo hemácias (GUPTA *et al.*, 2010)

1.3 Hemácias

Hemácias, também conhecidas como glóbulos vermelhos ou eritrócitos, foram provavelmente observadas pela primeira vez ao microscópio em 1658, pelo naturalista holandês, Jan Swammerdam (1637-1680). Em 1665, outro microscopista holandês, Anton van Leeuwenhoek (1632-1723), descreveu o tamanho e forma das hemácias e compôs a primeira ilustração (HAJDU, 2003).

As hemácias são células que fazem parte da constituição do tecido sanguíneo. São originadas na medula óssea mieloide a partir de células precursoras denominadas proeritroblastos por meio de um processo denominado eritropoiese (ROZENBERG, 1997). Após sucessivas divisões celulares inicia-se o processo de maturação das células. As hemácias completamente formadas são liberadas na corrente sanguínea onde permanecem circulando no organismo por aproximadamente 120 dias (BECK, 1991). Após esse período, estas células são sequestradas por macrófagos e degradadas principalmente pelo baço e fígado (COTTER, 2001).

Estudos envolvendo hemácias têm sido realizados em diversas áreas do conhecimento, incluindo biologia, medicina e veterinária. Por esse motivo, muitos relatos descrevem as formas e dimensões típicas observadas para hemácias de diversas espécies (HARTMAN, 1964; BENGA *et al.*, 2000). Na maioria dos mamíferos (exceto camelídeos - elipsoidais), as hemácias circulantes nos indivíduos adultos são discos bicôncavos anucleados, com medidas de diâmetro médio e volumes variados (Figura 1). Possuem membrana plasmática formada por dois componentes moleculares principais: proteínas e lipídeos, principalmente fosfolipídeos e colesterol, os quais são responsáveis

pela alta plasticidade dessas células, e citoplasma rico em hemoglobina. As hemácias possuem como principal função o transporte de O₂ dos pulmões para os tecidos e de CO₂ produzido nos tecidos de volta para os pulmões, tornando-se um sistema de transporte altamente especializado.

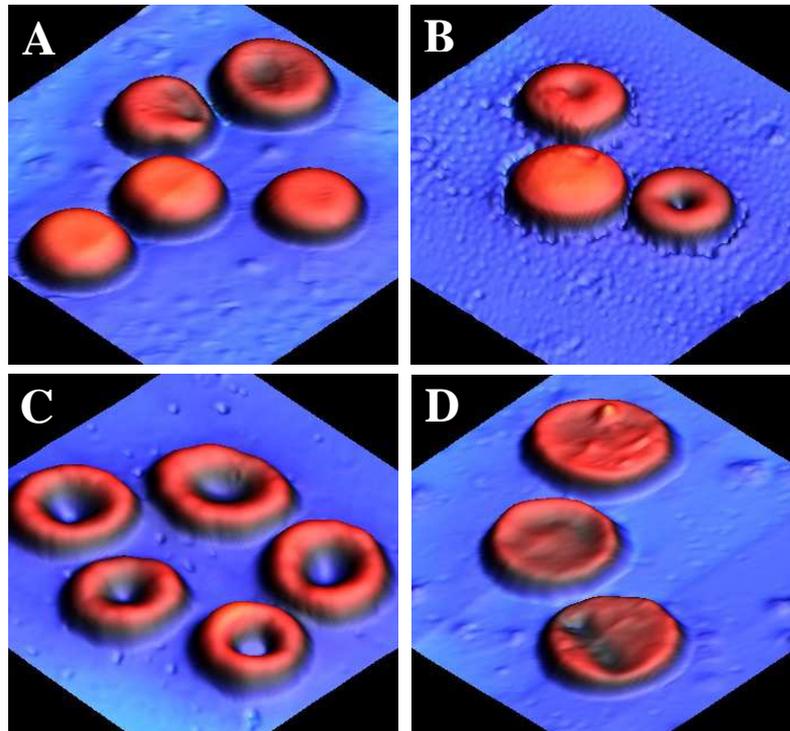


Figura 1. Imagens topográficas tridimensionais de hemácias de diferentes espécies de mamíferos obtidas por microscopia de força atômica (MFA) em modo contato. Bovina (A), camundongo (B), coelho (C) e humana (D). Áreas de 26,6 μm \times 26,6 μm .

Nesse sentido, estudos referentes à fisiologia normal e características estruturais de hemácias têm possibilitado a oportunidade de utilizá-las como sistema de armazenamento e liberação de agentes bioativos. Este interesse se deve ao fato destas células apresentarem a capacidade de circular por todo o corpo, podendo direcionar a droga para o sistema reticuloendotelial; biocompatibilidade, diminuindo assim a toxicidade; imunogenicidade baixa; cinética de liberação de ordem zero, na qual a droga é liberada gradativamente; biodegradação, sendo eliminado pelas vias metabólicas normais pelo baço e fígado; e facilidade de preparação, devido ao seu fácil isolamento e

uma maior quantidade de droga que pode ser encapsulada em um pequeno volume de células (GOTHOSKAR, 2004; SAH *et al.*, 2011; SHASHANK, 2011).

Devido a estas características, hemácias possuem grande potencialidade para realizar o transporte e entrega de drogas (CINTI *et al.*, 2011). Diversas drogas já foram encapsuladas em estruturas de hemácias dentre elas estão a dexametasona (OGIOSO *et al.*, 1989) e a insulina (BIRD *et al.*, 1983).

Dessa forma, as hemácias tornam-se grandes candidatas para realizar o transporte de peptídeos bioativos oriundos de plantas e animais, como por exemplo, antitumorais, analgésicos, antibióticos, hormônios, vacinas, dentre outros.

1.4 Lipossomos

Outra classe de sistema de entrega de ativos os quais podem armazenar princípios ativos antitumorais são os lipossomos. Lipossomos são vesículas esféricas constituídas por uma ou várias bicamadas concêntricas lipídicas que isolam um ou vários compartimentos aquosos internos do meio externo (TORCHILIN, 2005), podendo ser utilizados para carrear compostos de natureza hidrofóbica ou hidrofílica.

Os lipossomos possuem suas propriedades físicas e químicas como carga, permeabilidade e hidrofobicidade baseadas nas características dos fosfolídeos os quais podem ser naturais ou sintéticos. A maioria dos lipossomos são biologicamente inertes e biocompatíveis (TORCHILIN, 2007; MALAM *et al.*, 2009). Os lipossomos que contém apenas uma única bicamada lipídica em torno do compartimento aquoso interno são classificados como unilamelares e os que apresentam bicamadas múltiplas são denominados multilamelares (Figura 2). Quanto ao tamanho, as vesículas unilamelares podem ser pequenas ou grandes, sendo caracterizadas como lipossomos unilamelares pequenos e lipossomos unilamelares grandes. As pequenas vesículas unilamelares

possuem cerca de 100 nm, enquanto que as grandes vesículas unilamelares apresentam tamanho variando entre 200-800 nm. Já os lipossomos multilamelares variam em tamanho de 500 a 5000 nm e consistem de várias bicamadas concêntricas (TORCHILIN, 2005).

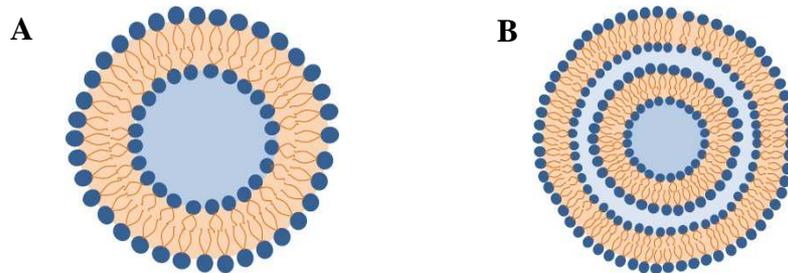


Figura 2. Representação de lipossomos. (A) Lipossomo unilamelar. (B) Lipossomo multilamelar.

1.5 Nanopartículas Poliméricas

Ainda como sistemas de armazenamento e transporte de ativos antitumorais existem uma ampla gama de nanopartículas, dentre as quais se encontram as poliméricas. As nanopartículas constituídas por polímeros biodegradáveis têm sido utilizadas para liberação de drogas devido a sua alta biocompatibilidade e biodegradabilidade. Os polímeros utilizados para desenvolvimento e a síntese desses nanossistemas podem ser de origem sintética ou natural. Nesse sentido, a utilização da quitosana, um polímero natural derivado de conchas de crustáceos, como caranguejos, camarões e lagostas (TIYABOONCHAI, 2003).

A quitosana é um polissacarídeo modificado obtido pela N-desacetilação parcial da quitina, sendo um biopolímero natural. Quitosana tem sido utilizada na formulação de nanodispositivos para a entrega de fármacos devido ao fato de ser hidrossolúvel, apresentar biocompatibilidade, ser biodegradável, atóxico e de baixo custo, além de

apresentarem cargas positivas. Adicionalmente, quitosana tem sido utilizada na formulação de sistema visando à entrega de drogas (LI, *et al.*, 2009).

1.6 Peptídeos bioativos

Os ativos utilizados como fármacos em diversas intervenções terapêuticas, incluindo o tratamento do câncer, podem ser classificados quimicamente ou funcionalmente e a sua escolha constitui um passo fundamental nas abordagens quimioterapêuticas. Dentre os compostos que vem sendo estudados visando a inúmeras aplicações biomédicas podem ser citados os peptídeos. Peptídeos são polímeros curtos formados por monômeros de aminoácidos unidos entre si por ligações peptídicas. Os peptídeos de origem animal podem ser obtidos a partir de tecidos, secreções cutâneas, glândulas, peçonhas e sangue, ou derivados de processos de hidrólise parcial de proteínas.

A partir do sangue de diversos mamíferos, dentre eles o humano, tem sido proposto que a hemoglobina desempenha um papel essencial na formação de peptídeos endógenos (KERELIN *et al.*, 1995; IVANOV, *et al.*, 2000; 2005). Dentre eles se encontram alguns peptídeos com bioatividade conhecida como antimicrobiana (PARISHI *et al.*, 2001; LIEPKE *et al.*, 2003), analgésica (TAKAGI *et al.*, 1982), opióide (BRANTL *et al.*, 1986) e antitumoral (SONG, 2012).

Peptídeos oriundos da hidrólise da molécula de hemoglobina exibem uma variedade de atividades fisiológicas sendo que os efeitos são realizados predominantemente ao nível de tecido e célula, tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Dentre as potenciais atividades que podem ser exploradas no tratamento contra células tumorais estão, inibição da proliferação celular e indução de citólise. Dessa forma, esses

peptídeos possuem potencial para serem utilizados na regulação do número de células do tumor (IVANOV, *et al.*, 2000).

1.7 Hemoglobina

A estrutura da hemoglobina é a mesma na maior parte dos vertebrados, sendo formada por duas cadeias α e duas cadeias β constituindo aproximadamente 98% do conteúdo proteico intracelular das hemácias. A síntese de hemoglobina nas hemácias é concluída antes da degradação ribossomal, durante o fim do desenvolvimento dos reticulócitos (hemácias imaturas). Hemácias maduras sofrem processo de exocitose nuclear (perdem seus núcleos) e perdem todos os compartimentos intracelulares permitindo maximizar o espaço disponível para hemoglobina intracelular acumulada (NYBERG *et al.*, 1997).

Interessantemente, há pelo menos 40 anos a literatura científica reporta a presença de peptídeos bioativos oriundos de fragmentos formados a partir da hidrólise parcial das cadeias α e β da hemoglobina.

O primeiro peptídeo com atividade biológica de liberador de hormônio de crescimento, gerado a partir da hemoglobina, foi descrito em 1971 por SCHALLY e colaboradores. Desde então, dezenas de outros peptídeos bioativos foram descritos a partir de hemoglobina de mamíferos aos quais foram atribuídas as mais variadas funções, tais como analgésica (TAKAGI *et al.*, 1982), antimicrobiana (PARISH *et al.*, 2001; LIEPKE *et al.* 2003), estimulante de crescimento bacteriano (ZHAO, 1996), opióide (SONG *et al.*, 2012) e anticâncer (SONG, *et al.*, 2012).

Dessa forma, as hemácias podem fornecer componentes moleculares os quais podem ser utilizados para a formação de dispositivos de transporte (hemácia vazia), bem como geração de peptídeos bioativos endógenos (hidrolisado de hemoglobina),

para a aplicação terapêutica no organismo alvo, inclusive para terapêutica dos diversos tipos de câncer (Figura 3).

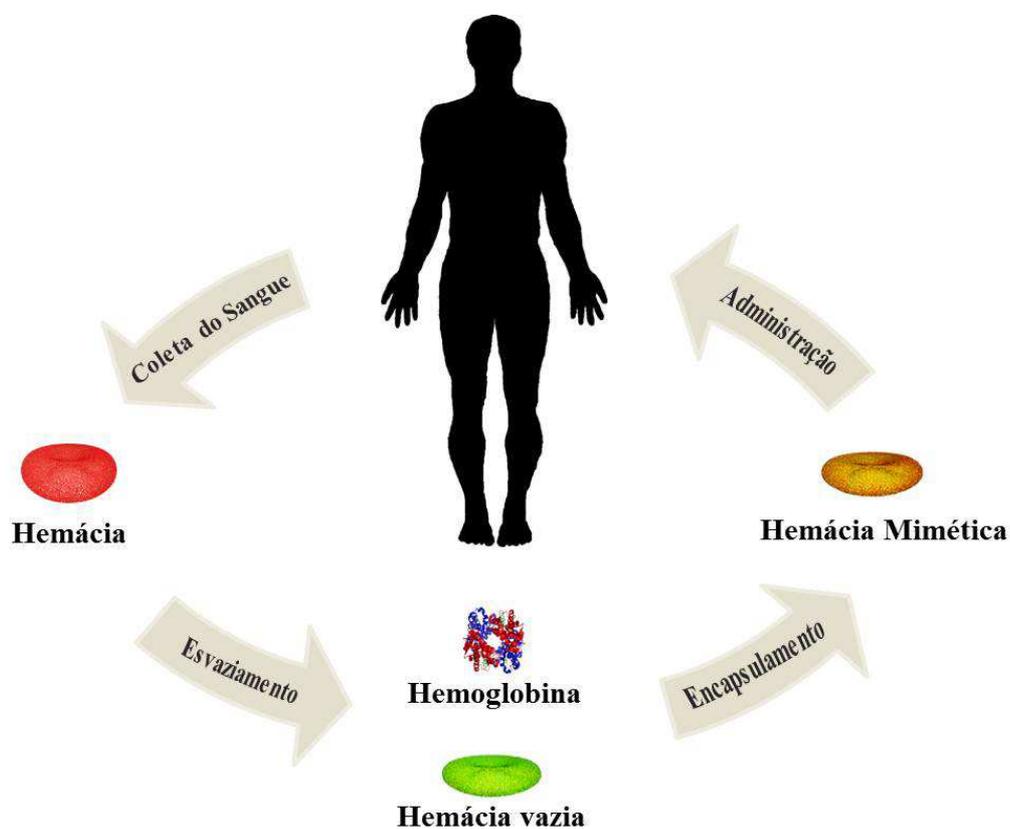


Figura 3. Esquema representativo da utilização de hemácias como fornecedor de componentes moleculares e para aplicação terapêutica.

2. JUSTIFICATIVA

Anualmente, milhares de pessoas no mundo vão a óbito vítimas dos mais diversos tipos de câncer. Os tratamentos frequentemente utilizados como a cirurgia, quimioterapia e radioterapia causam efeitos adversos severos devido à sua atuação sobre células saudáveis, uma vez que os medicamentos não apresentam seletividade, ou seja, afetam além das células tumorais, células saudáveis do organismo (MEDEIROS, 2011). Com base nisso, faz-se necessária a busca por novos agentes ativos, bem como a busca por mecanismos de armazenamento, transporte e liberação mais eficiente que visem diminuir ou mesmo eliminar esses possíveis efeitos adversos.

Nesse sentido, a utilização de hemácias como uma nova estratégia para o tratamento do câncer torna-se bastante promissora, pois essas células além de atuarem como transportadores naturais, dentro do organismo, ainda são constituídas majoritariamente por hemoglobina, molécula esta capaz de gerar peptídeos antitumorais endógenos. Sendo assim, dispositivos antineoplásicos baseados em hemácias poderão apresentar uma biocompatibilidade alta e imunogenicidade baixa; poderão ser direcionados dentro do sistema reticuloendotelial; possibilitarão a liberação gradativa da droga; permitirão a biodegradação; e isto tudo associado à facilidade de obtenção e preparação, uma vez que essas células são encontradas em grande quantidade no organismo; quando comparados a outros sistemas de liberação de drogas.

Para tal, é necessário desenvolver estudos visando à caracterização dessas células antes e após o esvaziamento, bem como desenvolver mecanismos de obtenção de peptídeos derivados de hemoglobina, os quais sejam testados quanto à possível atividade anticâncer para que as condições selecionadas sejam encapsuladas em hemácias ou em vesículas derivadas de hemácias para que os mesmos possam ser transportados e liberados de forma sustentada no organismo alvo.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Desenvolver sistemas de liberação e entrega de hidrolisados de hemoglobina antitumorais utilizando hemácias e avaliar seus efeitos sobre linhagens de células tumorais e normais de mamíferos, *in vitro*.

3.2 Objetivos Específicos

→ Obter peptídeos com atividade antitumoral por meio de hidrólise a partir de hemoglobina;

→ Investigar formas de aprisionamento de hidrolisados de hemoglobina em miméticos de hemácias;

→ Desenvolver sistemas de transporte e liberação de hidrolisados de hemoglobina antitumorais baseados em miméticos de hemácias;

→ Caracterizar a estrutura das hemácias intactas e estruturas formadas após o esvaziamento das mesmas quanto ao tamanho, forma e carga de superfície;

→ Investigar metodologias de aprisionamento de hidrolisados de hemoglobina antitumorais em sistemas de liberação baseados em miméticos de hemácias;

→ Comparar o sistema de transporte baseado em hemácias com sistemas de transporte de base lipossomal e polimérica;

→ Analisar os efeitos dos sistemas de liberação sobre a viabilidade de linhagens celulares de câncer de mama (4T1) e normal (NIH3T3), *in vitro*.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Equipamentos, Materiais e Reagentes utilizados

4.1.1 Equipamentos: Agitador magnético (IKA RH Basic 2- Japão); Agitador de Tubos (Vortex-Genie); Balança Analítica (DENVER Instrument Company - AA 200, EUA); Câmara de Neubauer (C. A. Hauser & Son, EUA); Centrífuga refrigerada (Quimis); Cromatógrafo líquido de alta eficiência - HPLC (Shimadzu, JAP); Espectrofotômetro UV/Vis; Extrusor (Avanti Polar Lipids, EUA); Estufa (THERMO, Scientific - USA); Fluxo Laminar Unidirecional (CFLV12, Brasil) Leitora de microplacas (Biotek, EUA); MALDI-TOF/MS UltraFlex III (Bruker Daltonics); Metalizador de amostras (Balzers, Liechtenstein); Microscópio de luz invertido (Único, EUA); Microscópio de força atômica (Shimadzu, JAP); Microscópio eletrônico de varredura JSM 700-1F (JEOL, Japão); Rotaevaporador (Buchi - Suíça); Nano ZetaSizer (Malvern, ING).

4.1.2 Materiais: Balão para rotaevaporação Kimble/ Kontes (Fisher Scientific, EUA); Coluna Semipreparativa de fase reversa (NST C₁₈); Criotubos (tpp, ALE); Filtro Amicon Ultra 100 kDa (Millipore, EUA); Frascos de cultura (tpp, ALE); Garrafas de cultura 25 cm² e 75 cm² (tpp, ALE), Lamínulas de vidro (Perfecta, BRA); Membranas de poros de 0,22 µm (tpp, ALE); Placa de MALDI do tipo MTP Massive (Bruker Daltonics, ALE); Placas de 96 poços de fundo chato (tpp, ALE); Seringas 1,0 e 5 mL; Microtubos tipo eppendorf de 0,6, 1,5 e 2,0 mL (Axygen, EUA); Tubos tipo Falcon de 15 e 50 mL (tpp, ALE).

4.1.3 Reagentes: Acetonitrila (Sigma-Aldrich Co., EUA); Ácido acético (Vetec Química Fina Ltda, BRA); Ácido trifluoroacético (Sigma-Aldrich Co., EUA); Ácido alfa-cyano-4-hidroxi-cinânimo (Bruker Daltonics, ALE); Anestésico Quetamina

(Synteh, EUA); Anestésico xilazina (Bayer, EUA); Antibiótico (Penicilina e Estreptomicina) (Gibco, EUA); Azul de Tripán (Sigma-Aldrich Co., EUA); Cloreto de Sódio (Merck, ALE); Coquetel de Inibidor de Proteases (Amresco EUA); Dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma-Aldrich Co., EUA); Clorofórmio (JTBaker, EUA); DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's); Metanol (JTBaker, EUA); Hemoglobina (Merck, ALE); MTT (3(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (Invitrogen, EUA); PEG 2000 (Polietilenoglicol, Sigma-Aldrich); Quitosana (Sigma-Aldrich); Tripolifosfato de Sódio (TPP, Sigma-Aldrich); Soro fetal bovino (Gibco, EUA), Tampão fosfato-salina (PBS) (Laborclin, BRA), Tripsina (Sigma-Aldrich Co., EUA), Tripsina-EDTA (0,25 e 0,02%) (Gibco, EUA)

4.2 Obtenção de Sangue

4.2.1 Coleta de sangue dos animais

Camundongos Balb/C, fêmeas com 2-3 meses de idade, foram acondicionados em gaiolas e mantidos em condições controladas de luz (ciclo de 12 horas de claro/escuro), temperatura (23°C) e umidade (55%), no Biotério do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília. Antes do período experimental, os animais receberam água e ração *ad libitum*.

Os animais foram anestesiados utilizando a combinação de duas drogas: 70 µL de quetamina 10 % (Dopalen) e 40 µL de xilazina 2% (Anasedan). Sangue periférico foi coletado por meio de punção cardíaca. Em todos os casos, o sangue coletado (1 mL) foi imediatamente adicionado a um tubo contendo solução anticoagulante, 0,1% de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA). Alíquotas do sangue foram mantidas a 4°C por até no máximo 24h até o uso. O projeto foi desenvolvido com a aprovação pelo comitê de ética do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília.

4.3 Mecanismo de esvaziamento das hemácias

4.3.1 Retirada do soro

Um mililitro de sangue foi submetido a processo de centrifugação a 120 g à 4°C por 10 minutos, e aproximadamente 400 µL de soro foram retirados e descartados. Posteriormente, 600 µL de *pellet* foram lavados com tampão fosfato de sódio (PBS) 100 mM, e submetidos novamente a processo de centrifugação a 120 g à 4°C por 10 minutos e o sobrenadante descartado, sendo o procedimento repetido duas vezes, sendo deixado um volume final de aproximadamente 800 µL.

4.3.2 Esvaziamento das hemácias

Os 800 µL de plasma lavados com PBS foram divididos em quatro alíquotas de 200 µL. A cada alíquota foram adicionados 800 µL de solução hipotônica em diferentes concentrações de cloreto de sódio (NaCl), 0,25%, 0,50% e 0,75%, e deixadas incubando por 10 minutos a 4°C. No grupo controle, a uma das alíquotas foram adicionados 800 µL de água ultrapura. Em seguida, as amostras foram submetidas à centrifugação a 120 g à 4°C por 5 minutos. Os sobrenadantes foram coletados e submetidos à avaliação por espectrofotometria de absorção. Os *pellets* contendo as estruturas obtidas a partir do esvaziamento foram armazenados a 4°C por 72 h.

4.3.3 Avaliação indireta das hemácias

Depois de submetido ao processo de lavagem 10 µL do plasma foram incubados, em uma placa de 96 poços, com 190 µL de água, PBS ou diferentes soluções hipotônicas em diferentes concentrações de NaCl 0,50% ou 0,75% e monitorados durante 2 horas por espectroscopia de absorção no comprimento de luz visível (630 nm).

4.3.4 Quantificação de hemoglobina liberada

A quantificação da hemoglobina liberada foi realizada por avaliação espectrofotométrica de absorção nos comprimentos de 540 nm (desoxihemoglobina) e 580 nm (oxihemoglobina). Para o cálculo da concentração final considerou-se o fator de diluição, quando necessário.

4.4 Peptídeos antitumorais

4.4.1 Obtenção dos peptídeos

Hemoglobina obtida a partir do esvaziamento das hemácias com as diferentes soluções salinas, descritas anteriormente, foi submetida à variação de pH e processos de hidrólise enzimática visando a obter possíveis peptídeos com atividade biológica antitumoral.

O processo de hidrólise por variação de pH foi realizado utilizando soluções de pH 2 (cloreto de potássio (KCl) 0,2 M e ácido clorídrico (HCl) 0,2 M) e pH 12 (cloreto de potássio (KCl) 0,2 M e hidróxido de sódio (0,2 M) NaOH). Foram adicionados 20 µL da solução de pH básico ou ácido em 80 µL da alíquota contendo hemoglobina.

O processo de hidrólise enzimática foi realizado utilizando três diferentes endopeptidases imobilizadas tripsina, V-8 e pepsina Thermo Scientific. A tripsina cliva as ligações peptídicas no C-terminal dos resíduos dos aminoácidos básicos lisina e arginina; V-8 cliva ligações peptídicas no C-terminal dos resíduos dos aminoácidos ácidos aspártico e glutâmico; e a pepsina cliva preferencialmente o C-terminal de resíduos aromáticos.

Inicialmente, 10 µL da enzima imobilizada foram adicionados em 200 µL de tampão bicarbonato de amônio 100 mM, pH 8,2 e a solução contendo a enzima foi então centrifugada sendo o sobrenadante descartado, no intuito de retirar o inibidor

enzimático, o procedimento foi repetido 3 vezes. Posteriormente, 10 µL de cada enzima imobilizada foram adicionados a 90 µL da alíquota contendo hemoglobina em 90 µL tampão bicarbonato de amônio 50 mM, pH 8,2 por 72 h. Após esse período as amostras foram submetidas a processo de centrifugação por 1 min a 120 g e o sobrenadante livre de enzimas foi recolhido e congelado a -80°C até o uso.

Os peptídeos obtidos foram submetidos à técnica de cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (RP-HPLC), tiveram suas frações coletadas manualmente e posteriormente avaliadas em ensaios de viabilidade celular. Essas frações foram analisadas por meio de espectrometria de massa MALDI-TOF visando à determinação da massa molecular exata e identificação dos componentes moleculares.

4.4.2 Espectrometria de massa

Alíquotas das amostras totais obtidas pelo esvaziamento das células, bem como as submetidas aos diferentes processos de hidrólise enzimática foram co-cristalizadas com uma solução saturada de matriz constituída por ácido alfa-ciano-4-hidroxicinâmico (1:3, v/v) ou 1,5-diaminonaftaleno (DAN), depositadas em uma placa do tipo MSP 96 com 53 × 41 mm e deixada secar a temperatura ambiente. Os componentes tiveram suas massas moleculares determinadas utilizando um espectrômetro de massa MALDI-TOF MicroFlex (Bruker Daltonics, Alemanha) com calibração externa sob modo linear na faixa de m/z 2000-20000; e um espectrômetro de massa MALDI-TOF/TOF UltraFlex III (Bruker Daltonics, Alemanha) com calibração externa sob modo refletido e positivo na faixa de m/z 100-1000 e 600-4000, e realizando procedimento de MS/MS em modo LIFTTM, visando a fragmentação de íons precursores gerando espectros os quais apresentaram informações relacionadas à sequência de aminoácidos que compõe o

peptídeo, e ISD (*in-source decay* ou decaimento de íons na fonte) que corresponde a um processo de fragmentação que ocorre na fonte de íons.

4.4.3 Cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa - RP-HPLC

Hemoglobina hidrolisada enzimaticamente foi submetida a procedimento de fracionamento utilizando cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (RP-HPLC) em um equipamento HPLC Shimadzu LC-6AD/SPD-20A (Japão). As amostras liofilizadas foram ressuspensas em 1 mL de solução 0,1% de ácido trifluoroacético (TFA) e 300 µL foram injetadas em uma coluna semipreparativa NST Nano Separation Technology C₁₈ 250 × 10 mm, 0,5 µm. As frações foram eluídas sob gradiente linear de acetonitrila em 0,1% de TFA variando de 0 a 95% com fluxo contínuo de 1 mL/min. A leitura foi monitorada a 216 e 280 nm e as frações coletadas manualmente. Posteriormente, as frações foram secas em sistema *speed vacuum* e mantidas a -20°C. Posteriormente, as frações foram ressuspensas em 25 µL de água nanopura e analisadas por espectrometria de massa conforme descrito anteriormente.

4.5 Miméticos de hemácias

Para a formulação dos miméticos de hemácias foram utilizados dois protocolos.

Para o protocolo 1 foram utilizadas as estruturas formadas a partir do esvaziamento das hemácias, onde estas foram mantidas por 96 h a 4°C. Posteriormente, 400 µL das estruturas foram incubadas com 400 µL com o hidrolisado de hemoglobina liofilizados, por 30 minutos, à temperatura ambiente. Em seguida, foram adicionados 400 µL de PBS a 100 mM para o fechamento e subsequente selamento dos poros transientes formados nas vesículas expostas previamente às condições hipotônicas.

Para o protocolo 2, 800 μL de sangue foi centrifugado a 120 g à 4°C por 10 minutos e o soro foi descartado. Posteriormente, 500 μL do pellet foram transferidos para um microtubo de polipropileno e foram adicionados 500 μL de PBS 100 mM, centrifugado a 120 g à 4°C por 10 minutos e o sobrenadante foi descartado. Em seguida, foi adicionado 2 mL de NaCl 0,5%, homogeneizado brandamente e centrifugado a 120 g à 4°C por 10 minutos e o sobrenadante descartado. A partir do pellet, 25 μL foram adicionados a 975 μL de NaCl 0,5%. Depois, 500 μL foram separados e a ele foram adicionados 200 μL dos peptídeos diluído em água ultrapura, na concentração de 4,09 $\mu\text{g}/\text{mL}$, e 300 μL de PBS hipertônico 50 mM, para formação do mimético de hemácia com peptídeo. Para o mimético de hemácia sem o peptídeo foram substituídos os 200 μL do peptídeo por água ultrapura. Por fim as amostras foram incubadas a 37°C por 15 minutos.

4.6 Lipossomos

As hemácias também foram utilizadas para a obtenção de lipídeos (fosfolipídeos e colesterol) naturais presentes nas membranas. Hemácias, após o processo de esvaziamento, foram congeladas em nitrogênio líquido e liofilizadas, obtendo-se um pó de “fantasmas de hemácias” (hemácias esvaziadas) o qual foi armazenado a 4°C até o uso. Para extração dos lipídeos presentes nas membranas seguiu-se as seguintes etapas: 22,5 mg de pó de membranas de hemácias foi pesado em balança analítica e ressuspenso em 500 μL de água ultrapura formando uma solução homogênea. Em seguida foram adicionados 625 μL de clorofórmio, 1200 μL de metanol, 625 μL de clorofórmio, 625 μL de água, a adição de cada solvente foi seguida de agitação em vórtex por 5 minutos e por fim a amostra foi centrifugada por 3 minutos para a separação da fase de clorofórmio (orgânica) contendo os lipídeos. A fase orgânica,

contendo os lipídeos, foi coletada e acondicionada em um balão de vidro. Em seguida, a amostra foi submetida à rotaevaporação por uma hora, em banho à 40°C e pressão de 207 Pa, para evaporação do clorofórmio e conseqüentemente formação do filme lipídico. Para o desprendimento do filme foi adicionado 1,5 mL de peptídeos em solução salina 0,5% a uma concentração de 3,26 µg/mL e levado a agitação em vórtex. Para a diminuição do tamanho das vesículas a amostra foi submetida a processo de extrusão em membranas de 100 nm. A determinação da forma, do tamanho das vesículas, do índice de polidispersividade e da carga de superfície foram realizados por microscopia de força atômica, espalhamento de luz dinâmico e potencial zeta.

4.7 Nanopartículas de Quitosana

Partículas de quitosana foram preparadas utilizando a técnica de geleificação iônica descrita por CALVO e colaboradores (2007). Para o desenvolvimento das partículas primeiramente foi preparada uma solução de ácido acético 0,004 mol (4 µL de ácido acético em 4 mL de água ultrapura), a essa solução foram adicionados 5 mg de quitosana e essa foi agitada magneticamente por 2 horas a temperatura ambiente. Em seguida a solução foi filtrada em filtros com poros de 0,22 µm.

Uma solução contendo 4 mg de Tripolifosfato de Sódio (TPP, Sigma-Aldrich) foi dissolvido em 2 mL de água ultrapura. Por fim, foi transferido para um béquer 2 mL da solução de quitosana filtrada, 9,8 mg/mL de peptídeo e 500 µL de TPP pipetado gota a gota de forma lenta e constante, sob agitação magnética. A solução permaneceu sob agitação por 45 minutos formando as partículas. As partículas vazias foram desenvolvidas seguindo os mesmos passos sem a adição do hidrolisado de hemoglobina.

4.8 Nanopartículas de Quitosana e Polietilenoglicol (PEG)

As partículas de quitosana-PEG foram desenvolvidas seguindo a mesma técnica de geleificação iônica descrita anteriormente, sendo que o polietilenoglicol (PEG) foi adicionado a uma concentração de 9,8 mg/mL na solução final após a adição do TPP. As nanopartículas vazias foram desenvolvidas seguindo os mesmos passos sem a adição do hidrolisado de hemoglobina.

Tabela 1. Nomenclatura utilizada para os sistemas desenvolvidos.

Nome	Descrição
Mimético	Hemácia
Mimético-Pep	Hemácia e hidrolisado de hemoglobina
Lipossomo	Lipídeos extraídos de membranas de hemácias
Lipossomo-Pep	Lipídeos extraídos de membranas de hemácias e hidrolisado de hemoglobina
Quitosana	Quitosana
Quitosana-Pep	Quitosana e hidrolisado de hemoglobina
Quitosana-PEG	Quitosana + Polietilenoglicol
Quitosana-PEG-Pep	Quitosana + Polietilenoglicol e hidrolisado de hemoglobina

4.9 Eficiência de Encapsulamento

A eficiência de encapsulamento foi determinada para os lipossomos, partículas de Quitosana e Quitosana-PEG. Para a determinação da porcentagem de encapsulamento, primeiramente foi realizada separação dos componentes do hidrolisado de hemoglobina não encapsulados, para cada amostra. Os lipossomos com e sem peptídeos foram aplicados na parte superior de filtros tipo Amicon Ultra com limite de exclusão de 100 kDa, e as suspensões foram centrifugadas a 13000 g por 10 min à 4°C. A cada ciclo foram adicionados 250 µL de solução salina 0,5% para lavar os lipossomos e otimizar a remoção dos componentes do hidrolisado de hemoglobina livres. Após a centrifugação, os volumes da porção superior e inferior do filtro foram armazenados a 4°C e -80°C, respectivamente. As partículas de Quitosana e Quitosana-PEG foram

submetidas a procedimento semelhante, contudo sem a adição da solução salina durante os ciclos de centrifugação.

4.10 Caracterização estrutural das células intactas e estruturas formadas após o esvaziamento de hemácias

4.10.1 Microscopia de força atômica

As análises foram realizadas ao ar ambiente, sob temperatura de $\sim 25^{\circ}\text{C}$ utilizando um microscópio de força atômica Shimadzu SPM-9600 (Japão) equipado com um scanner com área máxima de varredura de $125\ \mu\text{m} \times 125\ \mu\text{m}$.

Cada amostra foi depositada sobre a superfície de mica antes da análise. Após alguns minutos de deposição e seca em ambiente protegido. Posteriormente, as amostras foram montadas em uma moeda metálica utilizando fita dupla-face sendo acondicionadas na base do equipamento.

O sangue total, vesículas obtidas a partir do esvaziamento das hemácias e miméticos de hemácias foram avaliadas em modo contato (topografia) utilizando cantilevers integrado com ponteiros piramidais de nitreto de silício com raio de curvatura $< 20\ \text{nm}$ e constante de mola de $\sim 0,15\ \text{N/m}$ sob força constante. Foram avaliadas áreas de $100\ \mu\text{m} \times 100\ \mu\text{m}$ com uma frequência de varredura de $1\ \text{Hz}$ ($100\ \mu/\text{s}$). Os lipossomos e partículas de quitosana em modo dinâmico, utilizando cantilever integrado com ponteira cônica de nitreto de silício recoberto com cobalto apresentado raio de curvatura de $40\ \text{nm}$, constante de mola de $5,5\ \text{N/m}$ e frequência de ressonância de $\sim 150\ \text{kHz}$, e frequência de varredura de $0,5\ \text{Hz}$. Foram avaliadas áreas de $10\ \mu\text{m} \times 10\ \mu\text{m}$.

As imagens foram adquiridas em uma resolução de 512×512 linhas e foram processadas para correção de plano de varredura com o módulo off-line do software que

acompanha o instrumento. Para cada amostra, as estruturas foram medidas por meio de segmentação individual utilizando o software de análise de partículas, os quais possibilitaram a obtenção de diversos parâmetros, dentre eles altura. As medidas de altura foram submetidas à distribuição de classes.

4.10.2 Microscopia eletrônica de varredura

As análises por microscopia eletrônica de varredura (MEV) foram realizadas em um equipamento JSM 700-1F (JEOL, Japão), no Laboratório de Microscopia Eletrônica da Universidade de Brasília. Esfregaço de cada amostra em lâminas de vidro foi montada em suportes de alumínio (*stubs*), utilizando uma fita adesiva dupla face. Em seguida, foi realizada secagem ao ponto crítico das amostras. Posteriormente, as amostras foram revestidas com ouro por pulverização catódica em Balzers - SCD 050 (Baltec, Áustria) a 21°C, em aproximadamente $2,6 \times 10^{-7}$ Pa por 180 s. Após o revestimento em ouro, as amostras foram analisadas com uma voltagem de 15 kV.

4.10.3 Espalhamento de luz dinâmico e determinação do potencial Zeta de superfície

O diâmetro hidrodinâmico das estruturas formadas foi determinado pela técnica de espalhamento de luz dinâmico (DLS) em equipamento Zetasizer Nano ZS utilizando laser He-Ne (4 mW) operando a 633 nm. Foram realizadas três medições, à temperatura ambiente, pH 7,0 e a detecção de dispersão de luz em um ângulo de 173°. O tamanho das partículas (diâmetro hidrodinâmico), polidispersividade (PdI), bem como o potencial zeta de superfície das mesmas foram obtidos por meio do software de análise do próprio equipamento.

4.11 Ensaio de atividade biológica

4.11.1 Manutenção das linhagens celulares

Duas linhagens celulares, câncer de mama murino - 4T1 e fibroblasto humano - 3T3, mantidas em nitrogênio líquido foram descongeladas. Quinhentos microlitros de meio contendo as células foram transferidos para uma garrafa de cultura de células de 60 mL contendo 5 mL de meio de cultura (89% de Meio Dulbecco Mem (DMEM), 10% de soro fetal bovino e 1% de antibiótico penicilina-estreptomicina, Invitrogen) onde permaneceram por 24 horas para aderência das células viáveis. Passado o tempo, o meio de cultura foi descartado e foram adicionados 2 mL de solução de tripsina-EDTA (tripsina, 0,25% com EDTA tetrassódico) para promover a remoção das células. A garrafa de cultura contendo as células foi levada a estufa a 37 °C e 35% de CO₂ por 3 minutos, e observada ao microscópio óptico invertido para confirmar a remoção das células aderidas à garrafa. Posteriormente, foram adicionados 3 mL de meio de cultura visando à neutralização da ação da tripsina sobre as células. A solução contendo as células foi transferida para um tubo de polipropileno de 15 mL e centrifugada a 750 g por 3 min. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* de células foi ressuscitado em 1 mL de meio de cultura, do qual 500 µL foram transferidos para uma garrafa de cultura de área 75 cm², contendo 10 mL de meio.

Durante todo o período experimental, as células tiveram o meio de cultura trocado e/ou foram tripsinizadas a cada 48 horas para evitar a confluência das células, mantendo assim a integridade e evitando morte celular.

4.11.2 Testes de atividade antitumoral *in vitro*

Ensaio de viabilidade celular foi baseado no método colorimétrico estabelecido por Mosmann (1983), que avalia a atividade metabólica das células quantificando a redução metabólica do MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-

difeniltetrazólio) por FADH₂ na presença de enzimas mitocondriais, como a succinato desidrogenase, resultando na produção de formazan, um produto de coloração azulada, no interior das células.

Linhagens de células tumorais, câncer de mama murino - 4T1 e fibroblasto humano - 3T3, foram cultivadas, em meio de cultura (89% de Meio Dulbecco Mem (DMEM), 10% de soro fetal bovino e 1% de antibiótico penicilina-estreptomicina, Invitrogen) por 24 h em placa de 96 poços na proporção 5×10^3 células/poço em estufa a 37 e 5% de CO₂. Em cada poço, foram adicionados 50 µL (a partir da máxima concentração) do hidrolisado de hemoglobina livre, estruturas baseadas em hemácias vazias, peptídeos encapsulados em sistemas baseados em hemácias, lipossomos e nanopartículas de Quitosana e Quitosana-PEG. Após 24 h de incubação, o meio de cultura foi retirado e foram adicionados, a cada poço, 150 µL de solução de MTT (15 µL de MTT 5 mg/mL diluídos em 135 µL de DMEM completo), e deixado em estufa por 2 h. Em seguida, a solução de MTT foi retirada e 200 µL de dimetilsulfóxido (DMSO) foram adicionados para solubilizar o formazan. A quantificação do formazan liberado foi realizada pela medida da absorbância da solução dos poços no comprimento de onda de 595 nm, em um espectrofotômetro conjugado a uma leitora de microplaca (SpectraMax, EUA).

A viabilidade celular foi determinada, em porcentagem, de acordo com a equação abaixo, onde A é a absorbância da amostra, B é a absorbância do branco e C é a absorbância do grupo controle.

$$\text{Viabilidade celular \%} = (A - B) \times 100 / (C - B)$$

4.11.3 Integridade da membrana plasmática

Integridade da membrana plasmática foi avaliada pelo ensaio de exclusão por corante azul tripan, onde as células foram contadas diferencialmente, sendo que células translúcidas foram consideradas com a membrana plasmática íntegra e, células coradas de azul com a membrana plasmática lesionada. Em seguida, a proporção de células coradas em azul em relação ao número total de células foi determinada. Para a realização do ensaio, foram plaqueadas 5×10^4 células por poço da linhagem 4T1, em média 24 horas após o plaqueamento, o meio foi retirado e, então, adicionou-se meio contendo hidrolisado de hemoglobina livre, partículas de Quitosana ou Quitosana Pep. Após 24h de tratamento as células foram coletadas por meio de tripsinização e uma alíquota de 10 μ L de células foi separada a qual foi adicionado 20 μ L de azul tripan. Em seguida, 10 μ L desta suspensão de células e azul tripan foram adicionados à câmara de Neubauer e as células foram contadas.

4.11.4 Proliferação celular

Após a remoção das células tratadas com o hidrolisado de hemoglobina livre, partículas de Quitosana ou Quitosana-Pep da placa de cultura elas foram homogeneizadas em meio de cultura. Dez microlitros dessa suspensão foram adicionados a 20 μ L de azul tripan. Dez μ L dessa suspensão foram depositados em câmara de Neubauer e o número total de células contidas foi determinado como descrito na fórmula a seguir:

$$N = n^\circ \text{ de células} / n^\circ \text{ de quadrantes} \times \text{diluição} \times 10^{-4}$$

4.12 Análise de perfil proteico por método Biotyper

Após a remoção das células tratadas com o peptídeo livre, partículas de Quitosana ou Quitosana-Pep da placa de cultura, 10 µL foram transferidos para um tubo de polipropileno.

Aos 10 µL de células foram adicionados 200 µL de PBS 100 mM seguida de centrifugação por 3 min a 750 g à 4°C e o sobrenadante foi descartado, visando a retirada do meio de cultura. Em seguida, 100 µL de bicarbonato de amônio 50 mM foram adicionados, e as células foram centrifugadas por 3 min a 750 g à 4°C e o sobrenadante foi descartado. Ao *pellet* foram adicionados 30 µL de água ultrapura para solubilização dos compostos hidrossolúveis e levado a agitação em vórtex por 1 min, seguida da adição de 300 µL de etanol e novamente agitação em vórtex por 1 min, seguida de centrifugação a 11000 g por 1 min a 20°C. O sobrenadante foi descartado ao máximo. Posteriormente foram adicionados 10 µL de solução aquosa de ácido fórmico 70% e 10 µL de acetonitrila e o *pellet* de células foi homogeneizado por agitação em vórtex. Logo, a amostra foi novamente centrifugada a 11000 g por 1 min a 20°C. Os sobrenadantes contendo as proteínas foram co-cristalizadas com uma solução saturada de matriz constituída por ácido alfa-ciano-4-hidroxicinâmico (1:2), depositadas em uma placa do tipo MSP 96 com 53 × 41 mm e deixadas secar a temperatura ambiente. Os componentes tiveram suas massas moleculares determinadas utilizando um espectrômetro de massa MALDI-TOF MicroFlex (Bruker Daltonics, Alemanha) utilizando calibração externa sob em modo linear na faixa de m/z 2000-20000.

Para cada uma das medições em triplicata, os espectros foram manualmente inspecionados e unificados para geração de um espectro principal (MSP). A partir dos MSP's gerados foi gerado um dendrograma pelo método padrão de criação MALDI Biotyper (Bruker Daltonics, ALE).

4.13 Análise estatística

Os resultados obtidos foram representados como média \pm erro padrão da média (E.P.M.) utilizando programa OriginPro 8.0 para obtenção de gráficos. A determinação das diferenças estatisticamente significativas entre os grupos foi feita utilizando o programa PAST (HAMMER, 2001) por análise de variância (ANOVA) com teste estatístico de Tukey, com um nível de significância fixado em $P < 0,05$.

5. Resultados

5.1 Obtenção de material biológico para a formação de nanossistemas

5.1.1 Avaliação indireta da liberação de hemoglobina das hemácias

O monitoramento por espectrofotometria de absorção das hemácias na presença de água, PBS, NaCl 0,50% e 0,75% indicou alterações nos perfis de turbidez no meio (Figura 4). Em água não ocorreu alteração na turbidez, uma vez que essa se manteve baixa e constante durante todo o período de monitoramento, indicando assim uma possível lise celular instantânea. Já em PBS, NaCl 0,50% e 0,75% ocorreu uma diminuição da turbidez após às 2 h de incubação, indicando assim a presença de células alteradas e possível liberação de hemoglobina.

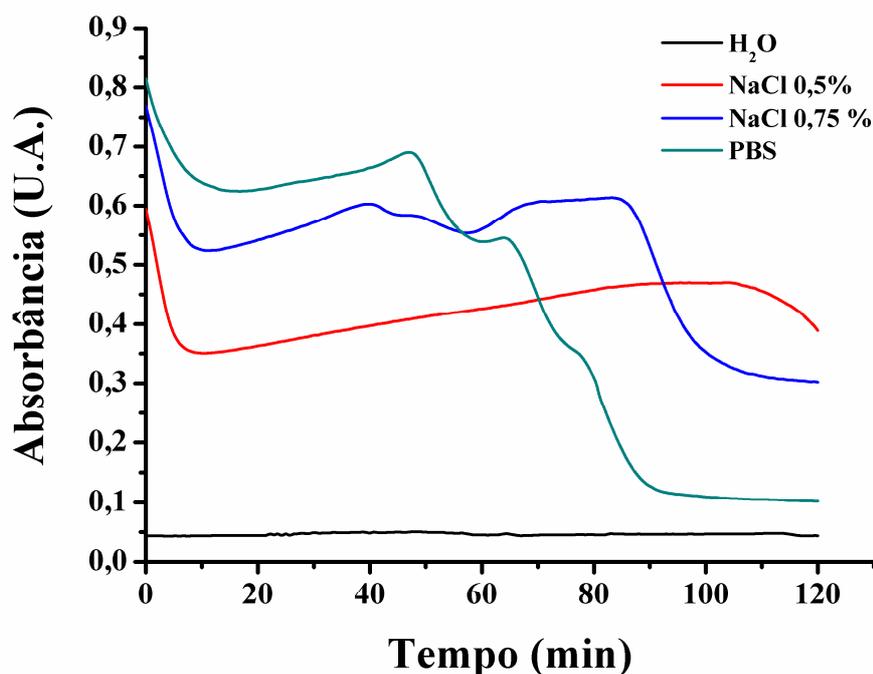


Figura 4. Perfil indireto de liberação da hemoglobina pelas hemácias quando na presença de diferentes concentrações de NaCl (0,50 e 0,75%), PBS ou água monitorada por 2 horas por espectrofotometria de absorção a 630 nm .

5.1.2 Quantificação direta de hemoglobina liberada das hemácias

Foi identificada uma maior liberação de hemoglobina pelas células incubadas em água pura (0%) e solução salina 0,25%, corroborando os resultados obtidos por avaliação indireta das células e pelas técnicas de microscopias em alta resolução as quais indicaram lise celular nessas duas condições (dados não mostrados), e uma diminuição expressiva no tamanho de células incubadas em soluções salina 0,50% e 0,75% como detectado pela leitura de absorbância nos comprimentos de onda de 540 nm (desoxihemoglobina) e 580 nm (oxihemoglobina) (Figura 5).

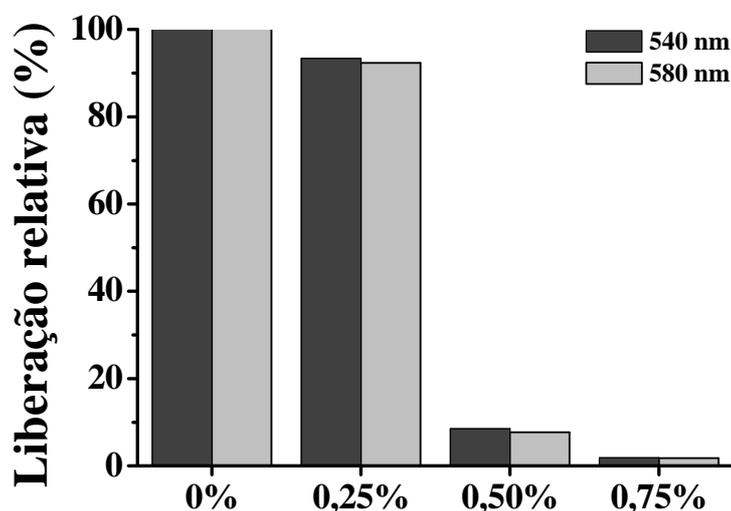


Figura 5. Liberação de hemoglobina das hemácias expostas a diferentes soluções contendo diferentes concentrações de NaCl (0,25, 0,50 e 0,75%) por 2 horas, avaliado por espectrofotometria de absorção na região do visível em 540 e 580 nm.

5.2 Isolamento, fracionamento e identificação de peptídeos presentes no hidrolisado de hemoglobina

O extrato total obtido a partir das hemácias não submetido a processo de hidrólise foi analisado por espectrometria de massa MALDI-TOF permitindo a identificação de íons com m/z entre 2000-20000 os quais são referentes às cadeias α e β da hemoglobina murina intactas, como estados monocarregados e multicarregados (duplas, triplas e quádruplas cargas) (Figura 6).

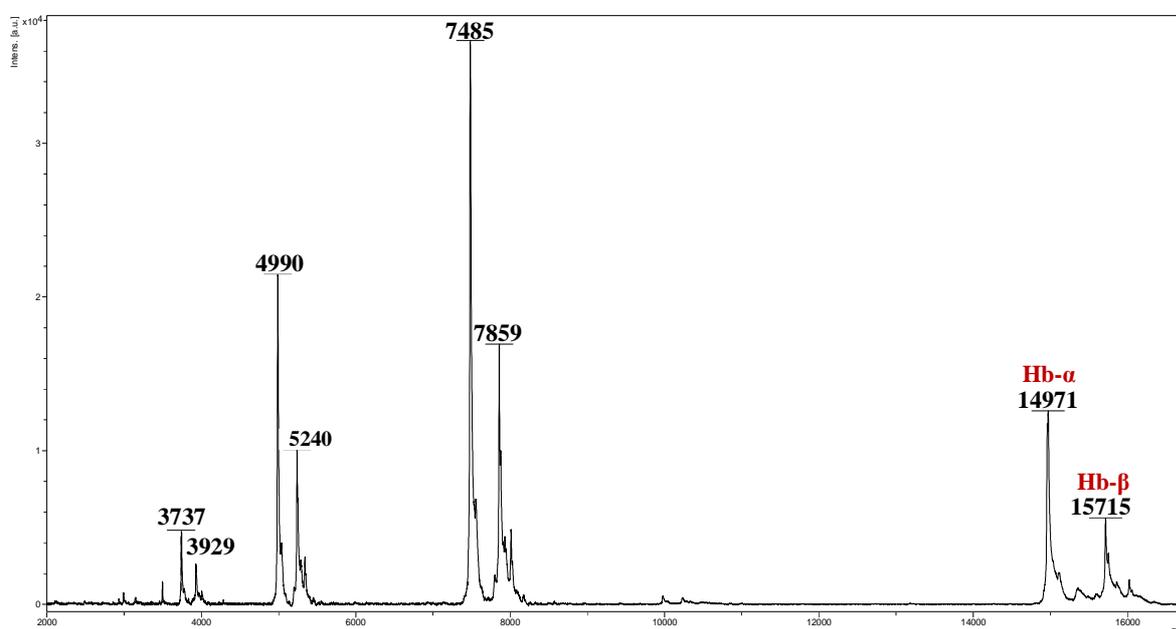


Figura 6. Espectro de massa MALDI-TOF de extrato total de hemoglobina murina obtido em modo linear positivo na faixa m/z 2000-20000 sendo assinalados íons referentes aos estados monocarregados $[M+H]^+ = 14971 / 15715$ das cadeias α e β da hemoglobina (Hb) murina e seus respectivos estados duplamente $[M+2H]^+ = 7485 / 7859$, triplamente $[M+3H]^+ = 4990 / 5240$ e quádruplamente $[M+4H]^+ = 3737 / 3929$, carregados.

A partir do extrato de hemoglobina total murina obtido em solução salina 0,50% e também utilizando o mesmo extrato hidrolisado com tripsina foram realizadas análises por espectrometria de massa MALDI-TOF/TOF em modo ISD e LIFT, respectivamente. A partir da fragmentação na fonte de íons do espectrômetro a partir de amostra do extrato de hemoglobina total murino cristalizado em placa foi possível a

obtenção de uma sequência contendo 59 resíduos de aminoácidos, sequenciados manualmente, por meio da qual foi possível a identificação da cadeia α da hemoglobina (Figura 7), confirmando a liberação da mesma durante o processo de esvaziamento das hemácias. O extrato obtido pela hidrólise com tripsina da hemoglobina murina gerou um íon de alta intensidade o qual foi fragmentado, sequenciado (LLVVYPWTQR) e posteriormente teve sua identidade elucidada como sendo uma hemorfina (Figura 8).

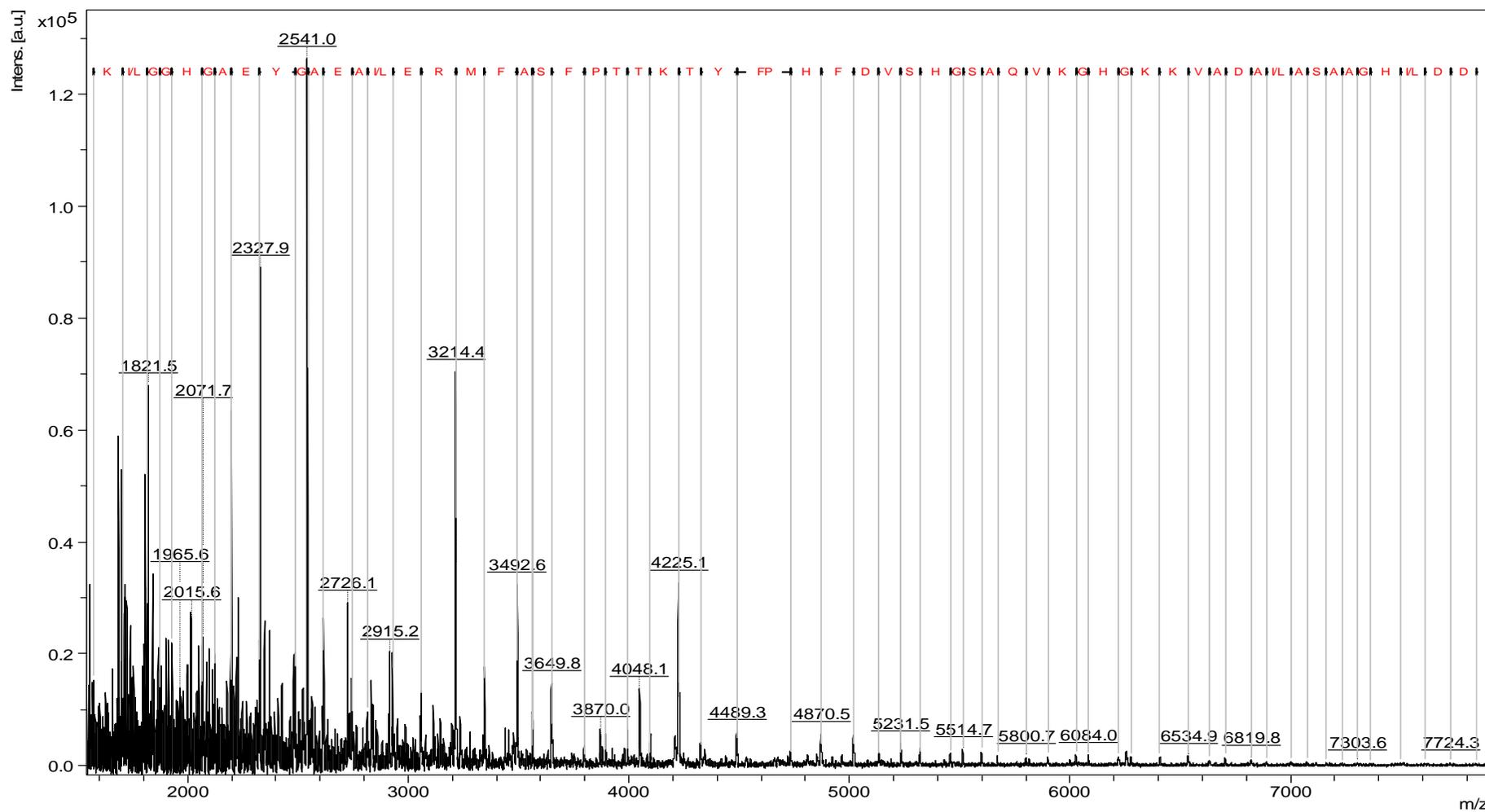


Figura 7. Espectro de massa da cadeia α da hemoglobina murina. Espectro de massa obtido por meio de espectrometria de massa MALDI-TOF/TOF operada em modo ISD de amostra proveniente do lisado de hemácias, sendo assinalados os íons da série c.

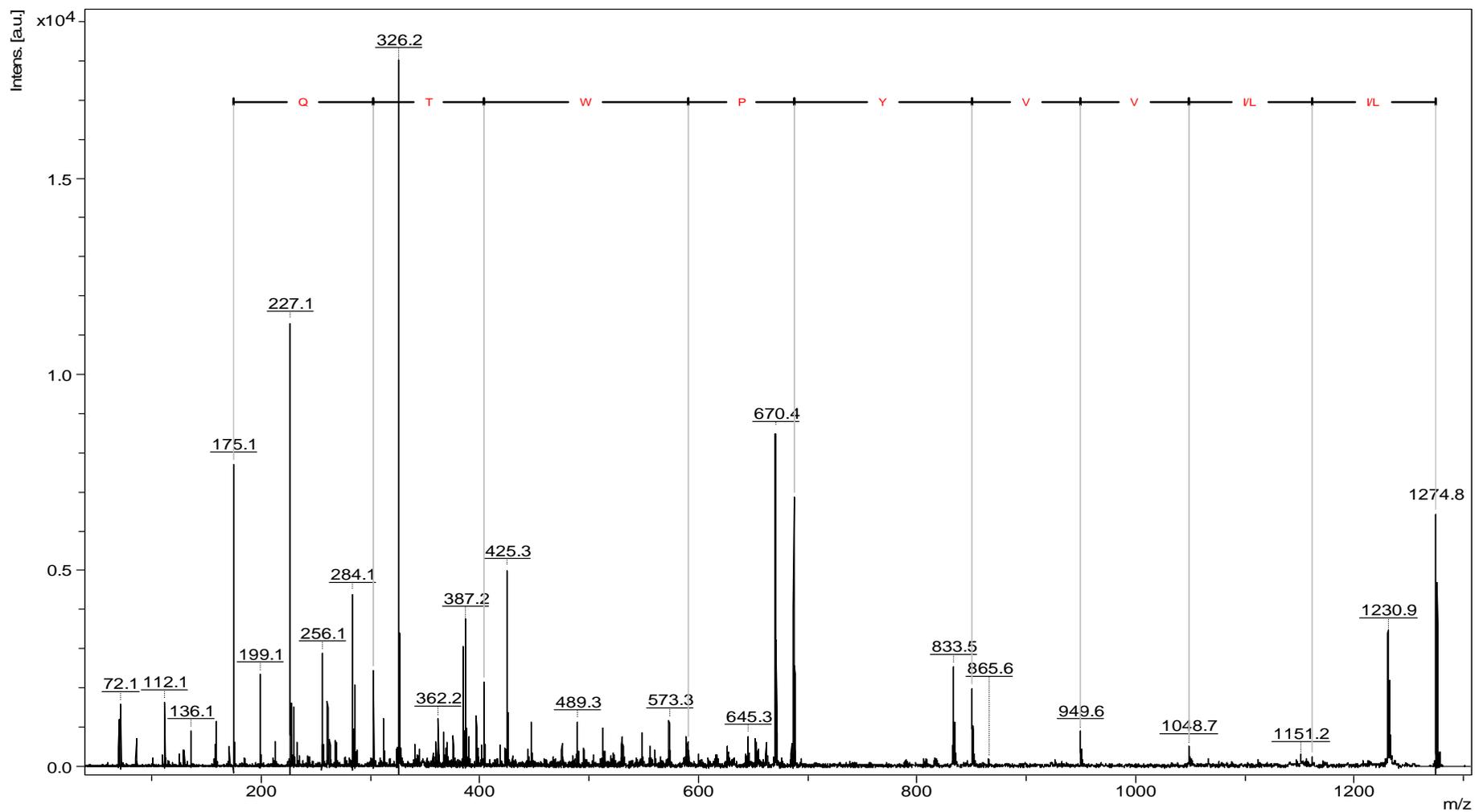


Figura 8. Espectros de massa de fragmento tríptico da cadeia β da hemoglobina murina. Espectro de massa obtido por meio de espectrometria de massa MALDI-TOF/TOF operada em modo LIFT™ a partir de íon precursor de $[M+H]^+ = 1274,8$, sendo assinalados íons da série y.

5.3 Ensaios de atividade anticâncer *in vitro* do hidrolisado de hemoglobina

Os sobrenadantes obtidos a partir do esvaziamento das células nas quatro diferentes condições de liberação da hemoglobina e posteriormente submetidos à variação de pH (pH 2,0 e pH 12,0) e diferentes condições de hidrólise enzimática (tripsina, V8 e pepsina), foram utilizados em testes de viabilidade de células de câncer de mama murino (4T1). Os extratos obtidos com solução salina 0,50%, hidrolisado com tripsina, e água digerido com pepsina apresentaram uma redução pronunciada na viabilidade das células de câncer de mama após 24 h de incubação, quando comparadas às demais condições (Figura 9). A diminuição expressiva de ~73% na viabilidade celular nessa condição pode estar relacionada pelo menos em parte à presença do peptídeo hemorfina, a qual foi identificado por análise por espectrometria de massa (Figura 8), uma vez que alguns trabalhos relatam a atividade antitumoral desse peptídeo *in vitro* e *in vivo* (BLISHCHENKO *et al.*, 1997; 2005). Este fato foi levado em consideração para a realização de todos os demais experimentos do presente estudo no que diz respeito ao planejamento dos desenhos experimentais.

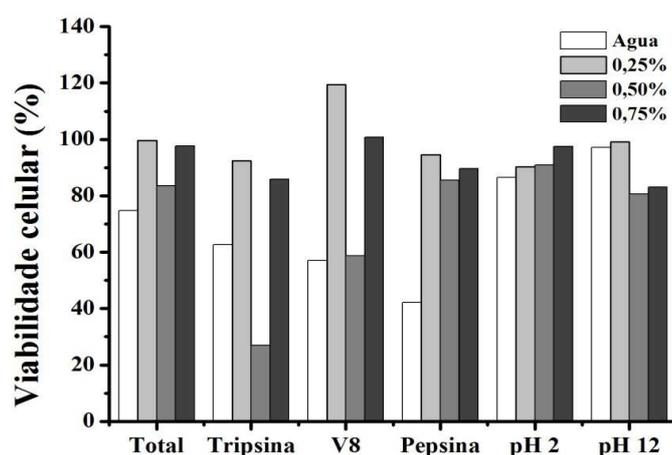


Figura 9. Avaliação de viabilidade de células de câncer de mama murino da linhagem 4T1 por ensaio MTT após 24 h de tratamento com a hemoglobina total não hidrolisada ou com os hidrolisados de hemoglobina resultantes de diferentes processos de variação de pH e hidrólise enzimática da hemoglobina murina.

5.4 Purificação dos peptídeos derivados da hemoglobina murina hidrolisada

A hemoglobina obtida por meio do esvaziamento das hemácias e submetida à hidrólise por tripsina foi submetida a fracionamento utilizando RP-HPLC, visando à separação de componentes com potencial atividade antitumoral. Foi obtido um total de 14 frações as quais foram coletadas e tiveram seu tempo de retenção/concentração de acetonitrila identificadas e posteriormente secas em *speed vaccum* (Figura 10). As frações obtidas também foram utilizadas em teste de viabilidade celular em células de fibroblasto murinho (normais) e de câncer de mama murino (tumerais) como descrito a seguir.

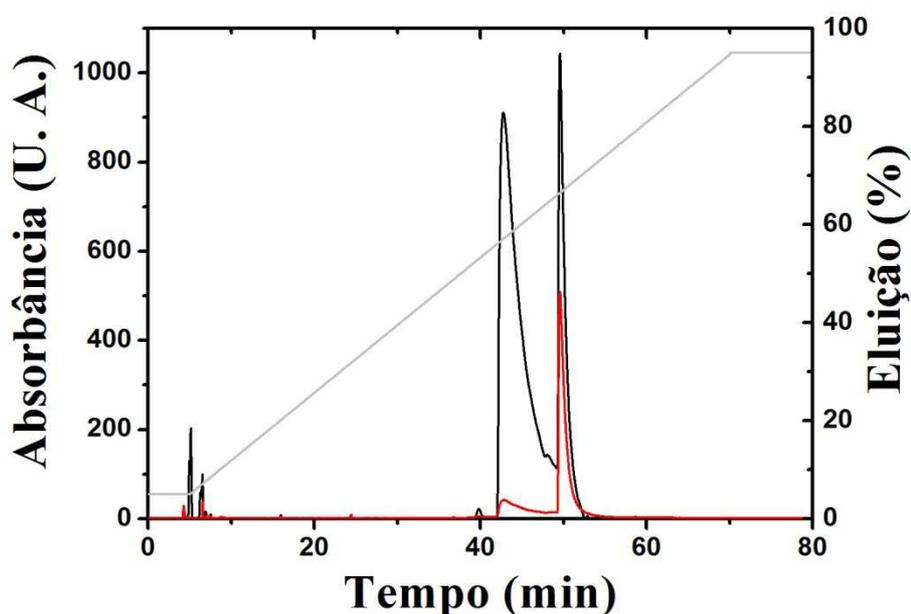


Figura 10. Perfil cromatográfico dos fragmentos peptídicos da hemoglobina murina hidrolisada com tripsina e eluídas em coluna semipreparativa de fase reversa (NST C₁₈) sob gradiente linear de acetonitrila (5 a 95% em 80 min) e fluxo contínuo de 1 mL/min. Monitoramento realizado nos comprimentos de onda de 216 nm (preto) e 280 nm (vermelho).

As frações obtidas a partir da separação cromatográfica também foram submetidas a ensaio de viabilidade celular em células normais e de câncer de mama murino (NIH3T3 e 4T1, respectivamente). Foram testadas nove frações, das 14 obtidas,

com os seguintes tempos de retenção (minutos): 24,38; 39,2; 40,2; 44,0; 48,3; 49,39; 52,9; 56,5 e 58,5.

Todas as nove frações apresentaram redução semelhante na viabilidade celular das duas linhagens celulares (4T1 e NIH3T3), sendo que a fração 6 induziu uma maior redução da viabilidade de células 4T1. Contudo, após a separação cromatográfica não foi obtido uma diminuição tão expressiva na viabilidade celular quanto à obtida pelo hidrolisado de hemoglobina (Figura 11), sugerindo algum tipo de efeito aditivo ou sinérgico.

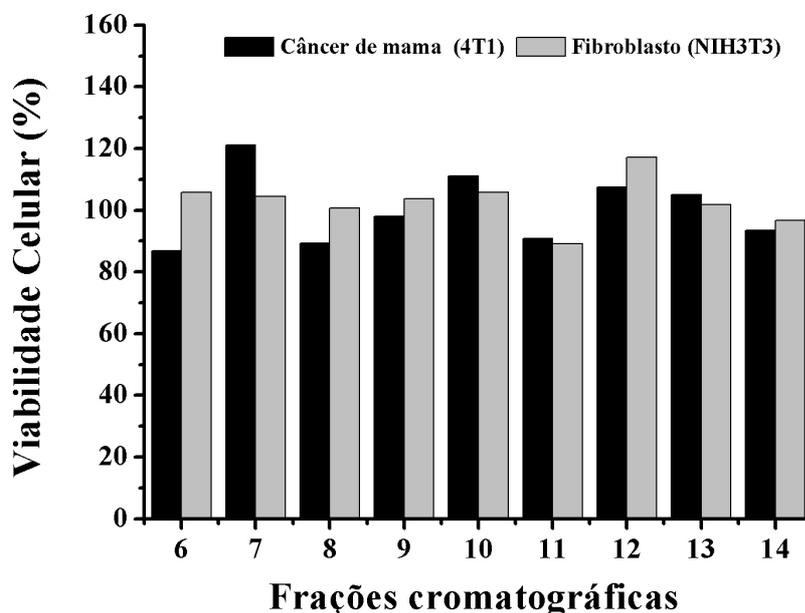


Figura 11. Avaliação de viabilidade de células de fibroblastos murinos normais (NIH3T3) e de câncer de mama murino (4T1) pelo ensaio de MTT após 24 h de tratamento com as frações obtidas por separação cromatográfica da hemoglobina hidrolisada por tripsina obtida a partir do esvaziamento das hemácias.

Devido à baixa disponibilidade na obtenção da hemoglobina murina e tendo em vista a alta similaridade das cadeias de aminoácidos das cadeias α e β das moléculas de hemoglobina de diferentes mamíferos, bem como na geração dos peptídeos após a clivagem enzimática, optou-se pela utilização de hemoglobina comercial bovina (Figura 12).

Para confirmação da integridade a hemoglobina comercial bovina não hidrolisada também foi submetida à análise por espectrometria de massa MALDI-TOF permitindo a identificação de íons com m/z entre 2000-20000 os quais são referentes às cadeias α e β intactas (Figura 13).

A partir da fragmentação na fonte do extrato de hemoglobina total comercial foi possível à obtenção de uma sequência de 66 e 36 resíduos de aminoácidos, sequenciados manualmente, por meio da qual foi possível a identificação inequívoca das cadeias α e β da hemoglobina, respectivamente (Figura 14). O extrato obtido pela hidrólise com tripsina da hemoglobina bovina gerou um íon de alta intensidade o qual foi fragmentado, sequenciado (LLVVYPWTQR) e teve a sua identidade elucidada como sendo a hemorfina, o mesmo peptídeo gerado e identificado a partir da hemoglobina murina (Figura 15).

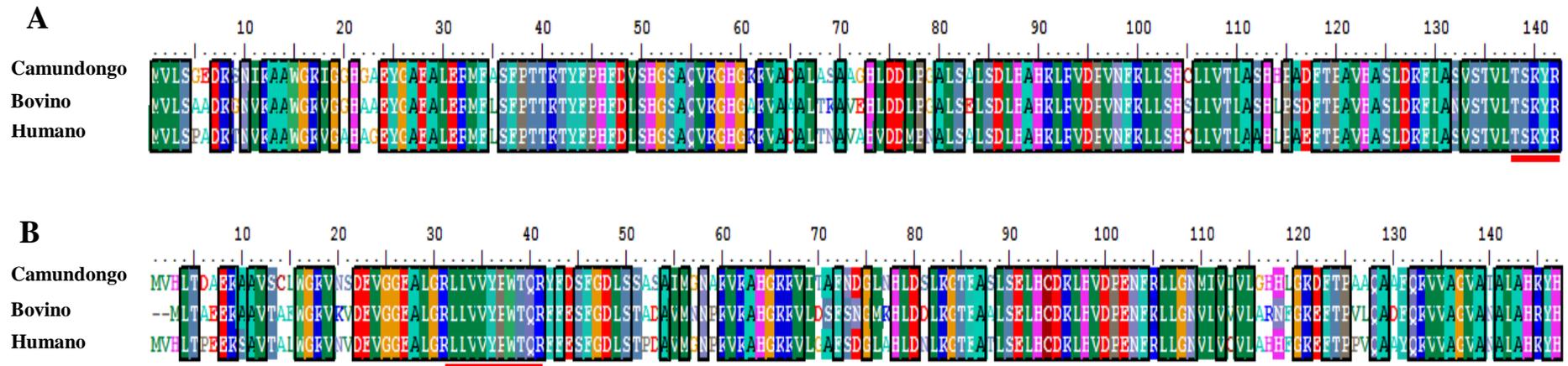


Figura 12. Alinhamento das seqüências de resíduos de aminoácidos das cadeias α (A) e β (B) constituintes da molécula de hemoglobina de camundongo, bovino e humano. Barras vermelhas indicam as regiões conservadas dos peptídeos neoquitorfina e hemorfina gerados após clivagem enzimática por tripsina das cadeias α e β , respectivamente.

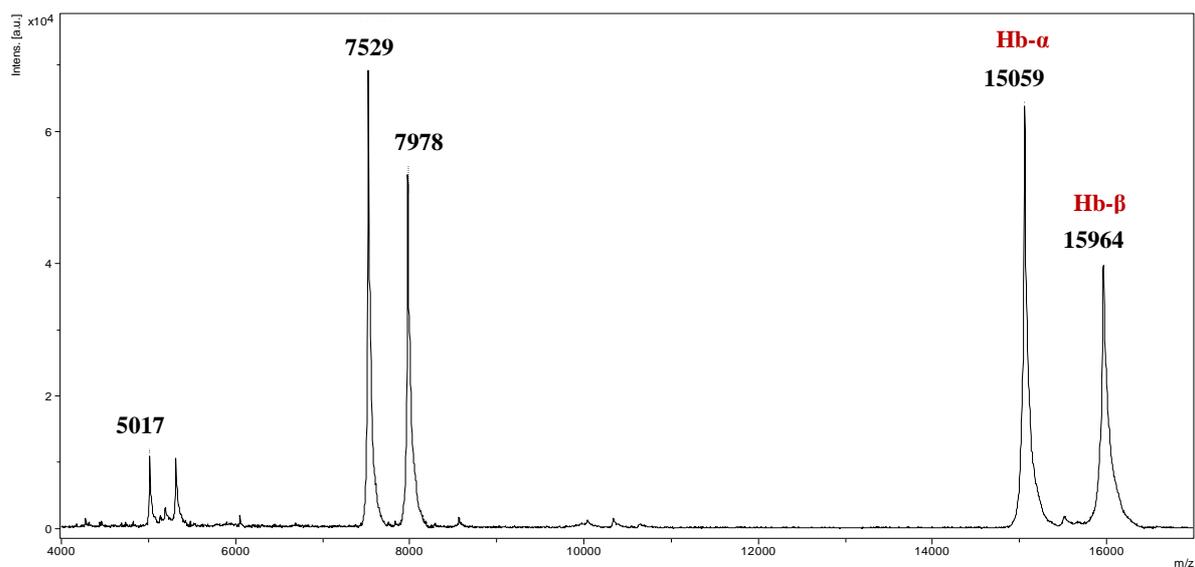


Figura 13. Espectro de massa MALDI-TOF de extrato total de hemoglobina comercial bovina em modo linear positivo na faixa m/z 2000-20000 sendo assinalados íons referentes aos estados monocarregados $[M+H]^+ = 14971 / 15715$ das cadeias α e β da hemoglobina (Hb) murina e seus respectivos estados duplamente $[M+2H]^+ = 7485 / 7859$, triplamente $[M+3H]^+ = 4990 / 5240$, carregados.

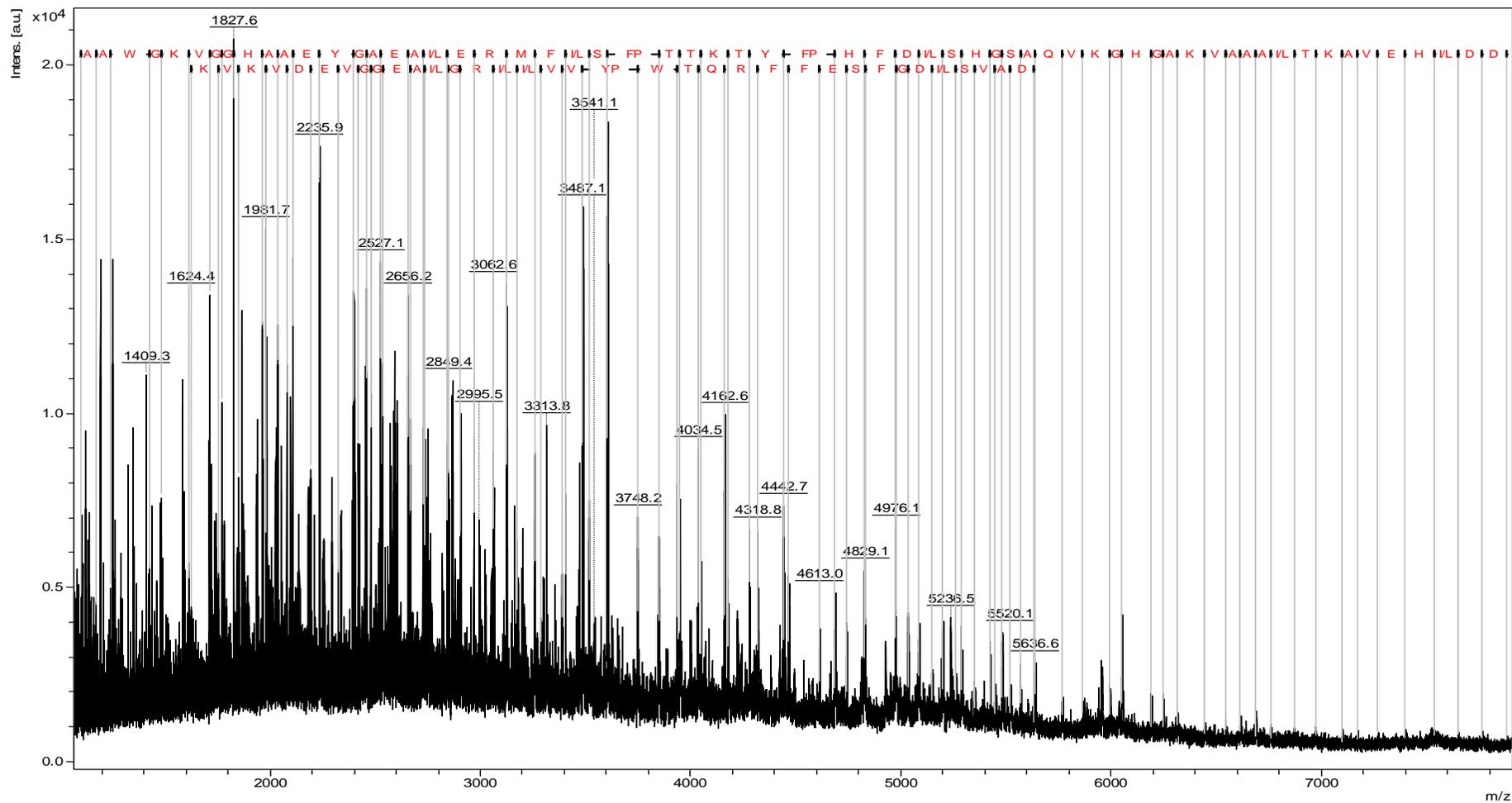


Figura 14. Espectro de massa da hemoglobina comercial bovina obtido por meio de espectrometria de massa MALDI-TOF/TOF operada em modo ISD, com o equipamento operando em modo refletido/positivo de amostra proveniente do lisado de hemácias, sendo assinalados os íons da série c, referentes às cadeias α (superior) e β (inferior).

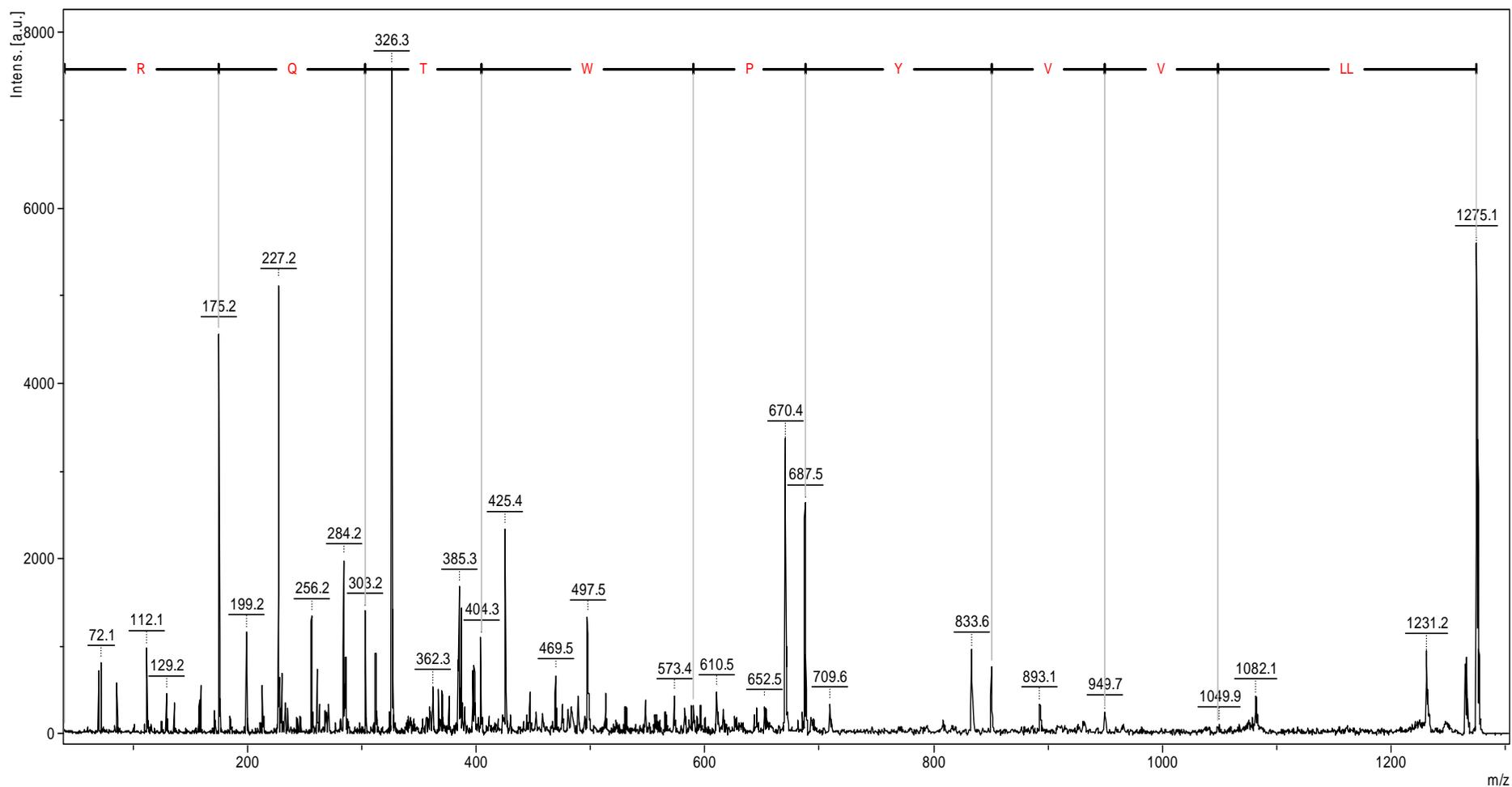


Figura 15. Espectro de massa de hidrolisado triptico de hemoglobina comercial bovina obtido por meio de espectrometria de massa MALDI-TOF/TOF operada em modo LIFT™ a partir de íon precursor de $[M+H]^+ = 1275,1$ sendo assinalados íons da série y.

5.5 Ensaio dos efeitos da hemoglobina comercial intacta e hidrolisada sobre a viabilidade celular

Tendo em vista a alta similaridade entre as cadeias α e β das hemoglobinas murina e bovina intactas, bem como os fragmentos gerados após o processo de hidrólise enzimático, a hemoglobina comercial bovina foi utilizada para a realização dos testes de viabilidade celular.

Para averiguar o possível efeito contra células tumorais e normais, a hemoglobina comercial intacta e os o peptídeos obtidos após o processo de hidrólise foram utilizados em testes de viabilidade celular em linhagens de câncer de mama (4T1) e fibroblastos (NIH3T3) nos tempos de incubação de 24, 48 e 72 horas nas concentrações de 32, 64, 128, 256, 512 e 1024 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 16 e Figura 17).

A hemoglobina intacta (nativa) não alterou significativamente a viabilidade de células 4T1 em todas as concentrações testadas para os tempos de 24 e 48 horas ($P < 0,05$), sendo observada uma diminuição significativa de ~20% na viabilidade das células apenas para a concentração de 64 $\mu\text{g/mL}$ em relação a 32 $\mu\text{g/mL}$ no tempo de 72 horas (Figura 16A). Resultados semelhantes foram observados para a viabilidade das células NIH3T3 para os tempos de 24 e 48 horas, sendo que as concentrações de 128, 256 e 512 $\mu\text{g/mL}$ no tempo de 72 horas (Figura 16B) apresentou diminuição de ~8%, ~24% e ~24% em relação a 32 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente, contudo sem diferenças significativas em relação ao controle (células crescidas apenas em meio de cultura).

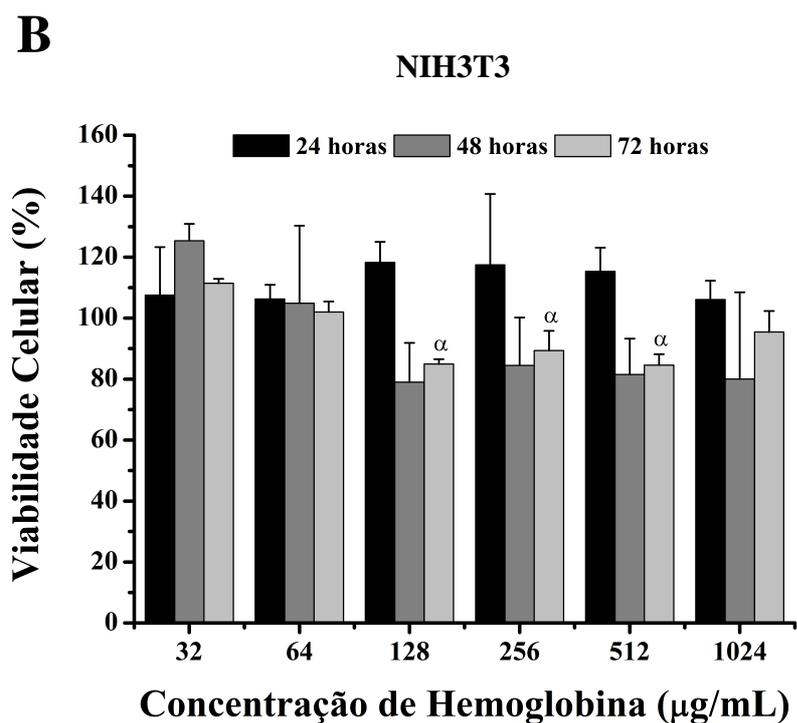
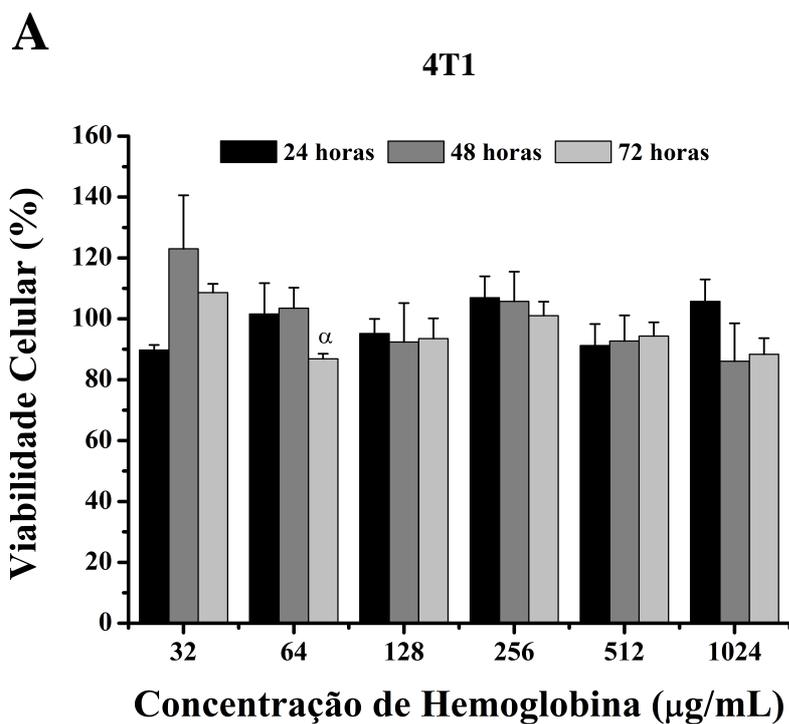


Figura 16. Avaliação de viabilidade de células de câncer de mama (4T1) (A) e fibroblastos murinos normais (NIH3T3) (B) pelo ensaio de MTT após 24, 48 e 72 horas de tratamento com hemoglobina comercial intacta, não submetida ao processo de hidrólise enzimática. Diferença estatisticamente significativa ($P < 0,05$) em relação à concentração de 32 µg/mL.

Para o tempo de 24 horas de tratamento, concentrações de hidrolisado de hemoglobina de 256 e 1024 $\mu\text{g/mL}$ diminuíram significativamente a viabilidade de células 4T1 em $\sim 7\%$ e $\sim 9\%$ em relação ao controle; a concentração de 256 $\mu\text{g/mL}$ também diminuiu significativamente a viabilidade em relação a 32 e 64 $\mu\text{g/mL}$; e a de 1024 $\mu\text{g/mL}$ diminuiu em relação a 32 $\mu\text{g/mL}$ ($P < 0,05$). As concentrações de 256, 512 e 1024 $\mu\text{g/mL}$ diminuíram a viabilidade das células NIH3T3 em $\sim 15\%$, 13% e 11% , respectivamente, em relação ao controle; além de diminuírem a viabilidade em relação à concentração de 32 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 17, $P < 0,05$).

Após o intervalo de tempo de 48 horas a concentração de hidrolisado de hemoglobina de 1024 $\mu\text{g/mL}$ diminuiu em $\sim 11\%$ a viabilidade de células 4T1 em relação ao controle e todas as demais concentrações, já para as células NIH3T3 as concentrações de peptídeos diminuíram em até 17% a viabilidade das células em relação ao controle e concentrações acima de 128 $\mu\text{g/mL}$ diminuíram mais a viabilidade das células do que 32 e 64 $\mu\text{g/mL}$ ($P < 0,05$).

No tempo de 72 horas houve aumento de $\sim 7\%$ na viabilidade das células 4T1 na concentração de hidrolisado de hemoglobina de 512 $\mu\text{g/mL}$ em relação à concentração de 128 $\mu\text{g/mL}$, e para a linhagem NIH3T3 todas as concentrações testadas reduziram a viabilidade celular em relação ao controle (Figura 17, $P < 0,05$).

Na concentração de 1024 $\mu\text{g/mL}$ de hidrolisado de hemoglobina houve aumento na viabilidade das células 4T1 após 72 horas em comparação a 24 e 48 horas; enquanto nas células NIH3T3 houve diminuição na viabilidade após 48 e 72 horas em relação a 24 horas nas concentrações de 128 e 256 $\mu\text{g/mL}$; além de aumento após 72 horas em relação a 24 e 48 horas na concentração de 512 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 17, $P < 0,05$).

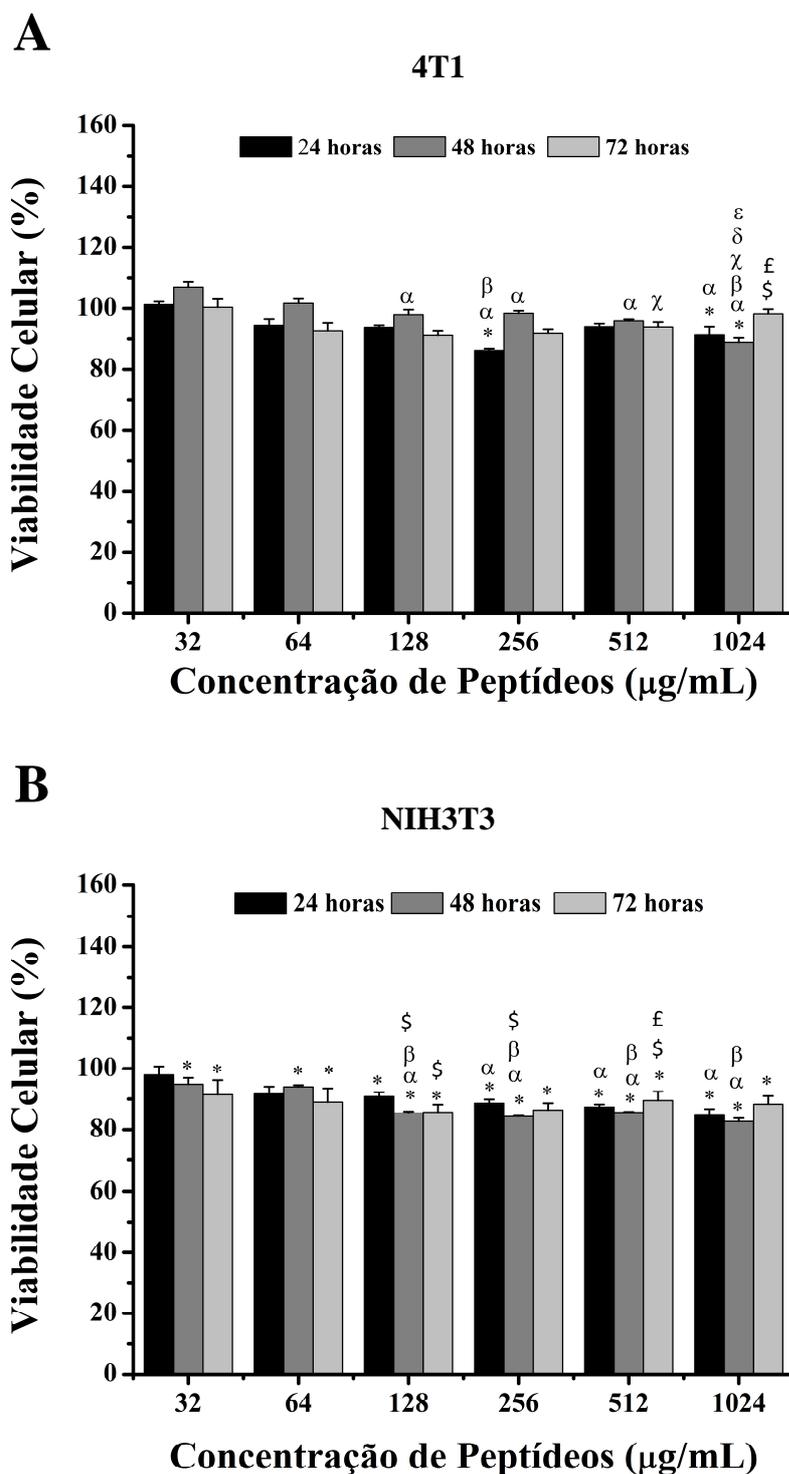


Figura 17. Avaliação de viabilidade de células de câncer de mama (4T1) (A) e fibroblastos murinos normais (NIH3T3) (B) pelo ensaio de MTT após 24, 48 e 72 horas de tratamento com os peptídeos resultantes da hidrólise da hemoglobina comercial por tripsina. Diferença estatisticamente significativa ($P < 0,05$) em relação ao controle - 0 µg/mL (*), 32 µg/mL (α), 64 µg/mL (β), 128 µg/mL (χ), 256 µg/mL (δ), 512 µg/mL (ϵ), 24 horas ($\$$) e 48 horas (\pounds).

Tendo em vista que o hidrolisado de hemoglobina não levou a uma diminuição expressiva na viabilidade celular e que a hemoglobina intacta não apresentou toxicidade às células de câncer de mama e fibroblastos foram levantadas duas hipóteses. A primeira seria que os peptídeos poderiam estar sendo degradados por proteases produzidas pelas células, e a segunda será que os peptídeos gerados *in situ* pela adição de protease junto à molécula intacta de hemoglobina não formariam os peptídeos e os mesmos apresentariam maior atividade por serem formados gradualmente?

Para responder a essas indagações foram realizados ensaios de viabilidade celular nas seguintes condições: incubação de hemoglobina intacta na presença de tripsina livre; e incubação de peptídeos na presença de inibidores de proteases. As concentrações de protease e do coquetel de inibidores de proteases (inibidor de tripsina, inibidor de quimotripsina, inibidor de plasmina, E-64, bestatina e leupeptina) a serem utilizadas nestes dois experimentos foram determinadas pelo ensaio de viabilidade celular, no qual diferentes concentrações foram testadas em células de câncer de mama e fibroblasto e foram escolhidas concentrações que não alteraram a viabilidade celular em comparação às células controle (dados não mostrados). Sendo assim, foram determinadas as seguintes concentrações: 1 mg/mL para tripsina e 1 µL/mL para o coquetel inibidor de proteases.

As diferentes concentrações de hemoglobina intacta na presença de tripsina livre não apresentaram diferenças significativas na viabilidade de células 4T1 para o tempo de 24 horas, sendo observada diminuição de ~27% e 21% para as concentrações de 512 e 256 µg/mL em relação à concentração de 32 µg/mL, e de ~19 % na concentração de 512 µg/mL em comparação ao controle no tempo de 48 horas (Figura 18A , $P < 0,05$). No tempo de 72 horas ocorreu diminuição de 4% a 17% para as concentrações acima de 256 µg/mL quando comparada ao controle. As mesmas condições de tratamento não

apresentaram alteração significativa na viabilidade de células NIH3T3 para o tempo de 24 horas, sendo observado inclusive um aumento de ~7% para concentração de 1024 $\mu\text{g/mL}$ quando comparadas às concentrações de 32 e 64 $\mu\text{g/mL}$ e no tempo de 48 horas; e de ~17% para a concentração de 1024 $\mu\text{g/mL}$ quando comparada a 256 $\mu\text{g/mL}$ no tempo de 72 horas (Figura 18B, $P < 0,05$). Não foram identificadas diferenças entre os efeitos das mesmas concentrações entre os diferentes tempos de incubação para as células 4T1 e NIH3T3 (Figura 18, $P < 0,05$).

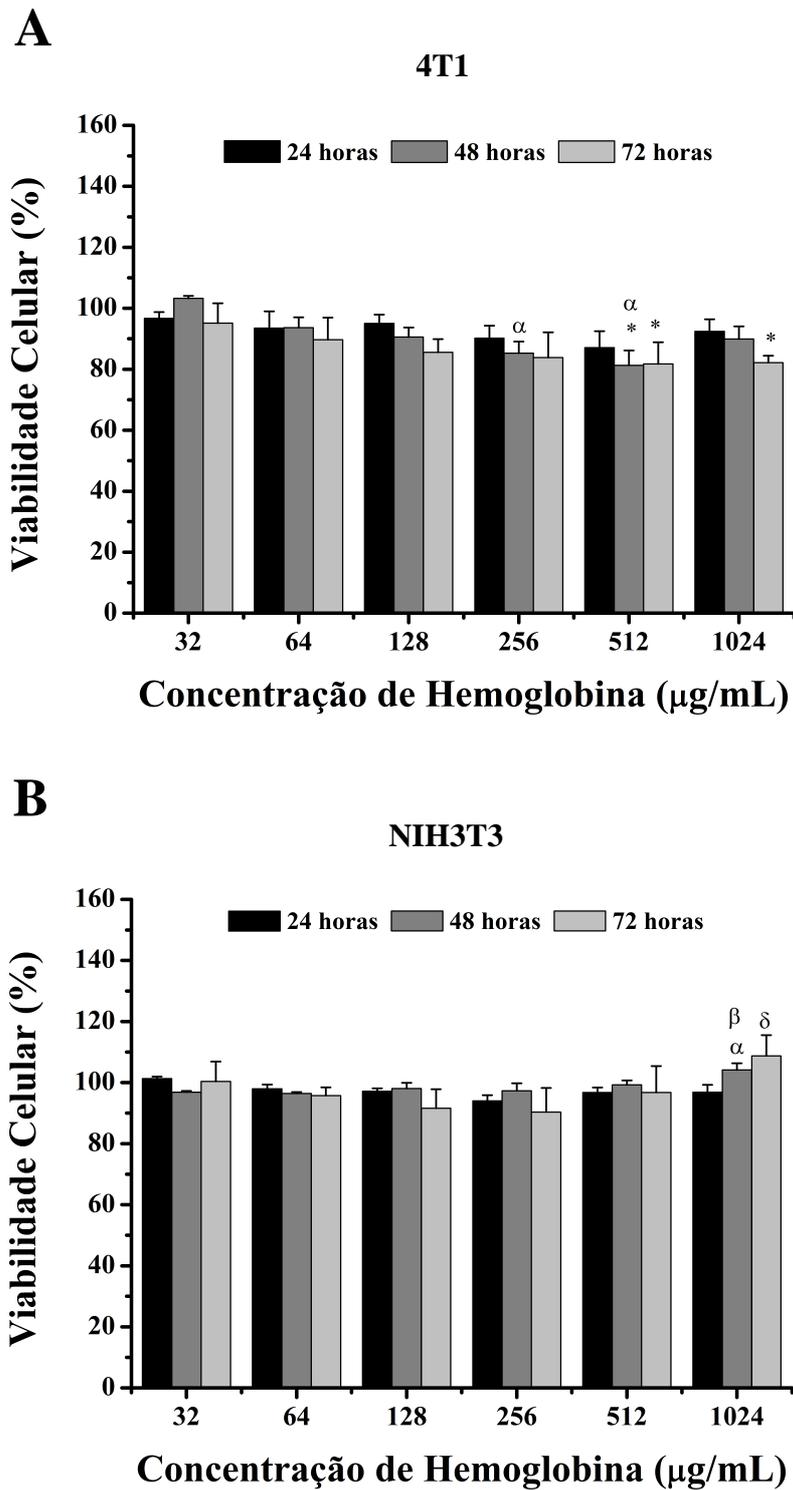


Figura 18. Avaliação de viabilidade de células de câncer de mama (4T1) (A) e fibroblastos murinos normais (NIH3T3) (B) pelo ensaio de MTT após 24, 48 e 72 horas de tratamento com hemoglobina comercial intacta, não submetida ao processo de hidrólise enzimático e tripsina livre. Diferença estatisticamente significativa ($P < 0,05$) em relação ao controle - 0 µg/mL (*), 32 µg/mL (α), 64 µg/mL (β), 128 µg/mL (χ) e 256 µg/mL (δ).

Concentrações de hidrolisado de hemoglobina na presença do coquetel de inibidores de proteases não apresentaram diferenças significativas na viabilidade de células 4T1 para o tempo de 24 horas (Figura 19A, $P < 0,05$); contudo concentrações acima de 128 $\mu\text{g/mL}$ acarretaram em diminuição de ~8% a ~12% e na viabilidade de célula NIH3T3 quando comparadas ao controle (Figura 19B, $P < 0,05$).

No tempo de 48 horas a viabilidade das células 4T1 foi diminuída (7% - 20%) para as concentrações acima de 128 $\mu\text{g/mL}$ quando comparada ao controle; como de 10% a 13% para a concentração de 1024 $\mu\text{g/mL}$ em relação a 128 e 256 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente (Figura 19A, $P < 0,05$). Adicionalmente, no tempo de 48 horas também ocorreu diminuição da viabilidade das células NIH3T3 para todas as concentrações em relação ao controle (~9% a ~22%) e acima de 128 $\mu\text{g/mL}$ quando comparadas 32 e 64 $\mu\text{g/mL}$ (~14% a ~17%) (Figura 19B, $P < 0,05$). Além disso, houve diminuição significativa no tempo de 48 horas em relação à 24 horas em todas as concentrações acima de 64 $\mu\text{g/mL}$.

Para o tempo de 72 horas de incubação não houve diferenças significativas entre as concentrações e o controle das células 4T1, mas ocorreu aumento no tempo de 72 horas quando comparado ao de 48 horas na concentração de 1024 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 19B, $P < 0,05$). Além disso, no tempo de 72 horas ocorreu diminuição de aproximadamente 22% da viabilidade celular das células NIH3T3 para as concentrações 256 e 1024 $\mu\text{g/mL}$ quando comparadas ao controle, além de aumento na viabilidade das células no tempo de 72 horas quando comparado ao tempo de 48 horas para as concentrações de 256 e 512 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 19B, $P < 0,05$).

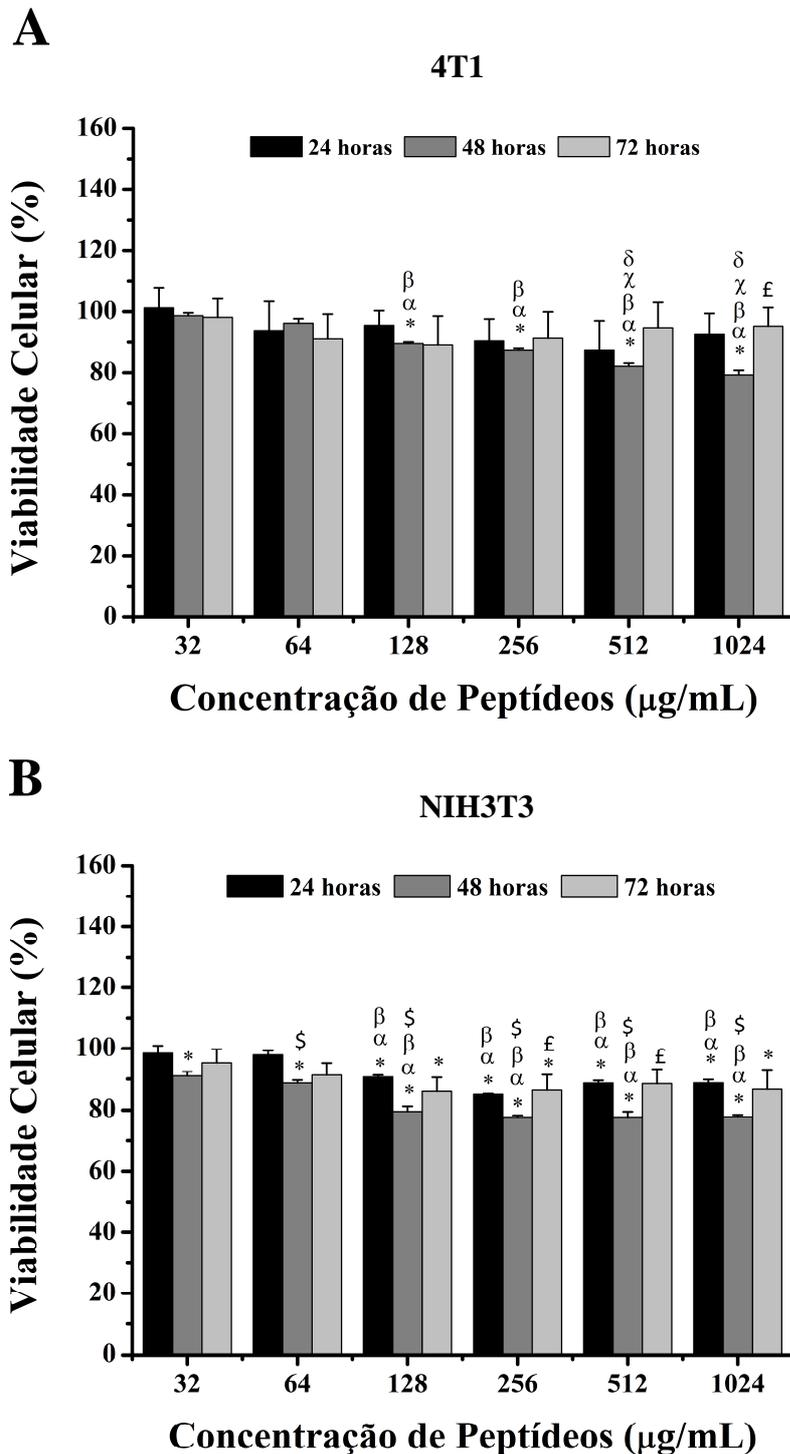


Figura 19. Avaliação de viabilidade de células de câncer de mama (4T1) (A) e fibroblastos murinos normais (NIH3T3) (B) pelo ensaio de MTT após 24, 48 e 72 horas de tratamento com os peptídeos resultantes da hidrólise da hemoglobina comercial por tripsina e inibidor de proteases. Diferença estatisticamente significativa ($P < 0,05$) em relação ao controle - 0 µg/mL (*), 32 µg/mL (α), 64 µg/mL (β), 128 µg/mL (χ), 256 µg/mL (δ), 512 µg/mL (ϵ), 24 horas ($\$$) e 48 horas (\pounds).

5.6 Desenvolvimento e caracterização de nanossistemas à base de miméticos de hemácias, lipossomos e quitosana

A avaliação por técnicas de microscopia eletrônica de varredura e microscopia de força atômica confirmaram o aspecto morfológico característico das hemácias murinas utilizadas no primeiro protocolo (Figura 20A e 20B). Após submeter as células às diferentes condições de esvaziamento foi possível observar a formação de nanoestruturas predominantes, utilizando soluções salina 0,50% e 0,75% (Figuras 20C-20F). Para as células incubadas em água ultrapura e em solução salina 0,25%, as análises pelas técnicas de microscopias em alta resolução indicaram lise celular, de forma que não foram mantidas estruturas que pudessem ser visualizadas, dados não mostrado).

Nos demais protocolos, a avaliação por microscopia de força atômica indicou morfologia característica com formato bicôncavo das hemácias após a coleta do sangue, bem como das hemácias que foram submetidas à lavagem com PBS antes da utilização para a formação dos miméticos (Figura 21A e 21a), as quais apresentaram altura média de $726,04 \pm 42,67$ nm e $622,84 \pm 29,31$ nm, respectivamente (Figura 22A e 22a). Os miméticos de hemácias sem hidrolisado de hemoglobina apresentaram formas variadas e indefinidas (Figura 21B), e altura média $783,84 \pm 64,22$ nm (Figura 22B). Os miméticos com hidrolisado de hemoglobina também apresentaram formas variadas e indefinidas, e com altura média $2111,74 \pm 29,31$ nm, não apresentando padrão de distribuição definido (Figura 22b). Verificou-se que os lipossomos sem hidrolisado de hemoglobina têm formas regulares esféricas e altura média de $29,4 \pm 5,03$ nm (Figura 21C e Figura 22C). Já os lipossomos com peptídeos apresentaram formas variadas alongadas indicando a ocorrência de fusão dos lipossomos em decorrência da presença dos peptídeos no hidrolisado de hemoglobina (Figura 21c), com altura média $54,56 \pm$

2,01 nm (Figura 22c). As partículas de quitosana e quitosana com hidrolisado de hemoglobina apresentaram pequenas estruturas com formas indefinidas e pequenas, com média de alturas de $12,23 \pm 1,37$ e $9,64 \pm 0,88$ (Figura 21D e d e Figura 22D e d).

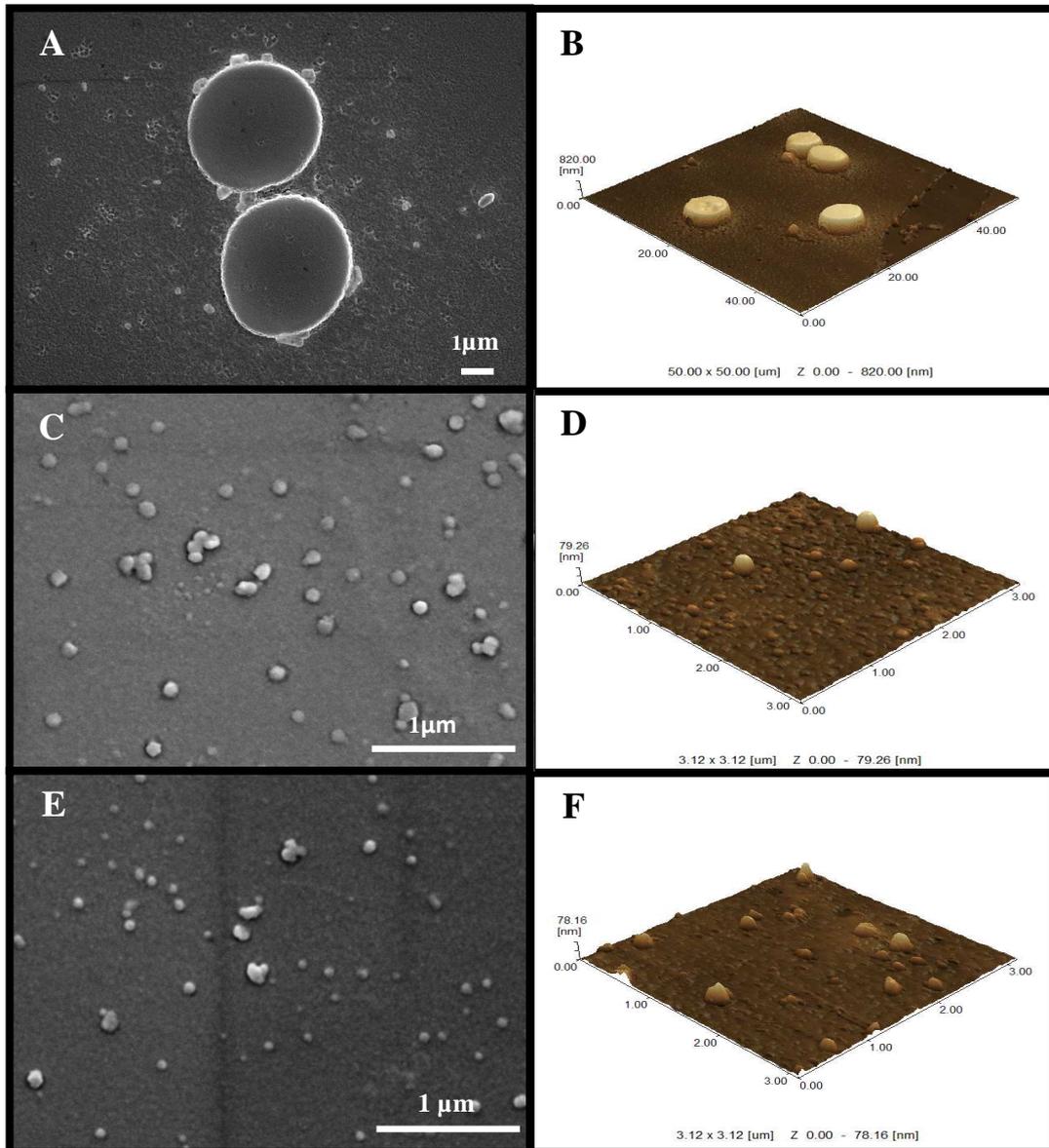


Figura 20. Imagens obtidas por meio de microscopia eletrônica de varredura (A, C e E) e microscopia de força atômica (B, D e F) a partir de hemácias intactas e após processo de esvaziamento. Sangue de camundongo total, em aumento de $5000 \times$ (A) e área de $50 \times 50 \mu\text{m}$ (B); Estruturas formadas após incubação com solução NaCl 0,50%, em aumento de $20.000 \times$ (C) e área de $3,12 \times 3,12 \mu\text{m}$ (D); Estruturas formadas após incubação do plasma com solução NaCl 0,75%, em aumento de $20.000 \times$ (E) e área de $3,12 \times 3,12 \mu\text{m}$ (F).

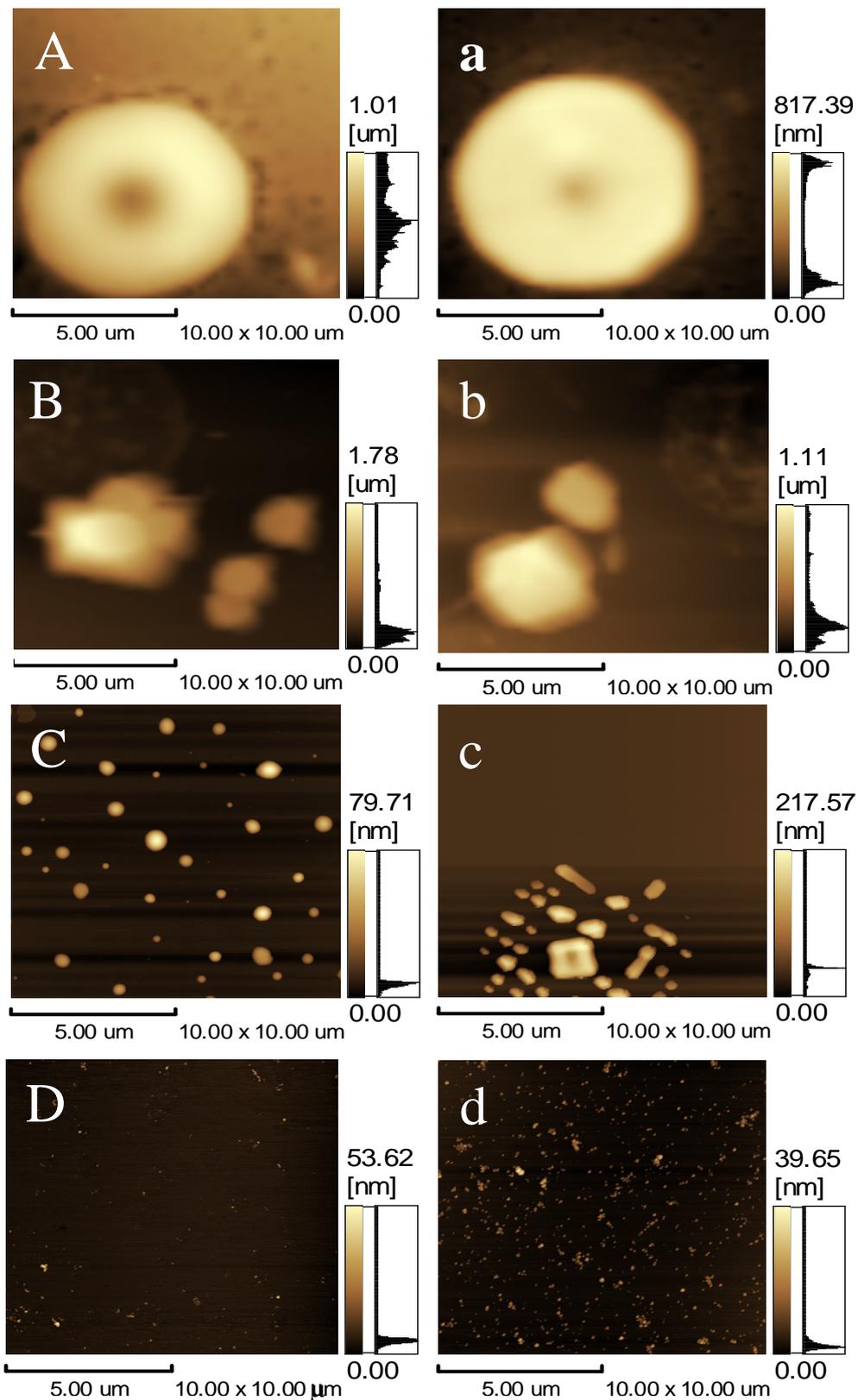


Figura 21. Imagens topográficas adquiridas por meio de microscopia de força atômica operada em modo contato de hemácias (A) e hemácias lavadas com PBS (a); miméticos de hemácias (B) e miméticos de hemácias com hidrolisado de hemoglobina (Mimético-Pep) (b); lipossomos (C) e lipossomos com hidrolisados de hemoglobina (Lipossomo-Pep) (c); e partículas de quitosana (D) e quitosana com hidrolisado de hemoglobina (Quitosana-Pep) (d).

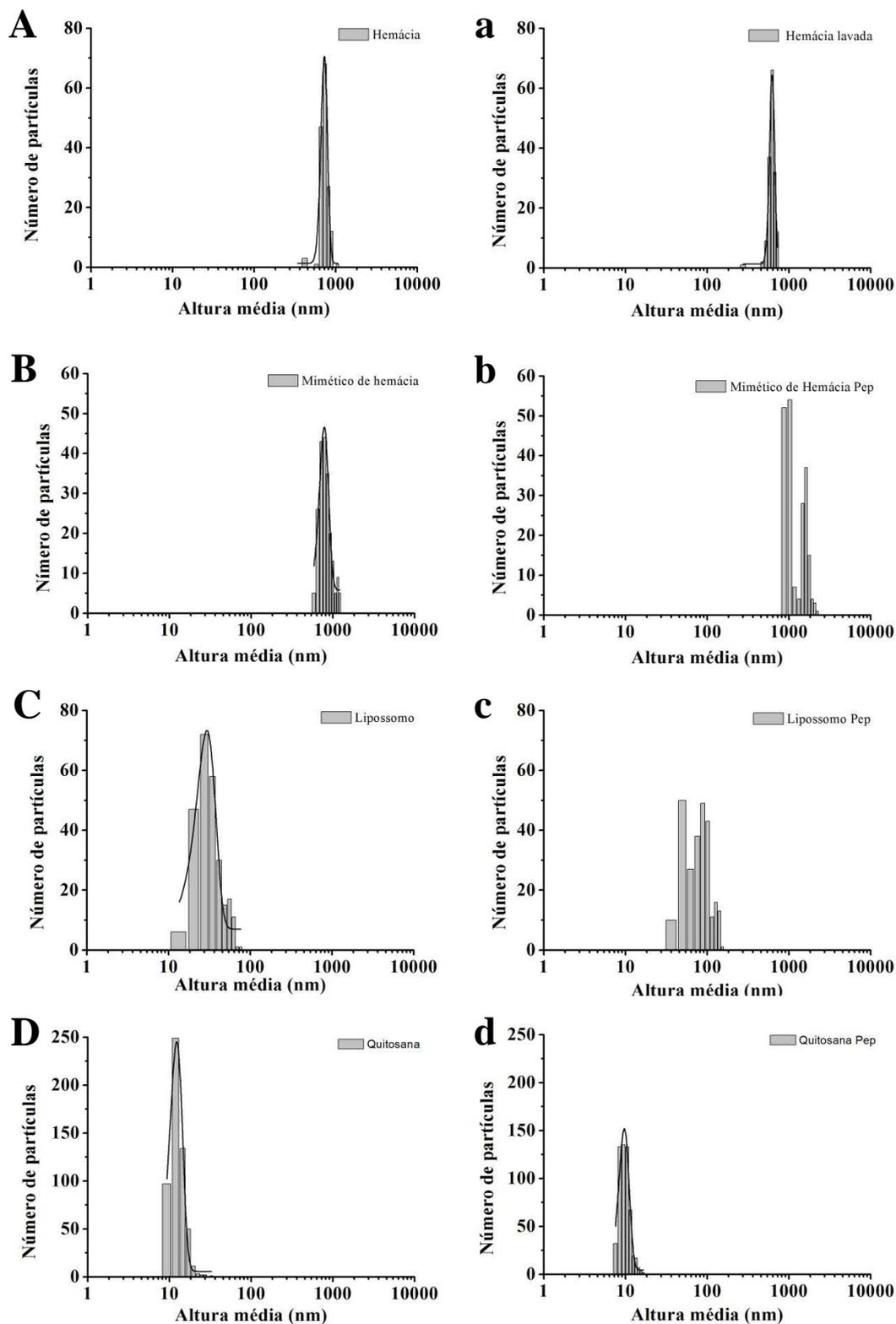


Figura 22. Histogramas de distribuição de classes referentes aos valores de altura das partículas, sendo hemácias (A) e hemácias lavadas com PBS (a); miméticos de hemácias (B) e miméticos de hemácias com hidrolisado de hemoglobina (Mimético-Pep) (b); lipossomos (C) e lipossomos hidrolisados de hemoglobina (Lipossomo-Pep) (c); e partículas de quitosana (D) e quitosana com hidrolisado de hemoglobina (Quitosana-Pep) (d).

A avaliação por espalhamento de luz dinâmico revelou uma grande variação no tamanho, polidispersividade e carga de superfície das partículas (Tabela 2). Os diâmetros hidrodinâmicos das partículas apresentaram diferenças significativas entre si, sendo que ocorreu aumento dos mesmos na maioria das formulações contendo hidrolisados de hemoglobina, exceto para as partículas de quitosana. Todas as partículas apresentaram alto índice de polidispersividade. Adicionalmente, para todas as partículas ocorreu um aumento do potencial Zeta após a encapsulação dos hidrolisados de hemoglobina, quando comparadas ao controle, sugerindo a predominância de moléculas, em particular peptídeos carregados positivamente na face externa das mesmas (Tabela 2).

Todas as formulações desenvolvidas apresentaram altas eficiências de encapsulamento (78-89%), sendo que para os ensaios de atividade anticâncer *in vitro* (viabilidade celular) foram utilizadas para fins de comparação as concentrações efetivamente encapsuladas.

Tabela 2. Características físico-químicas dos miméticos de hemácias, miméticos de hemácia com peptídeo, lipossomo e lipossomo com peptídeo, quitosana e quitosana com peptídeo, quitosana revestida com polietilenoglicol (PEG) e quitosana revestida com polietilenoglicol com hidrolisado de hemoglobina revestida com polietilenoglicol. Eficiência de encapsulamento (E.E.). Índice de polidispersividade (PdI). Valores referentes a médias de três leituras independentes.

Partícula	Diâmetro Hidrodinâmico (nm)	PdI	Potencial Zeta (mV)	E.E. (%)
Mimético de Hemácia	2700,7 ± 465,8	0,92 ± 0,08	- 14,8 ± 0,3	-
Mimético de Hemácia-Pep	3696,0 ± 516,9	0,84 ± 0,15	- 9,1 ± 0,3	-
Lipossomo	140,7 ± 3,3	0,33 ± 0,01	- 12,1 ± 1,0	-
Lipossomo-Pep	658,3 ± 42,2	0,50 ± 0,06	- 6,4 ± 0,7	88,9
Quitosana	545,9 ± 34,3	0,94 ± 0,06	+ 49,6 ± 0,3	-
Quitosana Pep	309,1 ± 9,4	0,98 ± 0,02	+ 64,2 ± 1,6	78,0
Quitosana-PEG	266,0 ± 11,1	0,60 ± 0,04	+ 26,8 ± 0,5	-
Quitosana-PEG Pep	904,4 ± 7,0	0,64 ± 0,04	+ 62,9 ± 1,5	81,7

5.7 Avaliação dos efeitos dos nanossistemas desenvolvidos sobre a viabilidade celular

5.7.1 Miméticos de hemácia

As células foram incubadas com os miméticos de hemácia e miméticos Pep (com hidrolisado de hemoglobina) por 24 horas. Miméticos com peptídeo a 256 µg/mL diminuíram em aproximadamente 14% a viabilidade de células 4T1 em relação ao controle, e a concentração de 512 µg/mL diminuiu em aproximadamente 12% a viabilidade das células em relação à concentração de 1024 µg/mL; os miméticos sem peptídeo aumentaram em aproximadamente 8% a viabilidade das células 4T1 na concentração de 1024 µg/mL em relação às concentrações de 128, 256 e 512 µg/mL (Figura 23A). Para as células NIH3T3, os Miméticos-Pep diminuíram a viabilidade celular para as concentrações maiores que 64 µg/mL em relação ao controle (~4 a 10%), exceto para 1024 µg/mL; os Miméticos sem peptídeos também diminuíram a viabilidade celular para concentrações acima de 64 µg/mL (~11% a 17%) (Figura 23B). Foram ainda identificadas diferenças significativas entre os Miméticos e Miméticos-Pep nas concentrações de 256, 512 e 1024 µg/mL para as células NIH3T3 ($P < 0,05$).

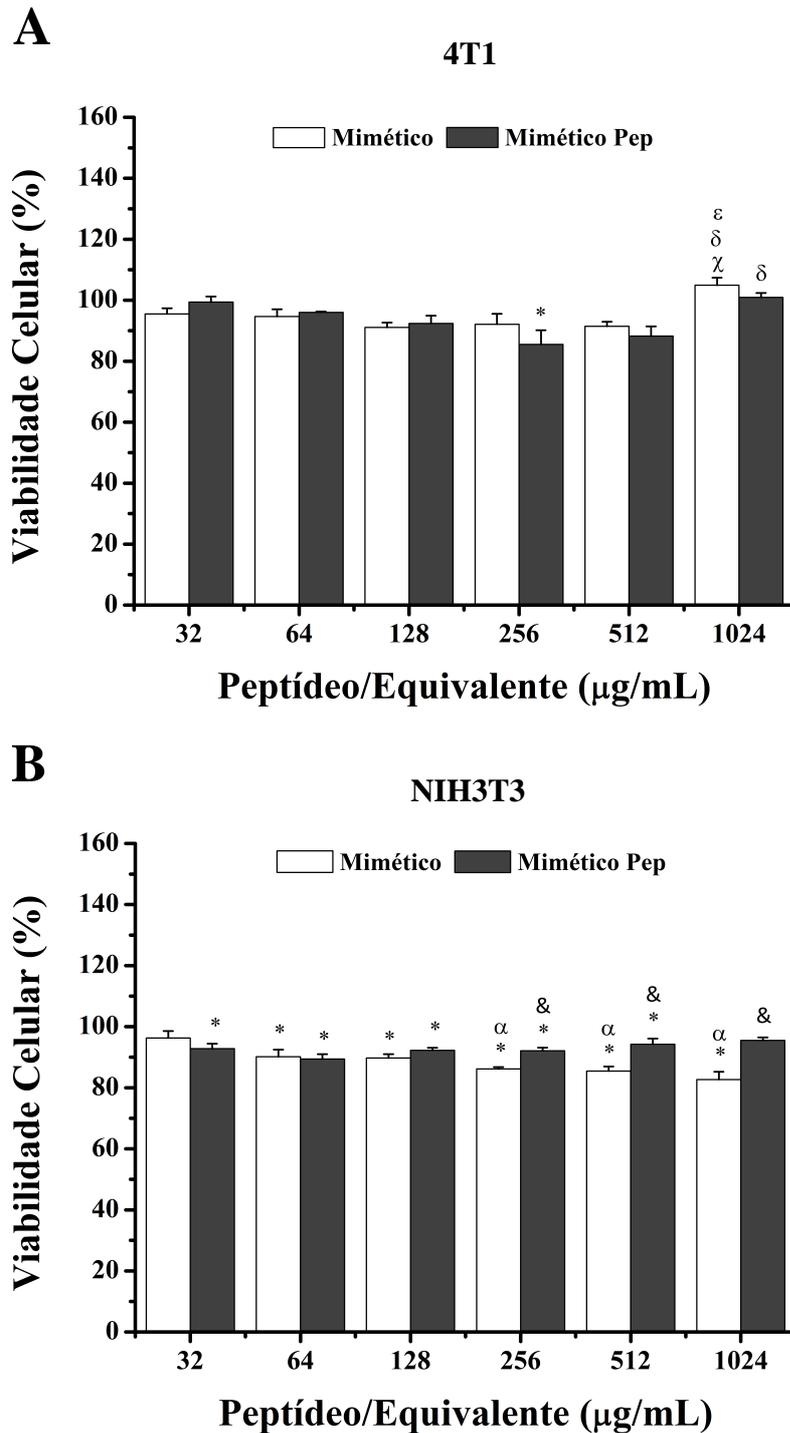


Figura 23. Avaliação de viabilidade de células de câncer de mama (4T1) e fibroblastos murinos normais (NIH3T3) pelo ensaio de MTT após 24 horas de tratamento com Mimético e Mimético-Pep. Equivalente de partículas vazias referente à quantidade de partículas presente no grupo contendo peptídeo. Diferença estatisticamente significativa ($P < 0,05$) em relação ao controle - 0 $\mu\text{g/mL}$ (*), 32 $\mu\text{g/mL}$ (α), 128 $\mu\text{g/mL}$ (χ), 256 $\mu\text{g/mL}$ (δ), 512 $\mu\text{g/mL}$ (ϵ) e mimético (&).

5.7.2 Lipossomos

Todas as concentrações de Lipossomos-Pep (contendo hidrolisado de hemoglobina) diminuíram significativamente, 37% a 51%, a viabilidade de células de câncer de mama quando comparadas ao controle, contudo não apresentaram relação concentração ou dose dependente (Figura 24, $P < 0,05$). Lipossomos sem hidrolisado de hemoglobina reduziram em 14% a viabilidade celular na maior concentração em relação ao controle e a concentração em equivalência de matéria (Figura 24, $P < 0,05$). Em todas as concentrações os lipossomos com hidrolisado de hemoglobina (Lipossomo-Pep) diminuíram a viabilidade celular quando comparadas aos lipossomos vazios (Figura 24, $P < 0,05$).

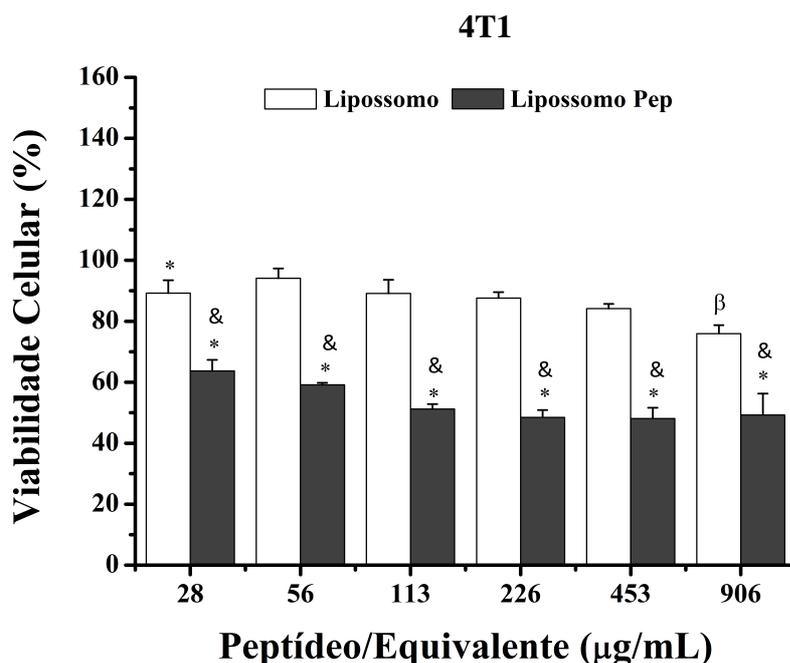


Figura 24. Avaliação da viabilidade de células de câncer de mama 4T1 pelo ensaio de MTT após 24 h de tratamento com Lipossomos e Lipossomos-Pep. Equivalente de partículas vazias referente à quantidade de partículas presente no grupo contendo peptídeo. Diferença estatisticamente significativa ($P < 0,05$) em relação ao controle - 0 µg/mL (*), 56 µg/mL (β) e lipossomo (&).

5.7.3 Nanopartículas poliméricas de quitosana

Partículas de Quitosana-Pep (contendo o hidrolisado de hemoglobina) diminuíram em 10% e 20% a viabilidade de células 4T1 em relação ao controle nas concentrações de 216 e 865 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente (Figura 25A, $P < 0,05$). A maior concentração testada (865 $\mu\text{g/mL}$) reduziu em 17-21% a viabilidade de células 4T1 quando comparadas as concentrações 54, 108 e 432 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 25A, $P < 0,05$). Partículas de quitosana sem hidrolisado de hemoglobina e Quitosana-Pep apresentaram diferenças entre si para as concentrações de 108 e 865 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 25A, $P < 0,05$). Partículas sem hidrolisados não alteraram a viabilidade de células 4T1 (Figura 25A).

Partículas de Quitosana-Pep diminuíram a viabilidade de células NIH3T3 (11% a 16%) em todas as concentrações quando comparadas ao controle; adicionalmente, a concentração de 216 $\mu\text{g/mL}$ diminui a viabilidade celular quando comparadas as concentrações de 27 e 54 $\mu\text{g/mL}$. Partículas de quitosana, sem o hidrolisado de hemoglobina, diminuíram em 14% e 11% a viabilidade celular na maior e menor concentração de partículas, respectivamente (Figura 25B, $P < 0,05$). Partículas de quitosana com hidrolisado de hemoglobina diminuíram a viabilidade das células NIH3T3 quando comparadas às partículas sem hidrolisado para as concentrações de 108, 216 e 865 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 25B, $P < 0,05$).

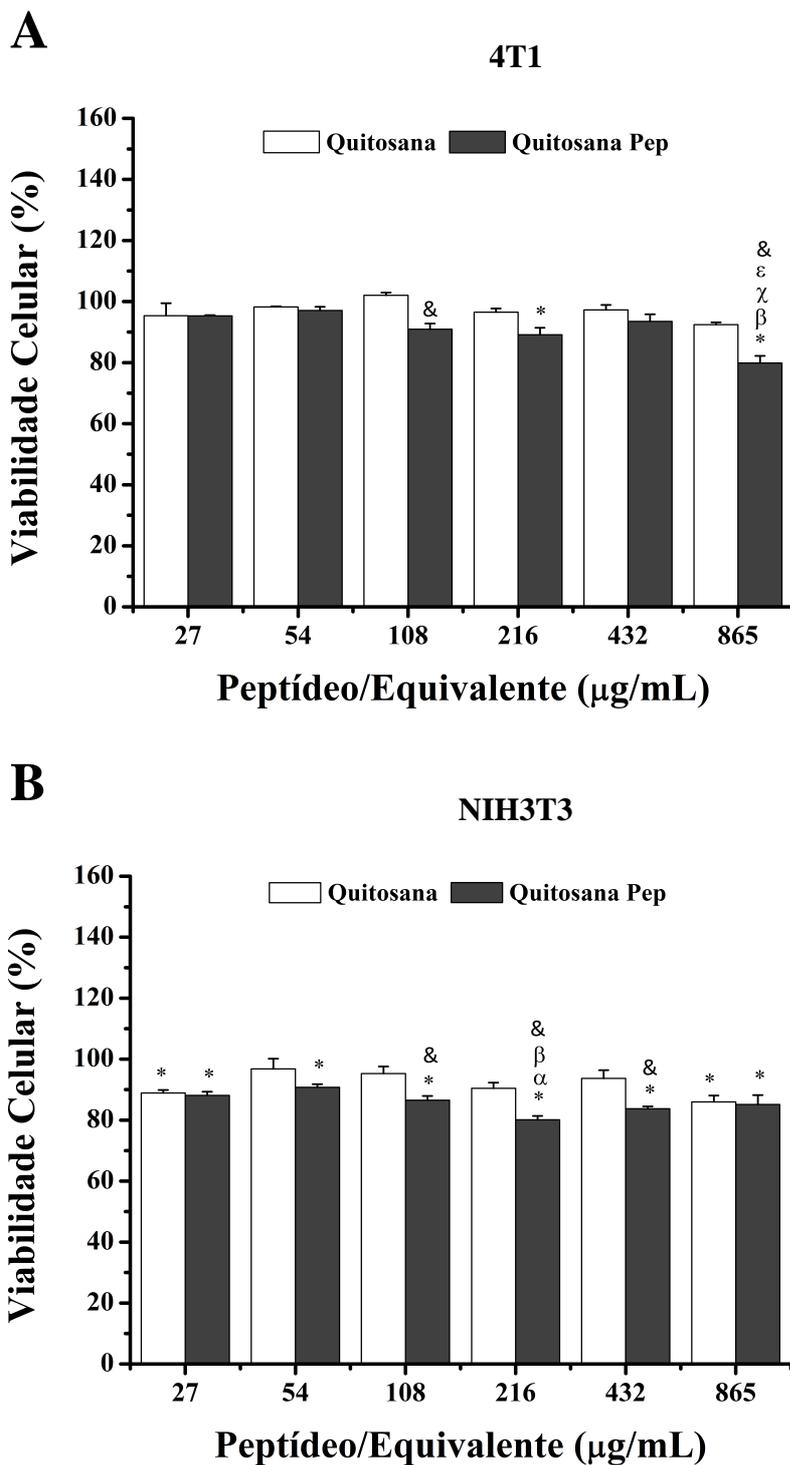


Figura 25. Avaliação da viabilidade de células de carcinoma de mama 4T1 pelo ensaio de MTT após 24 h de tratamento com nanopartícula de Quitosana e Quitosana-Pep Equivalente de partículas vazias referente à quantidade de partículas presente no grupo contendo peptídeo. Diferença estatisticamente significativa ($P < 0,05$) em relação ao controle - 0 $\mu\text{g/mL}$ (*), 27 $\mu\text{g/mL}$ (α), 54 $\mu\text{g/mL}$ (β), 108 $\mu\text{g/mL}$ (χ), 432 $\mu\text{g/mL}$ (ε) e quitosana (&).

5.7.4 Nanopartículas poliméricas de Quitosana PEG

Partículas de Quitosana-PEG-Pep (contendo hidrolisado de hemoglobina) diminuíram a viabilidade de células 4T1 em 15% a 26% com efeito dose dependentes quando comparadas ao controle (Figura 26A, $P < 0,05$). Partículas de quitosana PEG reduziram a viabilidade das células em 5% a 20%, sendo que a maior redução ocorreu para a maior concentração de partículas testadas ($P < 0,05$, Figura 26A). Todas as concentrações de Quitosana-PEG-Pep nas concentrações abaixo de 906 $\mu\text{g/mL}$ acarretaram na diminuição da viabilidade das células 4T1 em comparação a partícula Quitosana-PEG ($P < 0,05$, Figura 26A).

Todas as partículas contendo hidrolisado de hemoglobina (Quitosana-PEG- Pep) diminuíram a viabilidade das células NIH3T3 entre 5% e 19% para as concentrações abaixo de 906 $\mu\text{g/mL}$, sendo que para 113 $\mu\text{g/mL}$ a diminuição chegou a 19% (Figura 26B, $P < 0,05$). A partícula vazia só diminuiu significativamente a viabilidade das células NIH3T3 para a concentração de 56 $\mu\text{g/mL}$ em comparação ao controle, sendo que essa foi de aproximadamente ~7%. Para todas as concentrações de Quitosana-PEG-Pep nas concentrações abaixo de 453 $\mu\text{g/mL}$ ocorreu diminuição na viabilidade das células NIH3T3 em comparação a partícula Quitosana PEG (Figura 26B, $P < 0,05$).

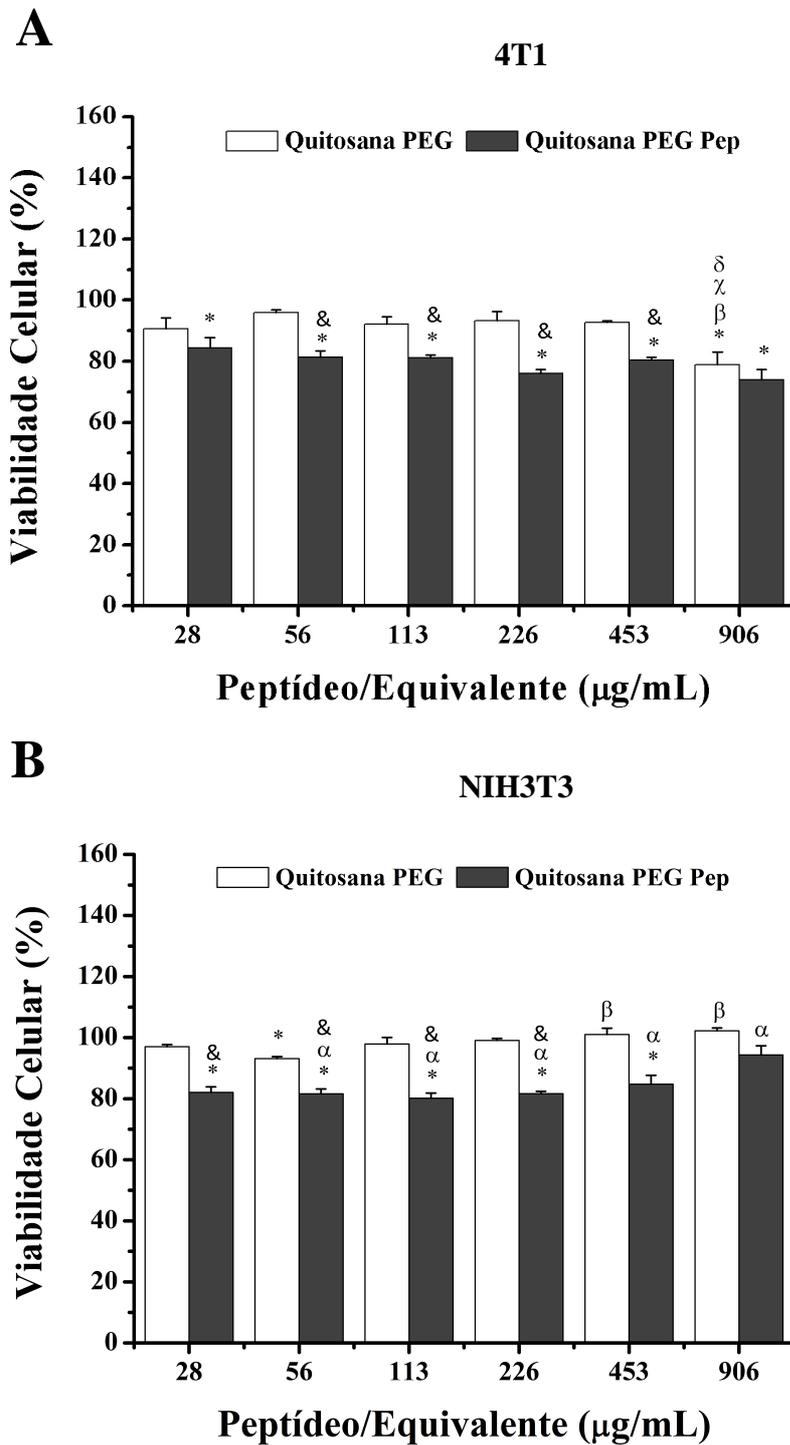


Figura 26. Avaliação da viabilidade de células de câncer de mama 4T1 pelo ensaio de MTT após 24 h de tratamento com nanopartícula de Qitosana PEG e Qitosana PEG Pep em diferentes concentrações. Equivalente de partículas vazias referente à quantidade de partículas presente no grupo contendo peptídeo. Diferença estatisticamente significativa ($P < 0,05$) em relação ao controle - 0 µg/mL (*), 28 µg/mL (α), 56 µg/mL (β), 113 µg/mL (γ), 226 µg/mL (δ) e quitosana PEG (&).

5.8 Avaliação dos efeitos das nanopartículas poliméricas de quitosana desenvolvidas sobre a proliferação celular

Para avaliar se o hidrolisado de hemoglobina livre bem como se as partículas de quitosana induzem alguma alteração na proliferação celular foram avaliados os efeitos dessas condições em relação ao número de células 4T1. Para o ensaio foram consideradas as máximas concentrações para os peptídeos livre (1024 $\mu\text{g/mL}$) e para as partículas de quitosana (865 $\mu\text{g/mL}$, peptídeo/equivalente). Após 24 horas de incubação com os peptídeos livres ou as partículas de quitosana sem e com hidrolisado de hemoglobina não foram observadas alterações significativas no número total de células quando comparadas ao grupo controle ($P < 0,05$) (Figura 27).

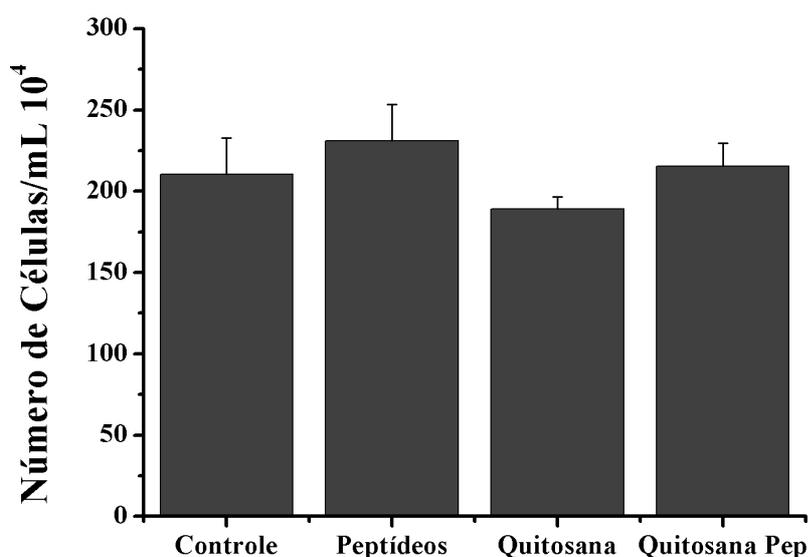


Figura 27. Número de células de câncer de mama (4T1) na ausência ou presença dos peptídeos e partículas de Quitosana e Quitosana Pep após 24 horas de tratamento. Número de células obtidas a por meio de contagem total das células em câmara de Neubauer após o tempo de incubação.

5.9 Avaliação dos efeitos das nanopartículas poliméricas de quitosana desenvolvidas sobre a integridade de membrana plasmática

Foram também avaliados efeitos do hidrolisado de hemoglobina livre e das partículas quitosana sobre a integridade da membrana plasmática de células 4T1. Para o ensaio foram consideradas as máximas concentrações para os peptídeos livre (1024 $\mu\text{g/mL}$) e para as partículas de quitosana (865 $\mu\text{g/mL}$, peptídeo/equivalente). Após 24 horas de incubação os peptídeos livres e as partículas de quitosana sem e com peptídeo não apresentaram alterações na integridade da membrana plasmática quando comparadas ao grupo controle ($P < 0,05$) (Figura 28).

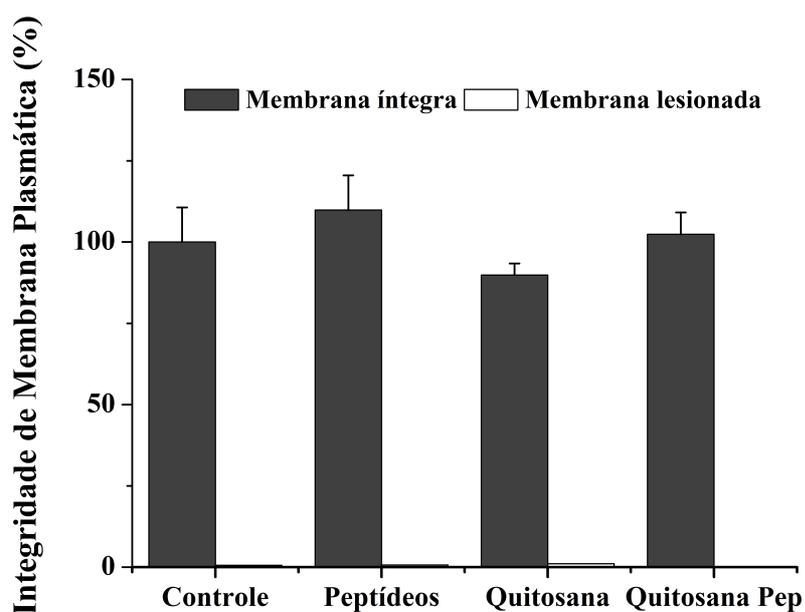


Figura 28. Avaliação da integridade de membrana plasmática de células 4T1 na ausência ou presença dos peptídeos e partículas de Quitosana e Quitosana Pep após 24 horas de tratamento. Após o tratamento as células foram incubadas com azul de tripan e contadas em câmara de Neubauer. Células coradas de azul apresentam a membrana plasmática lesionada.

5.10 Avaliação dos efeitos das nanopartículas poliméricas de quitosana desenvolvidos sobre o perfil proteico das células após o tratamento

Para avaliar a hipótese de que após a exposição ao hidrolisado de hemoglobina livre e a partículas de quitosana (Quitosana e Quitosana-Pep) por 24 horas as células tumorais teriam seu perfil de proteínas alterado. Neste intuito, as células tiveram suas proteínas extraídas e avaliadas por espectrometria de massa pelo método Biotyper. Para o tratamento foram consideradas as máximas concentrações para os peptídeos livre (1024 µg/mL) e para as partículas de quitosana (865 µg/mL, peptídeo/equivalente). Para possibilitar a comparação e a não influência dos peptídeos livres nos espectros adquiridos o mesmo também foi avaliado. Após o tratamento ocorreu modificação no perfil de proteínas das células quando comparadas as células controle e ao peptídeo livre (Figura 29).

Os espectros adquiridos foram utilizados para criação de um espectro de massa padrão, representativo para cada grupo. Em seguida, os mesmos foram utilizados para a obtenção de um dendrograma visando ao possível agrupamento dos grupos estreitamente relacionados entre si sob o ponto de vista molecular. O dendrograma formado indicou a presença de dois grupos principais, sendo representado pelo peptídeo livre e o outro pelas células não submetidas e submetidas ao tratamento. O grupo formado pelas células desmembrou-se em dois subgrupos um formado pelas células controle e tratadas com Quitosana, e o outro formado pelas células tratadas com o peptídeo livre e com as partículas de Quitosana-Pep, indicando que os peptídeos causam alteração no perfil proteico das células após o tratamento (Figura 30).

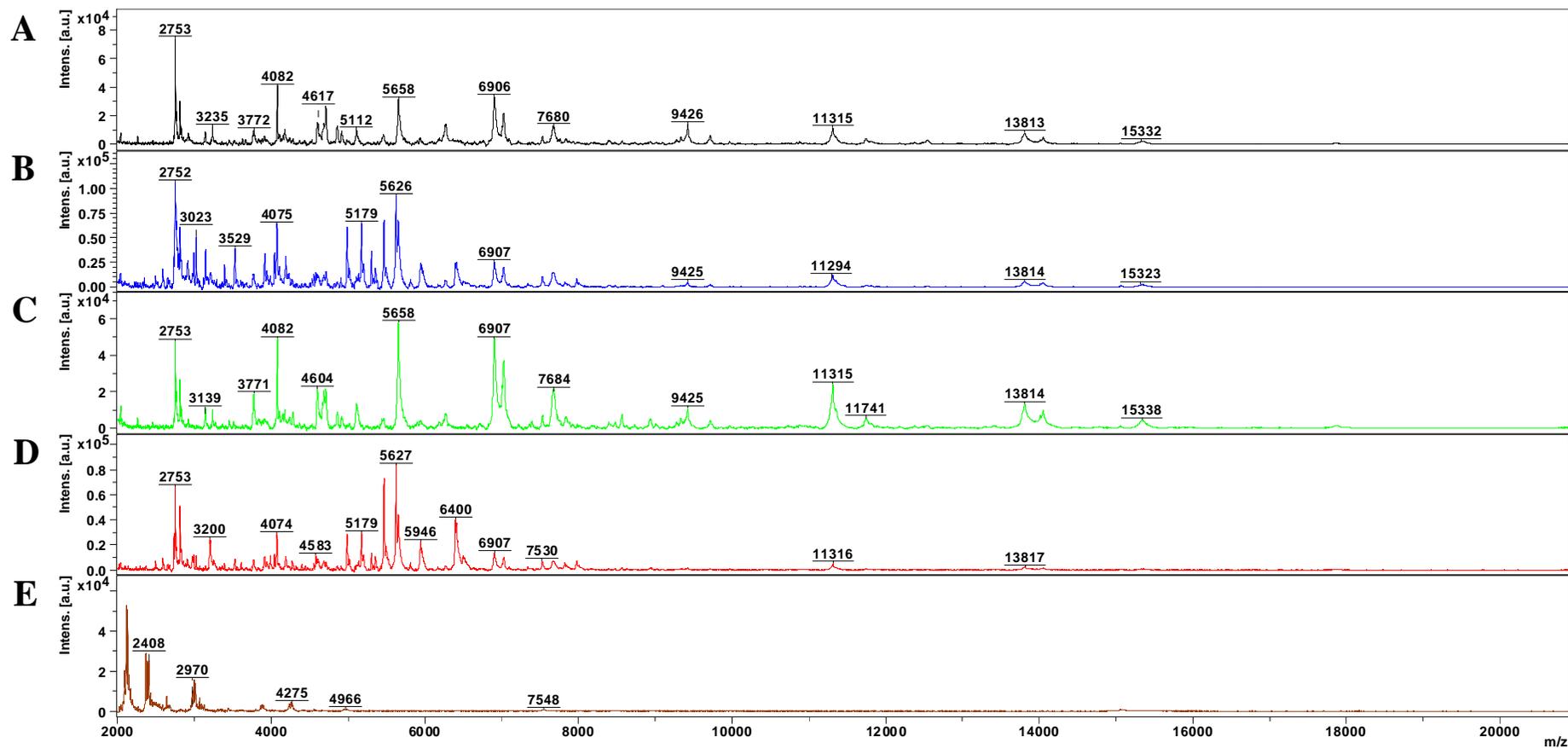


Figura 29. Espectros de massa dos perfis proteicos de hidrolisado de hemoglobina livre e células 4T1 após exposição aos tratamentos obtidos por meio de espectrometria de massa MALDI-TOF operada em modo linear positivo na faixa m/z 2000-22000. (A) Perfil proteico das células sem exposição ao tratamento. (B) Perfil proteico das células após o tratamento com hidrolisado de hemoglobina livre. (C) Perfil proteico das células após o tratamento com partículas de quitosana. (D) Perfil proteico das células após o tratamento com partículas de quitosana contendo hidrolisado de hemoglobina. (E) Perfil proteico do hidrolisado de hemoglobina.

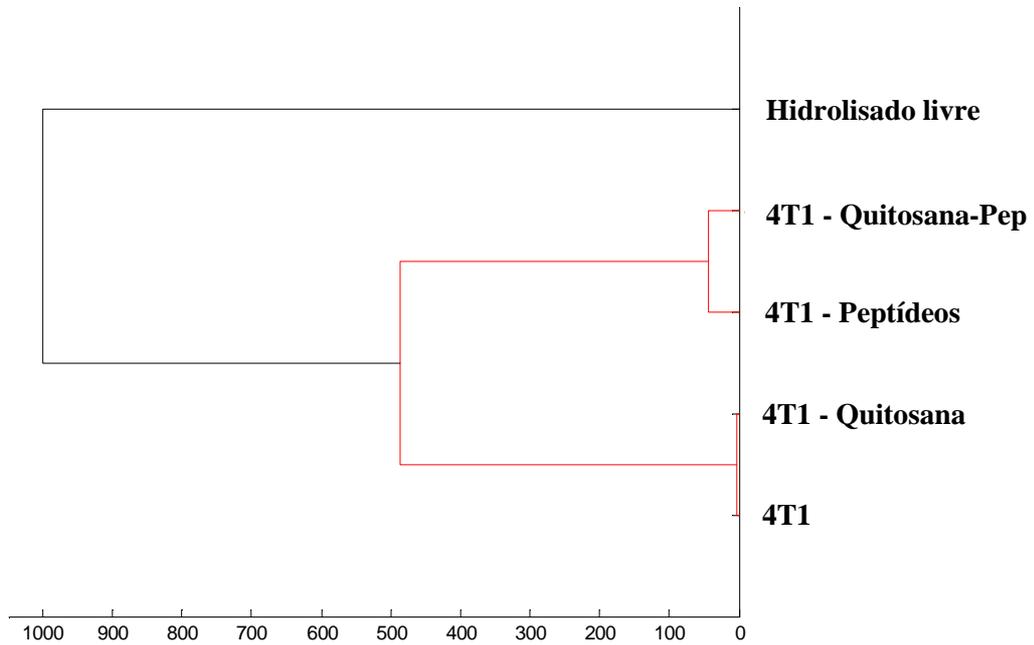


Figura 30. Dendrograma a partir do agrupamento de espectros de massa referentes aos perfis proteicos do hidrolisado de hemoglobina livre, células 4T1 controle, células 4T1 após incubação com hidrolisado de hemoglobina livre, e incubadas com partículas de Quitosana (sem hidrolisado de hemoglobina) e Quitosana Pep (com hidrolisado de hemoglobina).

6. DISCUSSÃO

O Câncer é atualmente responsável por altas taxas de mortes em todo o mundo. Nesse contexto, nas últimas décadas têm crescido consideravelmente o interesse pelo desenvolvimento de novos sistemas de liberação sustentada e entrega de fármacos, devido à necessidade de medicamentos seguros e capazes de atingir o alvo, minimizando assim os efeitos adversos resultante dos tratamentos convencionais mais utilizados contra o câncer. Estudos relatam a possibilidade de utilização das hemácias na formação de sistemas de transporte de drogas eficientes, outros relatos destacam o papel desempenhado pela hemoglobina na formação de peptídeos endógenos com diversas funções biológicas, dentre elas antitumoral (KERELIN *et al.*, 1995; SONG, 2012). Entretanto nenhuma abordagem até o presente momento relata a utilização de hemácias para transporte de peptídeos bioativos obtidos a partir de hidrolisados de hemoglobina.

Na maioria dos mamíferos (exceto camelídeos - elipsoidais), as hemácias circulantes nos indivíduos adultos são discos bicôncavos anucleados, com medidas de diâmetro médio e volumes variados, com 98% do seu conteúdo intracelular sendo constituído por hemoglobina. Hemácias possuem alta sensibilidade a alterações de pressão osmótica, nesse sentido pequenas alterações na osmolaridade do meio podem acarretar em alterações na permeabilidade da membrana plasmática o que pode levar ao extravasamento de componentes intracelulares, como íons e moléculas, dentre elas a hemoglobina, bem como possibilitar a entrada de outras moléculas nessas células. Adicionalmente, as hemácias possuem a capacidade de voltar à sua condição de equilíbrio quando a condição de osmolaridade ideal é reestabelecida (IHLER, *et al.*, 1987).

O uso de sais como NaCl em concentrações inferiores às encontradas nos sistemas biológicos constitui uma possibilidade de alteração nesses padrões osmóticos

podendo ser utilizadas de forma apropriada em estratégias que visem o esvaziamento da célula e remoção de seu conteúdo proteico. O presente estudo confirmou que concentrações de NaCl de 0,5% e 0,75% levaram à alterações na osmolaridade do meio e consequentemente a alterações na integridade celular e liberação de hemoglobina, conforme avaliada por espectrofotometria, resultado este esperado para NaCl 0,5% uma vez que estudos já relatavam que concentrações de NaCl em concentrações abaixo de 0,4% leva ao desequilíbrio osmótico e consequentemente ao efluxo de íons e proteínas (IHLER, *et al.*, 1987).

A partir do extrato formado e dos componentes liberados pelas hemácias foram observadas massas moleculares correspondentes às esperadas para a cadeia α (~15 kDa) e β (~16 kDa) da hemoglobina por espectrometria de massa como já foi verificado por outros autores (BEMQUERER, *et al.*, 2012). A presença da molécula de hemoglobina foi confirmada pelo sequenciamento direto dos resíduos de aminoácidos constituintes da estrutura primária da cadeia α pelo método ISD ou pelo sequenciamento de fragmentos tríptico obtidos após hidrólise enzimática.

Segundo IVANOV e colaboradores (2005) a principal proteína conhecida geradora de peptídeos endógenos é a hemoglobina e estes são gerados a partir de processos de hidrólise enzimática ou alteração de pH do meio. Nesse contexto, a partir das sequências de resíduos de aminoácidos referentes às cadeias α e β da hemoglobina foram realizadas clivagens teóricas, na presença de diferentes enzimas, nas quais peptídeos *in silico* foram gerados, havendo assim a possibilidade desses peptídeos também serem formados *in vitro* e *in vivo*. Deste modo no presente estudo, foi avaliada a clivagem específica utilizando enzimas as quais hidrolisam em resíduos ácidos (V8), resíduos básicos (tripsina) e pequenos resíduos como glicina, alanina e serina (pepsina); e a possível clivagem inespecífica a partir de extremos de pH (2 e 12) que poderiam

favorecer a hidrólise ou criar um ambiente favorável à ação de peptidases endógenas. Com base nos resultados obtidos foi constatado que para as diferentes condições de hidrólise, a tripsina foi a enzima que levou a uma diminuição mais pronunciada na viabilidade de células de câncer de mama (4T1). Esses resultados corroboram os descritos na literatura onde a tripsina tem sido amplamente utilizada em biotecnologia por se tratar de uma enzima com alta especificidade e rendimento de hidrolisado (ZHANGA, *et al.*, 2009). Uma diversidade de peptídeos bioativos gerados a partir da hemoglobina já foi descrita dentre os quais encontram os opióides com atividade antitumoral, sendo obtidos a partir do tratamento da hemoglobina com enzimas gastrointestinais, dentre elas a tripsina (BRANTL, *et al.* 1986).

A partir do sobrenadante do extrato hidrolisado com tripsina foi identificada a presença de um íon abundante o qual foi fragmentado e o peptídeo correspondente foi sequenciado *De novo* a partir de espectros de MS/MS (LLVVYPWTQR). Este peptídeo identificado como pertencente à família das hemorfinas, já foi descrito por diversos autores como sendo presente em diversos organismos (KARELIN, 1994), e recentemente foi identificado em anfíbio por Bemquerer e colaboradores (2012).

Hemorfinas são peptídeos opióides bioativos derivados da proteólise das cadeias β da hemoglobina. As hemorfinas são geradas devido a uma degradação sequencial da hemoglobina que gera uma série de peptídeos estruturalmente sobrepostos com extensão Tyr-Pro-Trp (YPW, tirosina-prolina-triptofano) e mudanças no N- e/ou no C-terminal. Hemorfina-3 a -7 possuem truncamentos nas regiões C-terminais. As subfamílias da hemorfina envolvem sequências idênticas no N-terminal e são identificadas como hemorfinas, V-hemorfinas, VV-hemorfinas e LVV-Hemorfinas (SONG *et al.*, 2012). Nos últimos anos vários estudos têm demonstrado uma gama de

efeitos biológicos desempenhados pelas hemorfinas como, por exemplo, efeitos antitumorais (BLISHCHENKO *et al.*, 1997, 2005; NYBERG *et al.*, 1997).

Tendo em vista que o processo de hidrólise da hemoglobina potencialmente gera inúmeros peptídeos optou-se então pelo isolamento e purificação de alguns deles por meio de cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa visando à obtenção de frações contendo os peptídeos com possível atividade antitumoral, como a hemorfina. Os resultados obtidos mostraram a presença de alta abundância do grupo heme (fração eluída em 49 min), da cadeia intacta da hemoglobina (Fração eluída em 52 min) e de diversas frações minoritárias. Este baixo rendimento em procedimentos de hidrólise de hemoglobina *in vitro* já havia sido observado por BEMQUERER e colaboradores (2012) para intervalos de tempo menores que 24 horas. Sendo assim, nos experimentos posteriores visando à obtenção de hidrolisado com maior rendimento na produção de peptídeos derivados de hemoglobina, foi adotado um intervalo de tempo maior para digestão, sendo padronizado em 48 horas. Contudo, os ensaios de viabilidade celular sobre linhagens tumoral (4T1) e não tumoral (NIH3T3) mostrou que mais de uma fração era capaz de diminuir a viabilidade das células, indicando que nos hidrolisados totais seria possível a ocorrência de algum tipo de mecanismo de ação sinérgico o qual poderia atuar como potencializador no processo de morte celular, uma vez que diferentes peptídeos derivados da hemoglobina possuem atividade citotóxica e também do grupo heme, como já demonstrado na literatura (JENEY *et al.*, 2002).

O baixo rendimento de hemoglobina obtida a partir de sangue periférico de camundongos fez com que fosse realizada uma busca por alguma fonte comercial de hemoglobina. Dessa forma, foi realizada uma busca por similaridades de sequência com hemoglobinas de outras espécies de mamíferos, o que mostrou uma alta similaridade dos resíduos de aminoácidos das cadeias α e β das moléculas de hemoglobina para

camundongos, bovinos e humanos, bem como na geração dos mesmos peptídeos após a clivagem tríptica, em particular os peptídeos hemorfina e a neoquiotorfina, ambos com atividades anticâncer (BLISHCHENKO *et al.*, 2001).

O tratamento com hemoglobina intacta não ocasionou diminuições na viabilidade celular para as duas linhagens nos tempos de 24 e 48 horas. Contudo, ocorreu uma diminuição na viabilidade das células de câncer de mama (4T1) e fibroblasto (NIH3T3) tratadas com hidrolisado de hemoglobina após 72 horas de tratamento e isso pode estar relacionado à clivagem da molécula pela atuação de proteases secretadas pelas próprias células, uma vez que já foi demonstrado que essas linhagens celulares quando em cultura secretam altos níveis de serinoproteases com especificidade semelhante a da tripsina (NAM, *et al.*, 1994; NOVOTNÁ, *et al.*, 2010).

O hidrolisado de hemoglobina diminuiu a viabilidade das células 4T1 e NIH3T3 em relação ao controle de maneira concentração dependente, exceto para o tempo de 72 horas. Apesar da diminuição na viabilidade celular ter sido significativa quando comparada ao controle, a inibição não ultrapassou 11% para as células 4T1 e 15% para as células NIH3T3, para os três tempos de incubação. As diminuições na viabilidade celular podem estar relacionadas ao tamanho do fragmento de hemorfina gerado durante a hidrólise. BLISHCHENKO e colaboradores (2002) demonstraram que a diminuição da citotoxicidade está relacionada à degradação das extensões do N- e C-terminal, onde a presença do resíduo de leucina no N-terminal diminui o efeito citotóxico desses peptídeos, bem como a presença de glicina no C-terminal é importante na diminuição da proliferação celular. Dessa forma, VV-hemorfinas apresentam mais citotoxicidade que as LVV-hemorfinas. Com base nisso, não é possível avaliar quais fragmentos de hemorfinas estariam atuando efetivamente na diminuição da viabilidade, uma vez que as

próprias células produzem e liberam serinoproteases e outras proteases que poderiam também estar atuando na clivagem dos peptídeos no próprio ambiente da cultura celular.

Uma vez reportada a liberação de proteases pelas células em cultura e que estas possuem atividade semelhante à tripsina (NAM, *et al.*, 1994; NOVOTNÁ, *et al.*, 2010), hemoglobina intacta e tripsina livre (digestão *in situ*) foram utilizadas para o tratamento das duas linhagens celulares em diferentes tempos. A avaliação dos resultados indicou a diminuição mais expressiva na viabilidade de células 4T1, sugerindo que a formação contínua e progressiva dos peptídeos derivados da hemoglobina com diferentes tamanhos, o que estaria diretamente relacionado à sua maior ou menor atividade (BLISHCHENKO *et al.*, 2002).

Visando impedir a degradação dos peptídeos *in vitro*, em particular da hemorfina em fragmentos menores, pelas proteases secretadas pelas células, o hidrolisado de hemoglobina conjuntamente com um coquetel de inibidores de proteases foram utilizados para o tratamento das duas linhagens celulares em diferentes tempos. Os resultados obtidos indicaram diminuição dose-dependente da viabilidade de células 4T1 em até 20% e de até 22% para células NIH3T3, indicando uma possível inibição da ação hidrolítica das proteases sobre os peptídeos a longo prazo.

Tendo em vista as baixas taxas de inibição da viabilidade celular promovidas pelo hidrolisado da hemoglobina para células de câncer de mama (4T1) e para os fibroblastos (NIH3T3) optou-se pelo encapsulamento desses peptídeos visando ao possível aumento da potencialidade de ação dos mesmos para células 4T1 bem como a diminuição da citotoxicidade para NIH3T3. Nesse sentido, foram utilizadas três abordagens distintas para o desenvolvimento de sistemas carreadores. O primeiro foi baseado na utilização de hemácias para formação de miméticos; o segundo na formulação de lipossomos a partir de lipídeos extraídos das membranas de hemácias, e

o terceiro utilizando quitosana, um polímero natural isolado ou em associação a polietilenoglicol. Os sistemas foram escolhidos com base em suas características físico-químicas e estruturais distintas.

Para o desenvolvimento dos miméticos de hemácias foram utilizados dois protocolos distintos. O primeiro protocolo envolveu o esvaziamento das hemácias por meio da liberação da hemoglobina intracelular em meio hipotônico, seguida pela adição do hidrolisado de hemoglobina murina e reconstituição dos miméticos em meio fisiológico. Contudo, devido ao longo período demandado pelo processo de hidrólise da hemoglobina para a geração do hidrolisado, essa abordagem levou a uma desorganização das membranas celulares das hemácias levando à formação de pequenas estruturas, e grande desestabilização das membranas celulares, principalmente na presença do hidrolisado em comparação ao mimético controle.

O segundo protocolo envolveu o esvaziamento das hemácias por meio da liberação da hemoglobina celular em meio hipotônico, seguida pela adição imediata do hidrolisado de hemoglobina comercial já obtido anteriormente e com a subsequente reconstituição em meio fisiológico. Nesse caso, ocorreu a formação de estruturas micrométricas, disformes e indefinidas, com altos índices de polidispersividade e cargas de superfície negativas. Tendo em vista que os miméticos desenvolvidos apresentaram perceptíveis alterações nas membranas, alguns autores já relataram que danos nas membranas facilitam o reconhecimento *in vivo* das células pelo sistema reticuloendotelial, sendo estas facilmente removidas do sistema biológico (LOTERO *et al.*, 2003). Contudo, *in vitro* essas alterações poderiam facilitar a biodisponibilidade da droga. Além disso, o uso de hemácias para o revestimento de partículas poliméricas pode aumentar o tempo de circulação das partículas de quitosana *in vivo*, de pouco minutos para até 10 horas (CHAMBERS, *et al.*, 2004). Aperfeiçoamentos no tempo de

circulação para essas partículas foram obtidas modificando a superfície das partículas por adição de polietilenoglicol (CHAMBERS, 2007).

Alguns autores têm relatado que as hemácias circulantes apesar de fornecerem um período prolongado na circulação e capacidade de carrear diversas drogas e partículas elas não seriam um carreador ideal para alguns devido a sua restrição de atividade em vasos sanguíneos devido às suas dimensões micrométricas (YOO, *et al.*, 2011). Adicionalmente, segundo HUGHES (2005) o tamanho das partículas é de suma importância dependendo do alvo que se deseja alcançar dentro do organismo, sendo que para o tratamento de tumores e potencial penetração das partículas no mesmo, as partículas devem apresentar tamanhos entre 100 e 1000 nm tendo em vista que os tumores possuem microvasculatura nessa faixa de tamanho.

Nesse sentido no presente estudo optou-se em uma segunda etapa pelo desenvolvimento de lipossomos com fosfolípidos oriundos das membranas de hemácias visando a possível obtenção de partículas nanométricas pelo método de extrusão. Adicionalmente, pelo fato de que buscas realizadas na literatura não indicaram a formulação de lipossomos a partir de membranas de hemácias para carrear peptídeos oriundos da molécula de hemoglobina. O lipossomo vazio e com hidrolisado de hemoglobina apresentaram tamanhos nanométricos, menor índice de polidispersividade e diminuição da carga de superfície quando comparados aos miméticos de hemácias.

Lipossomos têm sido utilizados para encapsulação de proteínas terapêuticas e outros fármacos e esse fato já é bem estabelecido na literatura. Eles podem ser utilizados tanto para a liberação controlada de fármacos quanto para entrega de seu conteúdo diretamente no citoplasma da célula (COLLETIER, *et al.*, 2002; TORCHILINI, 2008). Nesse sentido, foi investigada a possível formulação de lipossomos utilizando lípidos extraídos de membranas de hemácias, bem como a

potencialidade dos mesmos no encapsulamento do hidrolisado de hemoglobina. Os lipossomos obtidos apresentaram diminuição no tamanho e maior regularidade quando comparados aos miméticos de hemácias, sendo que para os lipossomos vazios e com peptídeos quando comparados aos miméticos de hemácias apresentaram uma diminuição no tamanho de 19 e 5 vezes, respectivamente. Os lipossomos apresentaram aumento no diâmetro hidrodinâmico quando formulados na presença do hidrolisado de peptídeos em relação ao vazio, bem como um aumento na polidispersividade e diminuição das cargas de superfície. Alguns estudos já haviam mostrado que lipossomos produzidos a partir de fosfolipídeos sintéticos (constituídos por únicos componentes moleculares) levavam ao desenvolvimento de sistemas mais uniformes os quais apresentaram distribuições unimodais nos índices de polidispersividade (MISHRA, *et al*, 2009; SEGUIN, *et al*, 2013); diferentemente lipossomos desenvolvidos a partir de componentes complexos constituídos por múltiplos componentes, tendem a formação de sistemas mais heterogêneos apresentando distribuições polimodais nos índices de polidispersividade. Os lipossomos vazios apresentaram menor carga de superfície em relação ao lipossomo contendo o hidrolisado de hemoglobina sugerindo a presença de peptídeos catiônicos ou outras biomoléculas expostas na superfície.

Tendo em vista que os dois sistemas desenvolvidos anteriormente apresentaram tamanhos variados, com polidispersividade alta e moderada, cargas superficiais negativas e instabilidade coloidal (ASTM, 1985), optou-se pelo desenvolvimento de um sistema polimérico à base de quitosana. Esta é uma molécula carregada positivamente, visando assim uma possível maior interação com as células tumorais, as quais possuem membrana carregada negativamente, bem como pelo fato de que buscas realizadas na

literatura não indicaram a utilização desta molécula na formação de sistemas particulados contendo peptídeos oriundos da hemoglobina.

As partículas de quitosana apresentaram tamanhos nanométricos, com polidispersividade e cargas superficiais positivas, boa e excelente estabilidade coloidal conforme preconizado em nota técnica (ASTM, 1985). Interessantemente os diâmetros hidrodinâmicos das partículas na presença do hidrolisado de hemoglobina diminuiu em relação à partícula vazia, indicando a ocorrência de possíveis interações dos peptídeos com as moléculas de quitosana e acarretando em uma possível reorganização dessas moléculas com a consequente alteração da nanoestrutura. Já foi relatado (HU, *et al.*, 2011) que partículas formuladas a partir de baixas razões de quitosana/peptídeos (1:2) leva a formação de nanocomplexos com tamanhos nanométricos como o desenvolvido neste trabalho.

Polietilenoglicol (PEG) tem sido utilizado como copolímero na formulação de nanoestruturas, isso porque esse polímero possui alta hidrofiliabilidade, não reconhecimento pelo sistema imune, não interação com proteínas, bem como favorece o aumento de biodistribuição (BRADLEY, *et al.*, 2002; PREGO *et al.*, 2006). A adição de PEG à formulação de quitosana resultou em uma diminuição do tamanho das partículas vazias bem como um aumento no tamanho das partículas contendo o hidrolisado, diminuição do índice de polidispersividade e na diminuição das cargas positivas das partículas quando comparadas as partículas sem a adição deste polímero.

Em virtude das peculiaridades físico-químicas e estruturais apresentadas pelos sistemas desenvolvidos (miméticos, lipossomos, partículas de quitosana e quitosana PEG) foram realizados ensaios de atividade biológica *in vitro* contra células de câncer de mama e fibroblasto.

Os miméticos de hemácias contendo o hidrolisado de peptídeos mostraram-se pouco ativos contra as células 4T1 e NIH3T3. Os miméticos vazios não apresentaram atividade para as células 4T1, contudo diminuíram a viabilidade de células NIH3T3, com efeito, dose dependente. Estudos mostram que na presença de uma fonte exógena de ácidos graxos, fibroblastos (NIH3T3) podem se diferenciar em adipócitos (CHAWLA, *et al.*, 1994; MADSEN, *et al.*, 2003). Nesse sentido, fibroblastos na presença dos miméticos de hemácias poderiam ter iniciado um processo de transformação perdendo a propriedade de aderência e soltando-se da placa durante o ensaio. Adicionalmente, a presença do hidrolisado contendo os peptídeos da hemoglobina no mimético teve o efeito oposto e pode ter atuado bloqueando o processo de diferenciação.

Os lipossomos contendo o hidrolisado foram bastante ativos contra células 4T1 diminuindo de 37% a 51% a viabilidade dessas células. Os lipossomos vazios foram ativos para a mais alta concentração reduzindo a viabilidade dessas células em aproximadamente 14% indicando citotoxicidade para a concentração de lipídeos utilizada na formulação. Alguns destes fosfolipídeos, utilizados na formulação de lipossomos, por exemplo, e constituintes de membranas quando oxidados, em especial nas formas truncadas, podem induzir a apoptose, dependendo da sua estrutura química, a concentração e o tipo de célula (FRUHWIRTH, *et al.*, 2008). O efeito citotóxico dos lipossomos-Pep pode indicar um efeito sinérgico entre o hidrolisado de hemoglobina e os lipídeos que compõe a estrutura do lipossomo. LI e colaboradores (2009) relatam a participação do grupo heme na oxidação de lipídeos. Dessa forma, a presença do grupo heme presente no hidrolisado poderia ocasionar a oxidação lipídica da membrana do lipossomo ou da célula tumoral. FRUHWIRTH e colaboradores (2008) relataram que a oxidação de alguns fosfolipídeos de membranas, em especial as formas truncadas,

induzem a apoptose dependendo da sua estrutura química, a concentração e o tipo de célula. Estudos futuros precisam ser realizados para esclarecer esses fatos.

Quitosana tem sido utilizada na formulação de nanodispositivos para a entrega de fármacos devido ao fato de ser hidrossolúvel, apresentar biocompatibilidade, ser biodegradável, atóxico e de baixo custo, além de apresentarem cargas positivas. Nesse trabalho, quitosana foi utilizada na formulação de sistemas contendo o hidrolisado de hemoglobina. As partículas de Quitosana-Pep reduziram a viabilidade de células de câncer de mama e fibroblastos. Adicionalmente, as partículas vazias não foram ativas em células de câncer de mama e diminuíram a viabilidade de fibroblastos. Essa diminuição na viabilidade dos fibroblastos é corroborada por ZHANG e colaboradores (2004), os quais relatam que em um efeito dose dependente, a quitosana pode inibir o crescimento, proliferação, biossíntese e secreção dos fibroblastos podendo ser utilizada para o tratamento de diferentes cicatrizes.

Partículas de Quitosana-PEG-Pep foram ativas diminuindo a viabilidade de células de câncer de mama (4T1) e as partículas vazias (Quitosana-PEG) diminuíram a viabilidade apenas na maior concentração testada. Partículas de Quitosana-PEG Pep foram citotóxicas diminuindo a viabilidade das células de fibroblasto em relação ao controle e as partículas de Quitosana-PEG não foram citotóxicas contra essas células indicando algum tipo de efeito protetor do PEG em relação à possível toxicidade da quitosana observada no grupo apenas tratado com partículas de quitosana vazias

Tendo em vista, que não ocorreram diferenças entre os grupos experimentais e controle investigados no ensaio de azul de tripan utilizado para averiguar possíveis alterações na membrana plasmática e conseqüentemente morte celular, optou-se pela utilização de uma abordagem mais sensível por espectrometria de massa visando à deflagração de possíveis alterações moleculares dessas células após exposição às

condições (hidrolisado livre, Quitosana e Quitosana-Pep). A análise dos espectros evidenciou mudanças nos perfis proteicos das células em relação ao controle, sugerindo mudanças nos perfis de produção de proteínas, com presença de íons de diferentes massas moleculares, em resposta ao tratamento mesmo que este não tenha acarretado em morte celular. Contudo, no presente estudo não foi possível a identificação sistemática dessas proteínas, se tornando uma etapa extremamente importante para estudos futuros uma vez que estas podem funcionar como marcadores biológicos fornecendo indícios de possíveis mecanismos de ações desses sistemas e até mesmo vias para o desenvolvimento racional de drogas terapêuticas.

Com base no sumário dos principais resultados obtidos no presente estudo (Tabelas 3 e 4) foi possível observar que apesar da maioria dos sistemas testados não terem alterado expressivamente a viabilidade das células tumorais, o desenvolvimento de nanossistemas a partir de componentes moleculares encontrados endogenamente nos organismos, como as hemácias, torna-se promissor uma vez que podem ser utilizados sinergisticamente com outras estratégias visando ao reestabelecimento da homeostase do organismo, isso porque estudos relatam que pacientes com câncer apresentam níveis séricos diminuídos desses peptídeos oriundos de hemoglobina (EDGREN *et al.*, 2010) e que poderiam ser utilizados em intervenções terapêuticas carreando esses ativos na corrente sanguínea.

Tabela 3. Sumário dos principais achados para os ensaios de atividade biológica com hemoglobina e hemoglobina hidrolisada

	Alteração de viabilidade 4T1			Alteração de viabilidade NIH3T3		
	24 horas	48 horas	72 horas	24 horas	48 horas	72 horas
Hemoglobina	*	*	*	*	*	*
Hemoglobina + Tripsina	*	-19%	-17%	*	*	*
Hemoglobina hidrolisada	-9%	-11%	*	-15%	-17%	-14%
Hemoglobina hidrolisada + Inibidores	*	-20%	*	-12%	-22%	-22%

Foram consideradas as diferenças significativas em relação ao controle independente da concentração de teste.

* Não apresentaram diferenças estatísticas significativas em relação ao controle.

- Diminuição da viabilidade celular.

Tabela 4. Sumário com as principais características dos sistemas desenvolvidos.

	Forma	Tamanho	Polidispersividade	Carga	Estabilidade coloidal	Alteração de viabilidade	
						4T1	NIH3T3
Mimético	Irregular	Micrométrico	Alta	Positiva	Instável	+8%	-17%
Mimético Pep	Irregular	Micrométrico	Alta	Positiva	Rápida coagulação	-14%	-0%
Lipossomo	Discoide	Nanométrico	Média	Positiva	Instável	-14%	#
Lipossomo Pep	Irregular	Nanométrico	Média	Positiva	Rápida coagulação	-51%	#
Quitosana	Regular	Nanométrico	Alta	Negativa	Boa	*	-14%
Quitosana Pep	Regular	Nanométrico	Alta	Negativa	Excelente	-20%	-16%
Quitosana PEG	#	Nanométrico	Média	Negativa	Moderada	-20%	-7%
Quitosana PEG Pep	#	Nanométrico	Médio	Negativa	Excelente	-26%	-19%

Foram consideradas as diferenças significativas em relação ao controle independente da concentração de teste.

Tamanho (diâmetro hidrodinâmico): Micrométrico >1000 nm; Nanométrico < 1000nm.

Polidispersividade: Baixa = 0 a 0,33; Média = 0,34 a 0,66; Alta = 0,66 a 1,0.

Estabilidade coloidal (baseada na carga de superfície): Rápida coagulação = 0 ± 10 ; Instável = ± 10 a ± 30 ; Moderada ± 30 a ± 40 ; Boa = ± 40 a ± 60 ; Excelente = $< \pm 60$. # sem alteração estatística significativa.

* Não apresentaram diferenças estatísticas significativas em relação ao controle.

- Diminuição da viabilidade celular; + Aumento da viabilidade celular.

Condição não avaliada.

7. CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos no presente estudo, pode-se concluir que:

- O hidrolisado trípico de hemoglobina livre reduziu *in vitro* a viabilidade de células de câncer de mama e fibroblastos, sendo que a hemoglobina intacta não acarretou em alteração na viabilidade dessas células.

- Miméticos de hemácias, lipossomos produzidos a partir de fosfolídeos de hemácias, partículas de quitosana e partículas de quitosana-PEG apresentaram características físico-químicas e estruturais distintas.

- Os miméticos de hemácias contendo hidrolisados de hemoglobina (miméticos-Pep) não acarretaram em diminuições expressivas na viabilidade de células de câncer de mama; sendo que os miméticos reduziram a viabilidade apenas de fibroblastos.

- Lipídeos extraídos de membranas de hemácias podem ser utilizados para a formação de lipossomos.

- Lipossomos produzidos a partir de lipídeos de hemácias diminuíram expressivamente a viabilidade de células de câncer de mama quando comparados aos outros sistemas desenvolvidos.

- Hidrolisado de hemoglobina encapsulado em sistemas poliméricos de quitosana e quitosana-PEG foram um pouco mais citotóxicos que os miméticos de hemácias contra células de câncer de mama e fibroblastos.

- O hidrolisado trípico de hemoglobina é capaz de alterar o perfil de proteínas produzidos por células de câncer de mama *in vitro* sem alterar a integridade de membrana e a proliferação celular.

8. PERSPECTIVAS

As hemácias podem fornecer componentes moleculares os quais podem ser utilizados para a formação de dispositivos de transporte, bem como geração de peptídeos bioativos endógenos, para a aplicação terapêutica. Nesse sentido, a continuidade dos estudos nesta linha de pesquisa pode se tornar uma alternativa no desenvolvimento e uso de dispositivos feitos pelos componentes moleculares encontrados endogenamente no organismo alvo para diversas aplicações terapêuticas em uma abordagem que vem sendo denominada no Grupo de Pesquisa em Nanobiotecnologia da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia com a alcunha de autonanoterapia.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, C. H. B. S.; KUPERMAN, H.; DICHTCHEKENIAN, V.; DURVALDAMIANI, D.; MANNA, T. D.; CRISTÓFANI, L. M.; ODOFILHO, V.; SETIAN, N. Growth and puberty after treatment for acute lymphoblastic leukemia. **Revista do Hospital das Clínicas**, São Paulo, v. 59 n. 2, p. 67-70, 2004.

American Cancer Society. The History of Cancer. Disponível em: <<http://www.cancer.org/Cancer/CancerBasics/TheHistoryofCancer/index>>. **Acessado em:** Dezembro de 2012.

American Society for Testing and Materials. Zeta Potential of Colloids in Water and Waste Water ASTM Standard D 4187-4182, 1985.

BECK, W. S. (1991) *Hematology*. **The MIT Press**, 5ed.

BEMQUERER, M. P.; MACEDO, J. K. A.; RIBEIRO, A. C. J.; CARVALHO, A. C.; SILVA, D. O. C.; BRAZ, J. M.; MEDEIROS, K. A.; SALLET, L. A. P.; CAMPOS, P. F.; PRATES, M. V.; SILVA, L. P. Partial characterization of a novel amphibian hemoglobin as a model for graduate student investigation on peptide chemistry, mass spectrometry, and atomic force microscopy. **Biochemistry and Molecular Biology Education**, v. 40, p. 121-129, 2012.

BENATTI, U.; GIOVINE, M.; DAMONTE, G.; GASPARINI, A.; SCARFI, S.; DE FLORA, A.; FRATERNALE, A. ROSSI, L.; MAGNANI, M. Azidothymidine homodinucleotide-loaded erythrocytes as bioreactors for slow delivery of the antiretroviral drug azidothymidine. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 220, p. 20–25, 1996.

BLISHCHENKO, E. Y.; MERNENKOA, O.A.; MIRKINAA, I.I; SATPAEVA, D. K.; IVANOVA, V. S.; TCHIKINA, L.D; OSTROVSKYA, A. G.; KARELINA, A. A.; IVANOVA, V. T. Tumor cell cytolysis mediated by valorphin, an opioid-like fragment of hemoglobin β -chain. **Peptides**, v. 18, n. 1, p. 79-85, 1997.

BLISHCHENKO, E. Y.; KALININA, O. A.; SAZONOVA, O. V.; KHAIDUKOV, S.V.; EGOROVA, N. S.; SUROVOY, A.Y.; PHILIPPOVA, M. M., VASS, A. A., KARELIN, A. A.; IVANOV, V. T. Endogenous fragment of hemoglobin, neokytorphin, as cell growth factor. **Peptides**, v.22, n. 12, p. 1999-20008, 2001.

BLISHCHENKO, E.; SAZONOVA, O.; SUROVOY, A.; KHAIDUKOV, S.; SHEIKINE, Y.; SOKOLOV, D.; FREIDLIN, I.; PHILIPPOVA, M.; VASS, A.; KARELIN, A.; IVANOV, V. Antiproliferative action of valorphin in cell cultures. **Journal of Peptide Science**, v. 8, n. 8, p.438-52, 2002.

BLISHCHENKO, E. Y.; YU, E.; SAZONOVA, O. V.; KALININA, O. A.; MOISEEVA, E. V.; VASS, A. A.; KARELIN, A. A.; IVANOV, V. T. Anti-tumor effect of valorphin *in vitro* and *in vivo*. **Cancer Biology & Therapy**, v. 4, n. 1, p. 118-124, 2005.

BIRD, J.; BEST, R.; LEWIS, D. A. The encapsulation of insulin in erythrocytes. **Journal Pharmacy and Pharmacology**, v. 35, n. 4, p. 246-247, 1983.

BRANTL, V.; GRAMSCH, C.; LOTTSPEICH, F.; MERTZ, R.; JAEGER, K.; HERZ, A. Novel opioid peptides derived from hemoglobin: hemorphins. **European Journal of Pharmacology**, v. 125, p. 309-310, 1986.

CALVO, P. C.; REMUNÁN-LÓ PEZ, J. L.; VILA-JATO, M. J. Novel hydrophilic chitosan-polyethylene oxide nanoparticles as proteincarriers. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 63, p. 125-132, 1997.

CHAWLA, A.; LAZAR, M. A. Peroxisome proliferator and retinoid signaling pathways co-regulate preadipocyte phenotype and survival. **Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.** v. 91, p. 1786-1790, 1994.

CHATTERJEE, S.; BANERJEE, D. Preparation, isolation, and characterization of liposomes containing natural and synthetic lipids. **Methods in Molecular Biology**, v. 199, p. 3-16, 2002.

CHAMBERS, E.; MITRAGOTRI, S. Long circulating nanoparticles via adhesion on red blood cells: mechanism and extended circulation. **Experimental Biology and Medicine**, v. 232, p. 958-966, 2007.

CHAMBERS, E.; MITRAGOTRI, S. Prolonged circulation of large polymeric nanoparticles by non-covalent adsorption on erythrocytes. **Journal Controlled Release**, v. 100, p. 111-119, 2004.

CINTI, C.; TARANTA, M.; NALDI, I.; GRIMALDI, S. Newly engineered magnetic erythrocytes for sustained and targeted delivery of anti-cancer therapeutic compounds. **Plos One**, v. 6 n. 2, p. 1-9, 2011.

COLLETIER, J. P.; CHAIZE, B.; WINTERHALTER, M. e FOURNIER, D. Protein encapsulation in liposomes: efficiency depends on interactions between protein and phospholipid bilayer. **BMC Biotechnology**, v. 2, p. 9, 2002.

COLLINS, T.; ROBBINS, S. L.; COTRAN, R. S.; KUMAR, V. Fundamentos de Robbins - Patologia Estrutural e Funcional. **Nova Guanabara**, 2001, 780 p.

COTTER, S. M. Hematology. **Teton New Media**, 1.ed. 2001.

EDGREN, G.; BAGNARDI, V.; BELLOCCO, RI; HJALGRIM, H.; ROSTGAARD, K.; MELBYE, M.; REILLY, M.; ADAMI, H.; HALL, P.; NYRE'N, O. Pattern of declining hemoglobin concentration before cancer diagnosis Gustaf Edgren. **International Journal of Cancer**, v. 127, 1429-1436, 2010.

FERREIRA, M. A. N. D. Avaliação da angiogênese, inflamação e crescimento tumoral em camundongos com deleção gênica dos receptores para o PAF (PAFR-KO). 164 f. Tese (Ciências Biológicas), **Universidade Federal de Minas Gerais**, Belo Horizonte. 2006.

FRUHWIRTH, G. O.; HERMETTER, A. Mediation of apoptosis by oxidized phospholipids. **Subcell Biochemistry**, v. 49, p. 351-367, 2008.

GANTA, S.; DEVALAPALLY, H.; SHAHIWALA, A.; AMJI, M. A review of stimuli-response nanocarriers for drug and gene delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 126, p. 187-204, 2008.

GE, H.; HU, Y.; JIANG, X.; CHENG, D.; YUAN, Y., BI, H.; YANG, C. Preparation, characterization, and drug release behaviors of drug nimodipine-loaded poly(epsilon-caprolactone)-poly(ethyleneoxide)-poly(epsilon-caprolactone) amphiphilic triblock copolymer micelles. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 91, p. 1463-1473, 2002.

GOTHOSKAR, A.V. Resealed erythrocytes: A review. **Pharmaceutical Technology**, p. 140-148, 2004.

GUPTA, A.; MISHRA, A. K.; BANSAL, P.; KUMAR, S.; GUPTA, V.; SINGH, R.; KALYAN, G. S. Cell based drug delivery system through resealed erythrocyte - A review. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Drug Research**, v. 2, n. 1, p. 23-30, 2010.

HAJDU, S. I. A. Note from history: the discovery of blood cells. **Annals of Clinical & Laboratory Science**, v. 33, n. 2, p. 237-238, 2003.

HAMMER, Ø.; HARPER, D. A. T.; RYAN, P. D. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. **Palaeontologia Electronica**, v. 4, n. 1, p. 9, 2001.

HANAHAN, D.; WEIBERG, R. A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646-674, 2011.

HARTMAN, F. A.; LESSLER, M. A. Erythrocyte Measurements in Fishes, Amphibia and Reptiles. **Biological Bulletin**, v. 126, n. 1, p. 83-88. 1964.

IHLER, G.M.; TSANG, H.C.W. Hypotonic Haemolysis Methods for Entrapment of Agent in Resealed Erythrocytes. **Methods of Enzymology**, v. 149, p. 221-229, 1987.

HU, B.; WANG, S. S.; LI, J.; ZENG, X. X.; HUANG, Q. R. Assembly of bioactive peptide-chitosan nanocomplex. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 115, p. 7515-7523, 2011.

HUGHES, G. A. Nanostructure-mediated drug delivery. **Nanomedicine: NBM**, v.1, p. 22-30.

Instituto Nacional do Câncer. Estimativa - 2012, Incidência de Câncer no Brasil. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2012/index.asp?ID=2>>. **Acessado em:** Dezembro de 2012.

IVANOV, V. T.; YATSKIN, O. N.; KALININA, O. A.; PHILLIPPOVA, M. M.; KARELIN, A. A.; BLISHCHENKO, E. Y. Tissue-specific peptide pools. Generation and function. **Pure and Applied Chemistry**, v. 72, n. 3, p. 355-363, 2000.

IVANOV, V. T.; KARELIN, A. A.; YATSKIN, O. N. Generation of peptides by human erythrocytes: facts and artifacts. **Biopolymers (Peptide Science)**, v. 80, p. 332-346, 2005.

JAIN, R. A. The manufacturing techniques of various drug loaded biodegradable poly (lactide-co-glycolid) (PLGA) devices. **Biomaterials**, v. 21, p. 2475-2490, 2000.

JENEY, V.; BALLA, J.; YACHIE, A.; VARGA, Z.; VERCELLOTTI, G. M.; EATON, J. W.; BALLA, G. Pro-oxidant and cytotoxic effects of circulating heme. **Blood**, v. 100, n. 3, p. 879-887, 2002.

KARDINAL, C. G.; YARBRO, J. W. A conceptual history of cancer. **Seminars in Oncology**, v. 6, n. 4, p. 396-408, 1979.

KARELIN, A. A.; PHILIPPOVA, M. M.; KARELINA, E. V.; IVANOV, V. T. Isolation of endogenous hemorphins-related hemoglobin fragments from bovine brain. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 202, n. 1, 1994.

KARELIN, A. A.; PHILIPPOVA, M. M.; IVANOV, V. T. Proteolytic degradation of hemoglobin erythrocytes leads to biologically active peptides. **Peptides**, v. 16, n. 4, p. 693-697, 1995.

HARTMAN; F. A.; LESSLER; M. A. Erythrocyte Measurements in Fishes, Amphibia and Reptiles. **Biological Bulletin**, v. 126, n. 1, p. 83-88, 1964.

HU, B.; WANG, S. S.; LI, J.; ZENG, X. X.; HUANG, Q. R. Assembly of Bioactive Peptide-Chitosan Nanocomplexes. **Journal Physics Chemistry B**, v. 115, n. 23, p. 7515-7523, 2011

LI, R.; RICHARDS, M. P.; UNDELAND, I. Characterization of aqueous components in chicken breast muscle as inhibitors of hemoglobin-mediated lipid oxidation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n.3, p. 767-775, 2009.

LIEPKE, C.; BAXMANN, S.; HEINE, C.; BREITHAUPT, N.; STANDKER, L.; FORSSMANN, W. Human hemoglobin-derived peptides exhibit antimicrobial activity: a class of host defense peptides. **Journal of Chromatography B**, v. 791, p. 345-356, 2003.

LOTERO, L. A.; OLMOS, G., DIEZ, J. C. Delivery to macrophages and toxic action of etoposide carried in mouse red blood cells. **Biochemistry. Biophysics Acta**, 1620, 160-166 (2003).

MADSEN, L.; PETERSEN, R. K.; SØRENSEN, R. B.; JØRGENSEN, C.; HALLENBORG, P.; PRIDAL, L.; FLECKNER, J.; AMRI, E.; KRIEG, P.; FURSTENBERGER, G.; BERGE, R. K.; KRISTIANSEN, K. Adipocyte differentiation of 3T3-L1 preadipocytes is dependent on lipoxigenase activity during the initial stages of the differentiation process. **Biochemistry Journal**, v. 375, p. 539-549, 2003.

MALAM, Y.; LOIZIDOU, M.; SEIFALIAN, A. M. Liposomes and nanoparticles: nanosized vehicles for drug delivery in cancer. Trends in **Pharmacological Sciences**, v. 30, p. 592-599, 2009.

MEDEIROS, K. A. Desenvolvimento e testes *in vitro* de nanopartículas de quitosana para a liberação controlada de peptídeos antitumorais. 76f. Dissertação (Biologia Animal) - Instituto de Ciências Biológicas, **Universidade de Brasília**, Brasília, 2011.

MISHRA, P.K.; GULBAKE, A.; JAIN, A.; VYAS, S. P.; JAIN, S. K. Targeted delivery of an anti-cancer agent via steroid coupled liposomes. **Drug Delivery**, v. 16, n. 8, p. 437-447, 2009.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, p. 55-63, 1983.

MUZYKANTOV, V. R. Drug delivery by red blood cells: vascular carriers designed by mother nature, **Expert Opinion Drug Delivery**, v. 7, p. 403-427, 2010.

NAM, T. J.; BUSBY, W. H. JR; CLEMMONS, D. R. Human fibroblasts secrete a serine protease that cleaves insulin-like growth factor-binding protein-5. **Endocrinology**, v. 135, n. 4, p. 1385-91, 1994.

NYBERG, F; SANDERSON, K; GLAMSTA, E. The hemorphins: a new class of opioid peptides derived from the blood protein hemoglobin. **Biopolymers.**, v. 43., n. 2, p. 147-156, 1997.

NOVOTNÁ, J.; BACÁKAVÁ, L.; LISA, V.; NOVOTNÁ, T., VÍZEK, H.J. production of proteolytic enzymes in mast cells, fibroblasts, vascular smooth muscle and endothelial cells cultivated under normoxic or hypoxic conditions. **Physiology Research**, v. 59, p. 711-719, 2010.

National Science Foundation (NSF). Nanotechnology definition. Disponível em: <http://www.nsf.gov/crssprgm/nano/reports/omb_nifty50.jsp>. **Acessado em:** Março de 2013.

OGISO, T., IWAKI, M., OHTORI, A. Encapsulation of dexamethasone in rabbit erythrocytes, the disposition in circulation and anti-inflammatory effect. **Journal Pharmacobio-Dynamics**, v.12, n.4, p. 193-200, 1989.

OLSZEWSKI, M. M. Concepts of cancer from antiquity to the nineteenth century, Faculty of Medicine, **University of Toronto**, v. 87, n. 3, p. 181-186, 2010.

PARISH, C. A.; JIANG, H.; TOKIWA, Y.; BEROVA, N.; NAKANISHI, K.; McCABE, D.; ZUCKERMAN, W.; XIA, M. M.; GABAY, J. E. Broad-spectrum antimicrobial activity of hemoglobin. **Bioorganic & Medical Chemistry**, v.9, p. 377-82, 2001.

PEREZ-TAMAYO, R. Mechanisms of disease. Introduction to Pathology, 2. ed., **Year Book Medical Publishers**, Chicago, 1985.

PREGO, C.; FABRE, M.; TORRES, D.; ALONSO, M. J. Efficacy and mechanism of action of chitosan nanocapsules for oral peptide delivery. **Pharmaceutical Research**. v. 23, n. 3, p. 549-556, 2006.

QI, L.; XU, Z. In vivo antitumor activity of chitosan nanoparticles. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 16, p. 4243-4245, 2006.

ROZENBERG, G. Microscopy hematology: a practical guide for the laboratory. **Harwood Academic Publisher**, 1. ed., 1997.

SAH, A. K.; RAMBHADE, A.; RAM, A.; JAIN, S. K. Resealed erythrocytes: a novel carrier for drug targeting. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**, v. 3, n. 2, p. 550-565, 2011.

SCHALLY, A.V.; BABA, Y.; NAIR, R.M.; BENNETT, C.D. The amino acid sequence of a peptide with growth hormone-releasing activity isolated from porcine hypothalamus. **Journal of Biological Chemistry**, v. 246 p. 315-328, 1971.

SEGUIN, J.; BRULLÉ, L.; L, BOYER, R.; LU, Y. M.; RAMOS ROMANO M, TOUIL, Y. S.; SCHERMAN, D.; BESSODES, M.; MIGNET, N.; CHABOT, G. G. Liposomal encapsulation of the natural flavonoid fisetin improves bioavailability and antitumor efficacy. **International Journal Pharmacology**, v. 444, n. 1-2; p. 146-54, 2013.

SHASHANK, S. Novel drug delivery carrier: resealed erythrocytes. **International Journal of Pharma and Bio Sciences**, v. 2, n. 1, p. 394-406, 2011.

SINGH, R.; SINGH, J.W. Nanoparticle-based targeted drug delivery. **Experimental and Molecular Pathology**, v.86, n. 3, p. 215-223, 2009.

SONG, C. Z.; WANG, Q. W.; SONG, C. C. Hemorphin as a prognostic biomarker and potential drug for breast cancer? **International Journal of Cancer**, v. 131, p. 1011-1012, 2012.

TAKAGI, H.; SHIOMI, H.; HAYASHI, K.; KISO, Y.; KITAGAWA K. Isolation of a novel analgesic pentapeptide, neo-kyotorphin, from bovine brain. **Life Sciences**, v. 31, p. 1733-6, 1982.

TIYABOONCHAI, W. Chitosan nanoparticles: a promising system for drug delivery. **Naresuan University Journal**, v. 11, n. 3, p. 51-66, 2003.

TORCHILIN, V. P. Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers. **Nature reviews**, v. 4, p. 145-160, 2005.

TORCHILIN, V. P. Targeted pharmaceutical nanocarriers for cancer therapy and imaging. **Aaps Journal**, v. 9, p. 128-147, 2007.

TORCHILIN, V. P. Intracellular delivery of protein and peptide therapeutics. **Drug Discovery Today: Technologies**, v. 5, p. 95-103, 2008.

YOO, J.; IRVINE, D. J.; DISCHER, D. E.; MITRAGOTRII, S. Bio-inspired, bioengineered and biomimetic drug delivery carriers. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 10, p. 521-535, 2011.

ZHANG, J. D.; XING, X.; SUN, M. Q.; SONG, J. X.; OUYANG, T. X. The effects of chitosan on different-derived fibroblasts. **Zhonghua Zheng Xing Wai Ke Za Zhi**, v. 20, n. 1, p. 53-56, 2004.

ZHANGA, G.; LIUA, T.; WANG, Q.; CHENC, L.; LEI, J.; LUOA, J.; MAA, G.; SUA, Z. Mass spectrometric detection of marker peptides in tryptic digests of gelatin: A new method to differentiate between bovine and porcine gelatin. **Food Hydrocolloids**, v. 23, p. 2001-2007, 2009.

ZHAO, Q. Y.; PIOT, J. M.; GAUTIER, V.; COTTENCEAU, G. Peptic peptide mapping by HPLC, on line with photodiode array detection, of a haemoglobin hydrolysate produced at pilot-plant scale from an ultrafiltration process. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 45 p.778-84, 1996.

10. ANEXOS

10.1 Participação em eventos científicos

- Simpósio Sul Brasileiro Microscopia e Microanálise - SBMM, 2012, Maringá, Paraná. Resumo expandido: Cíntia C. Bonatto; Graziella A. Joanitti; Luciano P. Silva. *In vitro* anticancer activity of hemoglobin-derived peptides loaded on red blood cell mimetics. O trabalho apresentado na forma de painel foi premiado com o 3º lugar no concurso de painéis do Simpósio Sul Brasileiro de Microscopia e Microanálise.
- IV Simpósio em Biologia Animal, 2012, Brasília. Resumo: Cíntia C. Bonatto; Graziella A. Joanitti; Luciano P. Silva. Hemácias como sistema de entrega de ativos antitumorais *in vitro*.
- III Encontro do Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Nanobiotecnologia, 2012, Goiânia, GO. Apresentação: Cíntia C. Bonatto; Graziella A. Joanitti; Luciano P. Silva. Hemácias como sistema de entrega de ativos antitumorais *in vitro*.
- BONATTO, C. C. ; Joanitti, G. A. ; Silva, L. P. Apresentação: Hemácias: um subproduto agropecuário como sistema de liberação sustentada de ativos endógenos *in vitro*. In: XVII Encontro do Talento Estudantil da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia., 2012, Brasília. Anais do XVII Encontro do Talento Estudantil da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia., 2012.

10.2 Publicações

- Bonatto, C. C.; Silva, L. P. Oleic Acid: Dietary Sources, Functions and Health Benefits - Evolutionary Aspects of Oleic Acid Biosynthesis and Incorporation from Unicellular to Multicellular Organisms. 1. ed. United States of America: Nova Science Publishers, 2013. v. 1. 7x10p.