



UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS
FUNDAÇÃO HOSPITALAR DE HEMATOLOGIA E
HEMOTERAPIA DO AMAZONAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS APLICADAS
À HEMATOLOGIA



COMPOSTOS NANOPARTICULADOS: AVALIAÇÃO DO POTENCIAL
ANTILEUCÊMICO E IMUNOMODULADOR

ALICE DE FREITAS GOMES

MANAUS - AM

2023

ALICE DE FREITAS GOMES

**COMPOSTOS NANOPARTICULADOS: AVALIAÇÃO DO POTENCIAL
ANTILEUCÊMICO E IMUNOMODULADOR**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Hematologia da Universidade do Estado do Amazonas, em convênio com a Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas, HEMOAM, para obtenção do grau de *Mestre em Ciências Aplicadas à Hematologia*.

Orientador: Dr. Gemilson Soares Pontes

Coorientador: Dr. Andriy Grafov

MANAUS - AM

2023

FICHA CATALOGRÁFICA

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Sistema Integrado de Bibliotecas da Universidade do Estado do Amazonas.

F866cc Gomes, Alice de Freitas
Compostos Nanoparticulados: avaliação do potencial antileucêmico e imunomodulador / Alice de Freitas Gomes. Manaus : [s.n], 2023.
72 f.: color.; 29 cm.

Dissertação - Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Hematologia - Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, 2023.
Inclui bibliografia
Orientador: Pontes, Gemilson Soares
Coorientador: Grafov, Andriy

1. Leucemia. 2. Imunomodulação. 3. Nanopartículas.
4. Citotoxicidade. I. Pontes, Gemilson Soares (Orient.).
II. Grafov, Andriy (Coorient.). III. Universidade do Estado do Amazonas. IV. Compostos Nanoparticulados: avaliação do potencial antileucêmico e imunomodulador

ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO Nº 01/2023


Ao décimo sexto dia do mês de junho do ano de 2023, às 09h00min, realizou-se remotamente, via plataforma Google Meet, a Defesa de Dissertação da discente **Alice de Freitas Gomes**, sob o título: “**Compostos nanoparticulados: avaliação do potencial antileucêmico e imunomodulador**”, tendo como orientador o Prof. Dr. **Gemilson Soares Pontes** e coorientador o Prof. Dr. **Andriy Grafov**, segundo encaminhamento da Profa. Dra. Andréa Monteiro Tarragô, Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Hematologia e de acordo com os registros constantes na Secretaria Geral da Universidade do Estado do Amazonas, a Banca julgadora foi composta pelos seguintes componentes, que deram o parecer final sobre a Defesa, tendo sido atribuído a discente o conceito discriminado no parecer da referida Comissão.

Membros	Parecer	Assinatura
Prof. Dr. Gemilson Soares Pontes – Presidente (INPA)	Aprovado(a) (X) Reprovado(a) ()	Documento assinado digitalmente Assinatura: GEMILSON SOARES PONTES Data: 19/06/2023 13:03:07-0300 Verifique em https://validar.iti.gov.br CPF: 678.128.132-15
Prof. Dr. Luís André Morais Mariúba – Membro (FIOCRUZ / AM)	Aprovado(a) (X) Reprovado(a) ()	Documento assinado digitalmente Assinatura: LUIS ANDRE MORAIS MARIUBA Data: 16/06/2023 15:37:47-0300 Verifique em https://validar.iti.gov.br CPF: 778.520.552-04
Profa. Dra. Jerusa Araújo Quintão – Membro (UFAM)	Aprovado(a) (X) Reprovado(a) ()	Documento assinado digitalmente Assinatura: JERUSA ARAUJO QUINTAO ARANTES FARI Data: 16/06/2023 12:54:49-0300 Verifique em https://validar.iti.gov.br CPF: 068.567.686-21

O parecer final da Defesa de Dissertação foi:

(X) Aprovado

() Não Aprovado

Documento assinado digitalmente
 GEMILSON SOARES PONTES
Data: 19/06/2023 13:07:20-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Presidente da Banca Examinadora

DEDICATÓRIA

É com grande satisfação que dedico este estudo à minha amada família, que sempre esteve presente em minha vida, me apoiando, amando e acreditando em mim. Vocês são a minha base, meu porto seguro, e a razão pela qual eu sou quem sou hoje. Cada um de vocês é um tesouro em minha vida, um exemplo de amor, de força e de resiliência.

À minha mãe, Maria de Freitas Gomes, ao meu pai, Gilmar de Castro Gomes, às minhas irmãs, Nayara de Freitas Gomes e Gilmara de Freitas Gomes, ao meu irmão, Jonatan de Freitas Gomes.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de expressar minha gratidão a Deus e ao universo por ter me ajudado a manter meus pensamentos e intenções retos e justos, além de me dar força, sabedoria e discernimento necessários para permanecer firme e focada durante todo o processo de conclusão do meu mestrado. Sou grata por aceitar com tranquilidade tudo o que ocorreu, compreendendo que faz parte do mesmo princípio que nos originou e visando sempre o bem comum.

A minha profunda gratidão à minha querida família, especialmente à minha mãe, Maria Gomes, por todo o amor, paciência, alegria, perseverança, autossuficiência e serenidade que ela tem demonstrado ao longo dos anos. Agradeço também ao meu pai, Gilmar Gomes, por me ter ensinado a importância de cuidar do meu caráter e por sua disposição em perdoar aqueles que nos ofendem e incomodam. Agradeço ainda à minha irmã Nayara Gomes por seu cuidado e defesa, por me ensinar a ter sobriedade em tudo e firmeza em demonstrar zelo para com a família e amigos, sem demonstrar desgosto ou paixão em excesso. À minha irmã Gilmar Gomes, agradeço por sua atenção e cuidado, por ser uma fonte de inspiração e honra, e por seu bom humor. Por fim, mas não menos importante, agradeço ao meu irmão Jonatan Gomes por sua bondade e compreensão, e por todos os momentos que passamos juntos.

Agradeço ao meu cunhado, Diego Rodrigues, por ter escolhido fazer parte da minha família e por estar sempre presente. Agradeço pelas conversas e apoio, por nos alegrar e por ser um homem talentoso e inteligente, um excelente pai e marido.

A minha sincera gratidão à minha melhor amiga, Drielle Fonseca, que tem estado ao meu lado desde a graduação. Agradeço profundamente por me incentivar constantemente, pelas longas horas de conversa que compartilhamos, pela confiança e crença em mim, e por me inspirar a ser uma pessoa melhor.

A minha gratidão ao meu querido orientador, Gemilson Pontes. Agradeço imensamente por sua paciência, compreensão, ensinamentos e orientações que contribuíram significativamente para o meu crescimento profissional e amadurecimento nas relações interpessoais.

A minha gratidão ao meu coorientador, Andriy Grafov, pelo financiamento e fornecimento dos compostos nanoparticulados utilizados neste projeto. Sua contribuição foi fundamental para o sucesso deste trabalho. Além disso, agradeço ao projeto H2020-MSCA-

RISE-2016-734759-VAHVISTUS pelo financiamento generoso. Sem o apoio de ambos, este projeto não seria possível.

Agradeço imensamente aos meus queridos amigos de pesquisa do Laboratório de Virologia e Imunologia - INPA: Anderson, Eduardo, Leonardo, Paulo, Renata, Emmily, Josiane, Larissa e Luma. Em particular, gostaria de agradecer ao Eduardo Alves, Leonardo Calheiros, Anderson Barbosa e Paulo Souza pelas longas horas de experimentos que passamos juntos, bem como pelo apoio, conversas e momentos de desabafo e distrações. Vocês me ajudaram a manter o bom humor e a calma, especialmente em momentos de tensão, tornando tudo muito mais suportável e leve. Novamente, meu sincero agradecimento a todos vocês.

A minha gratidão a todos os meus amigos do mestrado, especialmente à maravilhosa Daniele de Sá. Sua companhia e ajuda nas disciplinas foram inestimáveis, e eu me considero afortunada por tê-la como amiga. Sem dúvida, ela é uma profissional brilhante e uma amiga excepcional.

A minha sincera gratidão à Universidade de Helsinki da Finlândia e à Universidade de Mohamed Ben Abdellah de Marrocos pela síntese e disponibilização dos compostos e materiais vitais para a realização deste estudo. Sem a sua colaboração, esse trabalho não seria possível. Obrigado.

Agradeço à Universidade Estadual do Amazonas (UEA), à Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (HEMOAM) e à Universidade do Estado do Amazonas pela excelência e qualidade de ensino, além de serem instituições de referência no aperfeiçoamento de profissionais competentes.

Agradeço imensamente a todos da coordenação do Mestrado em Ciências Aplicadas à Hematologia (PPGH) pela sua incansável dedicação e disponibilidade em aprimorar constantemente o programa, tornando-o cada vez mais excelente. O seu comprometimento é fundamental para o sucesso dos estudantes e o desenvolvimento da área da hematologia. Muito obrigado!

Agradeço muito ao corpo docente do Programa em Ciências Aplicadas à Hematologia (PPGH) por toda dedicação e pelos ensinamentos que contribuíram significativamente para a minha formação acadêmica e profissional.

Agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM) pela concessão da bolsa de estudos, que possibilitou a realização deste importante projeto e contribuiu significativamente para o meu desenvolvimento acadêmico e profissional.

Agradeço a todos os membros do prédio de Microbiologia Médica do INPA por me receberem com carinho desde o início da minha jornada científica.

Por fim, a minha mais profunda gratidão e amor a todos que contribuíram para a realização deste projeto de mestrado. Cada um de vocês desempenhou um papel fundamental e me apoiou em cada etapa. Muito obrigada de coração!

EPIGRAFE

"O sábio é aquele que consegue transformar cada evento em uma oportunidade de aprendizado."

(Sêneca)

RESUMO

A leucemia representa um grupo de neoplasias hematológicas que têm origem nas células-tronco, causando a proliferação e acúmulo de leucócitos na medula óssea e no sangue. Em 2018, a leucemia foi mundialmente classificada como o 15º câncer mais frequente e a 11ª principal causa de mortalidade. As nanopartículas como carreadores de medicamentos oferecem vantagens, como a capacidade de se direcionar especificamente às células cancerosas, reduzir a toxicidade do tratamento e aumentar a eficácia do medicamento. O objetivo deste estudo foi avaliar a atividade anticancerígena e imunomoduladora de nanopartículas de bismuto e a nanopartícula contendo crajiru (nanopartícula-CRJ) em linhagens celulares de leucemia mieloide. Todos os testes foram realizados *in vitro*, utilizando as linhagens cancerígenas HL60 (leucemia mieloide aguda) e K562 (leucemia mieloide crônica), e as células não cancerígenas da linhagem Vero e células monocleares do sangue periférico (PBMC) de doadores de sangue. A atividade citotóxica das nanopartículas foi avaliada por meio do teste MTT, enquanto que a capacidade de inibir a expansão clonal de células cancerígenas foi investigada por meio do ensaio de formação de colônias. Para avaliar o potencial imunomodulador, citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias foram dosadas por meio de um ensaio imunoenzimático (ELISA), em sobrenadante de PBMC tratadas com as nanopartículas. Os resultados demonstraram que tanto a nanopartícula-CRJ quanto a de Bismuto apresentaram atividade citotóxica significativa contra as linhagens cancerígenas HL60 ($p < 0.05$) e K562 ($p \leq 0.05$) em todas as concentrações testadas quando comparado ao controle (células não tratadas). Não foi observada atividade citotóxica significativa da nanopartícula-CRJ em células não cancerígenas. A nanopartícula de bismuto apresentou atividade citotóxica em células não-cancerígenas, reduzindo a viabilidade das células em uma média de 27%, porém menor do que em relação às células cancerígenas que reduziram em uma média de 43%. A nanopartícula de bismuto reduziu a formação de colônias de células HL60 em 79%, enquanto que a nanopartícula-CRJ reduziu em 93,95%. Em relação às células K562, a nanopartícula-CRJ inibiu totalmente a formação de colônias. A nanopartícula-CRJ induziu a expressão das citocinas IL-6, IL-10, IL-12 e TNF- α , o que demonstra seu potencial imunomodulador. Os resultados deste estudo indicam que a nanopartícula de bismuto apresenta um potencial anticancerígeno, enquanto a nanopartícula-CRJ possui potencial antitumorígeno e imunomodulador. Estes dados sugerem que esses compostos são candidatos promissores para estudos prospectivos no tratamento de leucemia mieloide.

Palavras-chave: Leucemia, Imunomodulação, Nanopartículas, Citotoxicidade.

ABSTRACT

Leukemia represents a group of hematologic malignancies that originate from stem cells, causing the proliferation and accumulation of leukocytes in the bone marrow and blood. In 2018, leukemia was ranked the 15th most common cancer worldwide and the 11th leading cause of death. Nanoparticles as drug carriers offer advantages such as the ability to specifically target cancer cells, reduce treatment toxicity, and increase drug efficacy. The aim of this study was to evaluate the anticancer and immunomodulatory activity of bismuth nanoparticles and the nanoparticle containing cajiru (nanoparticle-CRJ) in myeloid leukemia cell lines. All tests were performed in vitro, using the HL60 (acute myeloid leukemia) and K562 (chronic myeloid leukemia) cancer cell lines, and non-cancer Vero cell lines and peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from blood donors. The cytotoxic activity of the nanoparticles was evaluated using the MTT test, while the ability to inhibit the clonal expansion of cancer cells was investigated using the colony formation assay. To evaluate the immunomodulatory potential, pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines were measured by means of an immunoenzymatic assay (ELISA) in supernatant of PBMC treated with nanoparticles. The results showed that both the CRJ and Bismuth nanoparticle showed significant cytotoxic activity against the cancer cell lines HL60 ($p < 0.05$) and K562 ($p < 0.05$) at all tested concentrations when compared to the control (untreated cells). No significant cytotoxic activity of the nanoparticle-CRJ was observed in non-cancer cells. The bismuth nanoparticle showed cytotoxic activity in non-cancer cells, reducing cell viability by an average of 27%, but less than that of cancer cells which reduced by an average of 43%. The bismuth nanoparticle reduced the formation of HL60 cell colonies by 79%, while the CRJ-nanoparticle reduced it by 93.95%. Regarding K562 cells, the nanoparticle-CRJ totally inhibited the formation of colonies. The nanoparticle-CRJ induced the expression of cytokines IL-6, IL-10, IL-12 and TNF- α , which demonstrates its immunomodulatory potential. The results of this study indicate that the bismuth nanoparticle has an anticancer potential, while the CRJ-nanoparticle has an anticancer and immunomodulatory potential. These data suggest that these compounds are promising candidates for prospective studies in the treatment of myeloid leukemia.

Keywords: Leukemia, Immunomodulation, Nanoparticles, Cytotoxicity.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Sangue normal e sangue leucêmico durante a leucemia. 11
- Figura 2.** Mapa coroplético do Brasil demonstrando os óbitos por 100.000 habitantes associados à leucemia no ano de 2016. 16
- Figura 3.** Diagrama esquemático representativo das fases da hematopoese. 17
- Figura 4.** Mecanismos de múltipla resistência aos medicamentos. 21
- Figura 5:** Representação esquemática de nanocápsulas e nanoesferas poliméricas: a) fármaco dissolvido no núcleo oleoso das nanocápsulas; b) fármaco adsorvido a parede polimérica das nanocápsulas; c) fármaco retido na matriz polimérica das nanoesferas; d) fármaco adsorvido ou disperso moleculamente na matriz polimérica das nanoesferas. 23
- Figura 6.** Mecanismo de direcionamento Ativo e Passivo das NPs. 25
- Figura 7.** Comparação da imagem de fluorescência (F), imagem diferencial (D) e sobreposição da imagem da diferença de fluorescência (F – D) em células L1210 para captação de PLGA – MPEG NP. Imagens 1, 2 e 3 foram tomadas a 62,3µm e 4, 5 e 6 a 48,2µm da superfície..... 29
- Figura 8:** Linha do tempo representando exemplos de nanopartículas que foram aprovadas pela Food and Drug Administration (FDA). 30
- Figura 12: Efeito da nanopartícula contendo crajiru na formação de colônias de células leucêmicas HL60 e K562.** Quantificação de colônias formadas por células HL60 após o tratamento com a nanopartícula-CRJ, em suas respectivas concentrações 25µg/mL e 50µg/mL (A) e (C). Imagem de microscopia óptica representativa retrata a formação da colônia para células HL60 e K562 (B) e (D). A significância estatística foi representada por asteriscos; ****p<0,0001..... 43
- Figura 13: Atividade imunomoduladora da nanopartícula contendo o Crajiru(nano+CRJ).** Os níveis das citocinas IL2, IL4, IL6, IL8, IL10, IL12, IFNγ e TNFα foram

dosados do sobrenadante de PBMCs humanas tratadas com a concentração de 12µg/mL do a nanopartícula-CRJ por ELISA. A análise estatística realizada através do ANOVA. **: indica diferença significativa em comparação ao grupo controle, sendo: $p < 0.005$, *** $p < 0,0005$, *** $p < 0.0002$ e ** $p < 0,001$ 44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Classificação FAB (franco-americano-britânico) das LMA..... 13

Tabela 2. Classificação da Leucemia Mieloide Aguda e das Neoplasias de Células Precursoras Relacionadas segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) 2016. 13

LISTA DE ABREVIATURAS

Leucemia mieloide aguda leucemia mieloide aguda (LMA),
Leucemia mieloide crônica (LMC),
Leucemia linfóide aguda (LLA)
Leucemia linfóide crônica (LMC)
Instituto Nacional de Câncer (INCA)
Registros de Câncer de Base Populacional (RCBP)
Resistência a múltiplas drogas (MDR)
Células leucêmicas promielocíticas humanas (LPA)
Metil-bis- (β -cloroetil)
Food and Drug Administration (FDA)
Leucemia linfocítica murina (L1210)
Cromossomo Filadélfia (PH)
Classificação franco-americano-britânico (FAB)
Organização Mundial de Saúde (OMS).
Gene Abelson murine leucemia (ABL)
Gene reaquecimento cluster region (BCR)
Transplante de células-tronco hematopoiéticas (TCTH)
Enxerto-contrá-hospedeiro (GVHD)
Antígeno leucocitário humano (HLA)
Leucemia linfóide aguda de células T (LLA-T)
Glicoproteína P (PGP)
Resistência a múltiplas drogas 1 (MDR1)
Nanopartículas (NPs)
Espécies reativas de oxigênio (EROS)
Carcinoma hepatocelular (HepG2)
Células cancerígenas do epitélio alveolares humanas (A549)
Nanopartícula de bismuto (BI-MES)
Mercaptoetano sulfonato de sódio (MESNa)
Células mononucleares de sangue periférico (PBMC)
Ensaio de Metiltiazoletrazolium (MTT)
Interleucina-4 (IL4)
Interferon- (IFN)
Fator de necrose tumoral alfa (TNF α)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	7
2. REFERENCIAL TEÓRICO.....	9
2.1 Histórico do tratamento contra leucemia	9
2.2 LEUCEMIAS.....	11
2.2.1 Tipos de leucemias	11
2.2.2 Epidemiologia	14
2.2.3 Patogênese.....	16
2.2.4 Diagnóstico	18
2.2.5 Tratamentos convencionais para leucemia.....	19
2.3 RESISTÊNCIA À QUIMIOTERAPIA	20
2.4 NANOTECNOLOGIA	22
2.4.1 Classificação das Nanopartículas	23
2.4.2 Mecanismo de ação das nanopartículas	24
2.4.2 Mecanismo de direcionamento das nanopartículas.....	24
2.4.3 Nanopartículas e sustentação da liberação prolongada de medicamentos antileucêmicos.....	26
2.4.4 Bismuto	26
2.4.5 Crajiru	27
2.4.6 Entrega intracelular pelas nanopartículas.....	28
2.4.7 Nanopartículas e aplicação clínica em pacientes leucêmicos	29
3 OBJETIVOS.....	32
4.1 Objetivo geral	32
4.2 Objetivos específicos	32
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	33
4.1 Aspectos éticos	33
4.2 Obtenção da nanopartícula de bismuto	33
4.3 Obtenção da nanocápsula carregadas com Crajiru	33
4.4 Preparação de nanocápsula carregadas com Crajiru.....	33
4.5 Preparação de nanopartícula de bismuto.....	34
4.6 Cultura de células.....	34
4.7 Isolamento e preparação de células mononucleares de sangue periférico humano (PBMC).....	35
4.8 Avaliação da viabilidade celular	35
4.9 Ensaio de formação de colônias.....	36

4.10	Análise de dosagem de citocinas	36
4.11	Análise de dados	37
5	RESULTADOS	38
5.1	Atividade citotóxica das nanopartículas de bismuto.....	38
5.2	Análise de formação de colônias das nanopartículas de bismuto	39
5.3	Atividade citotóxica das nanopartículas contendo cajuru	41
5.4	Análise de formação de colônias nanopartículas contendo cajuru	42
5.5	Atividade imunomoduladora da nanopartículas contendo cajuru	43
6	DISCUSSÃO	45
7	LIMITAÇÕES e PERSPECTIVAS FUTURAS	49
8	CONCLUSÕES	50
9	REFERÊNCIAS	51

1 INTRODUÇÃO

As leucemias são grupos de neoplasias malignas que têm origem nas células-tronco hematopoiéticas, causando a proliferação e acúmulo de leucócitos na medula óssea e no sangue (1). Dependendo da linhagem celular afetada, a leucemia pode ser subdividida em linfóide ou mieloide podendo ainda ser caracterizada como aguda ou crônica. Fatores como evolução da doença, resposta ao tratamento e manifestações clínicas, também servem de base para a diferenciação dos subtipos de leucemia (2, 3). As leucemias crônicas são caracterizadas por apresentar maior percentual de células maduras, enquanto que nas leucemias agudas este aumento é observado em células imaturas. Desta forma, as leucemias são classificadas em: leucemia mieloide aguda (LMA), leucemia mieloide crônica (LMC), leucemia linfóide aguda (LLA) e leucemia linfóide crônica (LMC) (4, 2, 5).

Segundo Bray, em 2018 ocorreram 249 mil novos casos de leucemia em todo o mundo. Ainda no contexto mundial, as leucemias representam o 11^a câncer mais incidente, sendo a LLA o câncer mais frequente durante a infância com casos ocorrendo em 75% das vezes abaixo dos 6 anos (6). As maiores taxas de incidência pertencem ao sexo masculino. A leucemia a LMA tem maior incidência em adultos, especialmente a partir dos 65 anos (4).

No Brasil, de acordo com o Instituto Nacional de Câncer (INCA), para cada ano do triênio 2021-2023, são estimados 11.540 casos novos de leucemia, sendo 6.250 em homens e 5.290 em mulheres. Essa estimativa equivale a um risco estimado de 5,90 casos novos/100 mil homens e 4,78 casos novos/100 mil mulheres, ocupando a nona e a décima posição, respectivamente, entre as neoplasias malignas mais incidentes. A leucemia em homens da região Norte é o quinto câncer mais comum com estimativa de 4,45/100 mil, não levando em consideração o câncer de pele não melanoma (7).

Em 2019, ainda na região Norte, ocorreram 7.370 óbitos, sendo 4.014 homens e 3.356 mulheres (7). No ano de 2008, a cidade de Manaus apresentou um dos maiores índices de ocorrência de LLA do país, de acordo com os Registros de Câncer de Base Populacional (RCBP). Em 2011, foi identificada novamente como a capital brasileira com maior incidência, apresentando 76,8 casos por milhão de habitantes (8) e em 2016 houve um aumento para 87,1 casos (9).

O tratamento para a leucemia inclui quimioterapia, radioterapia e transplante de medula óssea, que podem causar diversos efeitos colaterais prolongados, como toxicidade (10).

Portanto, a quimioterapia apresenta uma série de efeitos colaterais indesejados, como náuseas, diarreia, imunossupressão, neuropatia e fadiga, devido à sua citotoxicidade tanto para as células neoplásicas quanto para as células saudáveis (10).

Atualmente a busca por agentes quimioterápicos mais eficientes e menos invasivos é um desafio para a ciência (11). A terapia direcionada às células neoplásicas representa uma abordagem promissora para um tratamento mais eficaz e menos tóxico para os pacientes (11, 12). No entanto, a resistência à quimioterapia é um grande obstáculo para o sucesso total do tratamento e a cura da leucemia (11, 12).

A resistência a múltiplas drogas (MDR) é frequentemente um dos principais obstáculos para o sucesso do tratamento quimioterápico e recidiva em neoplasias hematológicas. Existem vários mecanismos que ajudam as células neoplásicas a desenvolver resistência contra os efeitos citotóxicos dos medicamentos quimioterápicos, sendo uma das principais é a via de regulação negativa responsável pela produção de proteínas que inibem a apoptose, como Bcl-2 e Bax, além da excreção de fármacos por meio da via de glicoproteína-P (11, 12).

A nanotecnologia oferece novas vantagens no diagnóstico, prevenção e tratamento do câncer, nas quais as tecnologias convencionais não conseguiram alcançar (14). A nanotecnologia é uma estratégia terapêutica promissora para a entrega direcionada de compostos ativos às células cancerígenas, pluripotentes ou ao microambiente tumoral/estroma, proporcionando alta especificidade e seletividade. Isso reduz a toxicidade e melhora a eficácia dos fármacos, tornando-a uma alternativa para superar a MDR (15). As nanopartículas têm um grande potencial como carreadores de medicamentos, ajudando a manter a sua estabilidade e biodisponibilidade, protegendo-os contra a degradação no organismo, melhorando a absorção pelas células alvo e modificando a farmacocinética. Dessa forma, os medicamentos quimioterápicos carregados por nanopartículas podem resistir à degradação, exibir menor toxicidade e apresentar maior solubilidade e eficácia (16).

Os compostos de bismuto possuem diversas aplicações medicinais (17), Por exemplo, em relação a atividade antitumoral do bismuto, são exemplos os compostos de tropolonas e ditiocarbamatos de bismuto (III), que apresentam efeito citotóxico descrito contra células leucemia L1210 e células leucêmicas promielocíticas humanas (LPA)(18). A espécie vegetal *Fridericia chica* ou *Arrabidaea chica* é conhecida popularmente como cajuru, pertence a família *Bignoniaceae* e é amplamente distribuída em regiões tropicais do Brasil, especialmente no estado do Amazonas (19). Diversos estudos apontam a eficiência dos extratos das folhas de

crajiru com atividades antitumorais, antivirais, cicatrizantes, anti-inflamatórias e antioxidantes (20, 21).

Considerando o atual contexto da resistência à quimioterapia e seus efeitos colaterais em pacientes leucêmicos, é de extrema importância a realização de estudos que avaliem a atividade antineoplásica e imunomoduladora de compostos nanoparticulados. Esses estudos podem contribuir significativamente para o surgimento de novos medicamentos que superem esses obstáculos e melhorem o tratamento desses pacientes. Nesse sentido, o presente estudo teve como principal objetivo avaliar a atividade antiproliferativa e imunomoduladora *in vitro* da nanopartícula de bismuto e da contendo crajiru.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 HISTÓRICO DO TRATAMENTO CONTRA LEUCEMIA

A descoberta da leucemia envolve quatro principais pesquisadores: Peter Cullen, John Bennett, Rudolf Virchow, John Bennett e Henry Fuller, denominados como os descobridores da leucemia. Não há um consenso a respeito sobre quem as relatou pela primeira vez (22). No século XIX, foram analisados e publicados os primeiros casos a respeito de possíveis transformações nas células sanguíneas (23).

Em 1811, Peter Cullen publicou um caso sobre esplenite aguda no qual foi observado o soro do paciente sendo semelhante a cor e consistência de leite por causa do acúmulo de leucócitos (24). Em 1845, John Bennett, o fundador da microscopia clínica francesa, foi o primeiro a nomear a doença como leucocitemia. Tendo como base as suas observações sobre leucócitos purulentos (18, 19). Em 1847, Rudolf Virchow definiu a doença como *leukämie* do grego *leukos* = branco e *haima* = sangue (“sangue branco”). Ele observou a diminuição da quantidade de eritrócitos e aumento desproporcional de leucócitos. Em 1846, Henry Fuller foi o primeiro a diagnosticar a leucemia utilizando um microscópio (18, 19).

Durante o século XIX, o tratamento da leucemia consistia no uso de compostos como quinino para febre, morfina e ópio para diarreia e dores, e ferro para anemia, os quais amenizavam os sintomas da doença (22). O uso de arsênico na leucemia foi um dos tratamentos mais relatados, aplicado pela primeira vez em uma mulher com leucemia mieloide crônica sob supervisão do médico Lissauer. Embora o arsênico causasse a diminuição significativa de leucócitos, o efeito era em um curto prazo (22).

O advento da quimioterapia para o tratamento da leucemia ocorreu durante a década de 1950. Na primeira e segunda guerra mundial, o gás de mostarda foi utilizado como uma arma química (27). Pesquisadores do exército dos Estados Unidos estudavam diversos derivados do gás de mostarda, quando observaram efeitos do gás de mostarda nitrogenado nos tecidos linfoides e em neoplasias malignas (27). Posteriormente, realizaram estudo de fase clínica na Universidade de Yale, observaram que metil-bis- (β -cloroetil) amina apresentava atividade antiproliferativa para o linfoma de Hodgkin(27). O gás de mostarda nitrogenada teve a molécula de enxofre substituída pela de nitrogênio e o metotrexato, o que induz a apoptose na fase S do ciclo celular, causando a diminuição significativa de leucócitos tumorais (27). A quimioterapia e a radioterapia se tornaram as principais técnicas terapêuticas para o câncer. Somente, com os avanços do conhecimento em imunologia que passou a ser realizado os transplantes de órgãos, como o de medula óssea (28).

Em 1959, Richard Feynman, ganhador do prêmio Nobel de Física, foi o primeiro abordar o conceito de nanotecnologia na Reunião Anual da American Physical Society em uma palestra com nome “Há muito espaço no fundo”(29). Em 1960, Bangham descobriu nanopartículas a base de lipossomas (30). Em 1972, Scheffel produziu nanopartículas a base de albumina (31), posteriormente esta serviu como base para a produção do nanofármaco Abraxane (paclitaxel ligado à albumina), que foi aprovado em 2005 pela Food and Drug Administration (FDA) dos Estados Unidos para ser utilizado no câncer de mama (32).

Em 1990, Schwendener foi o primeiro a usar nanopartículas de lipossomal anexado a quimioterápicos, o qual encapsula o mitoxantrona em lipossomas. Foi observado que o fármaco encapsulado foi mais eficaz contra células de leucemia linfocítica murina (L1210) do que somente o mitoxantrona livre (33). Em 2000, a primeira nanopartículas (Mylotarg) para uso clínico das leucemias foi aprovada (34) e em 2006 Oncospar para leucemia linfóide aguda infantil (35). Em 2012, foi aprovada o Marqibo, uma alternativa bastante importante para pacientes adultos com leucemia linfóide aguda (36), e em 2017 a VYXEOS sendo a primeira nanopartículas a ter a combinação de dois medicamentos quimioterápicos, a citarabina e daunorrubicina (37).

2.2 LEUCEMIAS

A leucemia é um grupo heterogêneo de neoplasias líquidas originadas de um clone maligno das células-tronco hematopoiéticas que resulta na proliferação exacerbada e acúmulo de leucócitos na medula óssea e no sangue (figura 1) (3, 4). Desse modo, as células leucêmicas inibem a multiplicação de células sanguíneas saudáveis que, progressivamente, são substituídas por células leucêmicas, o que ocasiona anemia, aumento de suscetibilidade à infecções e plaquetopenia (3, 4).

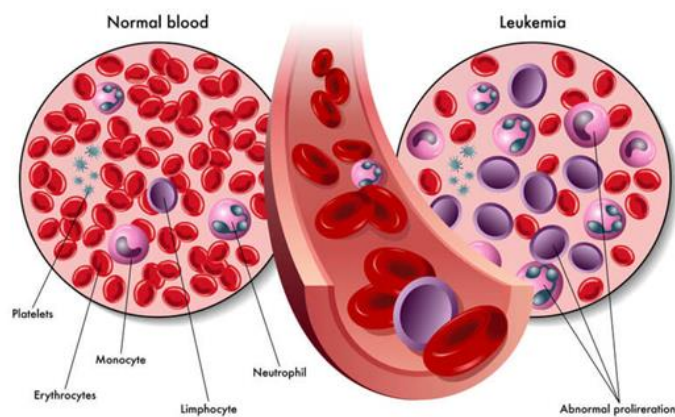


Figura 1. Sangue normal e sangue leucêmico durante a leucemia.

Fonte: <http://hematologiaclinicafarma.blogspot.com/>

A etiologia da leucemia é multifatorial e existem diversos fatores relacionados ao seu desenvolvimento, como: radiação ionizante, exposição a agrotóxicos, pesticidas, inseticidas, infecções virais (38). As alterações genéticas adquiridas nas células hematopoiéticas e as aberrações cromossômicas clonais contribuem de forma significativa para o desenvolvimento da leucemia (39). Estas anormalidades favorecem o surgimento de distúrbios no processo de reparo do DNA. As alterações cromossômicas hereditárias responsáveis por causar doenças como Anemia de Fanconi e síndrome de Down também podem ser fatores de predisposição à leucemia (38).

2.2.1 Tipos de leucemias

Existem diversos tipos de leucemias, que são classificadas de acordo com a linhagem celular (mieloide ou linfóide), com tempo de evolução (aguda ou crônica) e com tipo de célula acometida (frequentemente leucócitos e raramente megacariócitos e eritrócitos) (4). Desta

forma, os principais tipos de leucemia são: leucemia mieloide aguda (LMA), leucemia mieloide crônica (LMC), leucemia linfóide aguda (LLA) e leucemia linfóide crônica (LLC) (2, 5).

A leucemia aguda evolui rapidamente e as mutações induzem a proliferação anormal das células imaturas (blastos), diminuição e interrupção do processo de diferenciação dos leucócitos (4). Sendo assim, umas das características mais marcantes das leucemias agudas é a presença exagerada de blastos que, por sua vez, são incapazes de exercer as suas funções normais, gerando insuficiência da medula óssea, anemias, suscetibilidade à infecções e sangramentos (40). A leucemia crônica evolui progressivamente, caracterizada pela diminuição da apoptose e o acúmulo de células maduras ou em processo de diferenciação na medula óssea e no sangue. Os pacientes com leucemia crônica costumam apresentar leucocitose acentuada e infiltração tecidual (3).

A LMC foi o primeiro tipo de câncer relacionado a uma alteração cromossômica, a clássica translocação do cromossomo 9 e 22, denominado Cromossomo Filadélfia (PH) (40). A LMC acomete pessoas de todas as faixas etárias, especialmente entre 50 e 60 anos de idade, que são diagnosticadas em uma das três fases: crônica, acelerada e blástica (40). Na fase blástica ou crise blástica ocorre o aumento significativo de células imaturas da linhagem mieloide, linfóide ou blastos indistinguíveis (40). Em cerca de 70% dos casos de crise blástica, a transformação maligna se desenvolve nas células mielóides, pelo menos duas vezes a mais frequentes que nas células linfóides (25).

A LMA é a neoplasia mais comum em adultos, correspondendo ao tipo que acomete de forma grave pessoas entre 30 e 40 anos de idade, sua frequência está associada ao aumento da idade, ainda que seja capaz de ser desenvolvida em qualquer faixa etária (26, 27). As translocações cromossômicas são as principais anormalidades relacionadas à doença, embora também ocorram mutações nos genes dos processos de proliferação e diferenciação das células hematopoiéticas. A LMA é considerada heterogênea, sua classificação depende de qual tipo de célula progenitora é afetada (42).

Existem dois sistemas que classificam os tipos de LMA, o sistema de classificação franco-americano-britânico (FAB) e o da Organização Mundial de Saúde (OMS). A FAB foi definida em 1976 com o intuito de diferenciar os oito subtipos (M0 a M7) da LMA, usando como critérios os aspectos morfológicos e citoquímicos das células leucêmicas (tabela 1) (43).

Tabela 1. Classificação FAB (franco-americano-britânico) das LMA.

Subtipos	Principais características de cada subtipo de LMA.
LMA M0	Blastos minimamente diferenciados.
LMA M1	Sem maturação de blastos.
LMA M2	Promielócitos de 3 a 20% maduros, frequentemente com bastão de Auer. Subtipo M2Baso.
LMA M3	Promielocítica > 30% de promielócitos, bastões de Auer e células de Faggot.
LMA M4	Mielomonocítica Fração de promonócitos e monócitos > 20%. Subtipo M4Eo.
LMA M5	Monocítica/monoblástica ≥ 80% das células não eritroides são da linhagem monocítica Subtipo M5a.
LMA M6	Eritroleucemia ≥ 50% de todas as células nucleadas são eritroides e ≥ 30% das células não eritróides são blastos.
LMA M7	Megacarioblástica com população de blastos heterogênea, megacariócitos anormais.

A classificação da OMS acrescenta as alterações citogenéticas mais as manifestações clínicas, imunofenotipagem e morfologia para a distinção de seis tipos da doença, sendo eles: (i) correlacionada à terapia; (ii) com anormalidades genéticas recorrentes; (iii) com particularidades referente à mielodisplasia; (iv) não especificada de outra forma; (v) sarcoma mieloide; e (vi) proliferação mieloide associada à síndrome de Down (tabela 2) (2).

Tabela 2. Classificação da Leucemia Mieloide Aguda e das Neoplasias de Células Precursoras Relacionadas segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) 2016.

LMA com anormalidades genéticas recorrentes

LMA com t(8;21)(q22;q22.1); RUNX1-RUNX1T1

LMA com inv(16)(p13.1q22) ou t(16;16)(p13.1;q22); CBFβ-MYH11

LPA com PML-RARA

LMA com t(9;11)(p21.3;q23.3); MLLT3-KMT2A

LMA com t(6;9)(p23;q34.1); DEK-NUP214

LMA com inv(3)(q21.3q26.2) ou t(3;3)(q21.3;q26.2); GATA2, MECOM

LMA (megacarioblástica) com t(1;22)(p13.3;q13.3); RBM15-MKL1

Entidade provisória: LMA com BCR-ABL1 LMA com mutação NPM1

LMA com mutação bialélica de CEBPA

Entidade provisória: LMA com mutação RUNX1

LMA com alterações mielodisplásicas relacionadas

Neoplasia Mieloides relacionadas com terapia
LMA não classificáveis LMA com mínima diferenciação
LMA não classificáveis LMA com mínima diferenciação
LMA sem maturação
LMA com maturação
Leucemia Mielomonocítica Aguda 6
Leucemia Monoblástica e Leucemia Monocítica Aguda
Leucemia Eritroide Pura
Leucemia Megacarioblástica Aguda
Leucemia Basofílica Aguda
Panmielose aguda com mielofibrose
Sarcoma mieloide
Proliferações mieloides relacionadas com síndrome de Down
Mielopoesse anormal transitória (MAT)
Leucemia mieloide associada à síndrome de Down

2.2.2 Epidemiologia

A leucemia é um câncer universal que afeta pessoas de todas as faixas etárias, sendo classificada em 2018 como décimo quinto câncer mais comum, com cerca de 437.033 casos, e a décima primeira causa de morte por câncer, com 309.006 mortes. Apesar da leucemia ser mais prevalente em países desenvolvidos, as taxas de mortalidade são mais elevadas em países subdesenvolvidos (6).

Segundo os dados fornecidos pela American Cancer Society, nos Estados Unidos estima-se que em 2021 a leucemia represente 3,2% (61.090) de todos os casos de câncer incidentes e aproximadamente 3,2% (23.660) em óbitos. A leucemia é mais frequente em homens, apresentando maior mortalidade (8,7/100.000) do que em mulheres (4,7/100.000) (44).

A raça e a idade são fatores que influenciam na incidência e mortalidade da leucemia. No Estados Unidos, a incidência é 15/100.000 habitantes na população branca, enquanto a população preta é 11/100.000, seguida de hispânicos em 10,6/100.000. As taxas de mortalidades ajustadas conforme a idade por 100.000 habitantes foram 7 para brancos, 5,6 para pretos, 4,8 para hispânicos, 3,8 para asiáticos/ilhas do Pacífico e 3,3 para índios/nativos do

Alasca entre os anos de 2008 a 2012 (45). Os indivíduos pretos de qualquer idade têm menor sobrevida comparada à população branca, mesmo que a doença seja mais prevalente em brancos. Sendo assim, a sobrevida de 5 anos a partir do diagnóstico em pacientes pretos com menos de 65 anos é de 63%, enquanto em pacientes brancos é de 73%. Em relação, ao paciente acima de 65 anos, a sobrevida é de 43% para pretos e 50% para brancos (46).

A leucemia representa aproximadamente 20-30% de todas as neoplasias em crianças e jovens com menos de 20 anos (38). A LLA é considerada o tipo mais comum em crianças e adolescentes, abrangendo 75% do total de casos de leucemia em indivíduos abaixo de 20 anos de idade, o que corresponde a um quarto de todos os tipos de câncer em crianças. Seu pico de incidência é de 7,8/100.000 habitantes entre crianças de 2 a 4 anos de idade, principalmente meninos (30, 34). A LMA é mais predominante em adultos, sua incidência geral representa 3-5 casos por 100.000 habitantes com uma estimativa de 20.240 casos para o ano de 2021. É importante ressaltar que a média de idade dos indivíduos diagnosticados com LMA corresponde aos 68 anos, onde 54% dos indivíduos descobrem a doença após os 65 anos e 33% depois dos 75 anos (44).

No Brasil, para cada ano do triênio 2020-2022, são estimados 10.810 casos novos de leucemia, sendo 5.920 em homens e 4.890 em mulheres. Esta estimativa equivale a um risco estimado de 5,67 casos novos por 100.000 homens e 4,56 por 100.000 em mulheres (7). Em 2019, ocorreram 7.370 óbitos, sendo 4.014 homens e 3.356 mulheres. Na região norte, não levando em consideração o câncer de pele não melanoma, a leucemia em homens é o quinto câncer mais comum, com estimativa de 4,45 por 100.000 e em mulheres 3,29 por 100.000 (7).

Um estudo retrospectivo que analisou a progressão dos números de mortes causado por leucemias no Brasil entre os anos de 2010 a 2016 demonstrou que a mortalidade neste período foi igual a 68.769 óbitos (9.824±543 óbitos/ano), dos quais 53,72% eram homens e 57,24% brancos, demonstrando uma maior mortalidade no sexo masculino. Em relação aos estados brasileiros, o Rio Grande do Sul foi o que obteve a maior predominância, enquanto aqueles com menor mediana de mortes são o Amapá (com exceção para o ano de 2013 e 2015), seguida de Roraima, Pará, Tocantins e Rondônia (figura 2) (48).

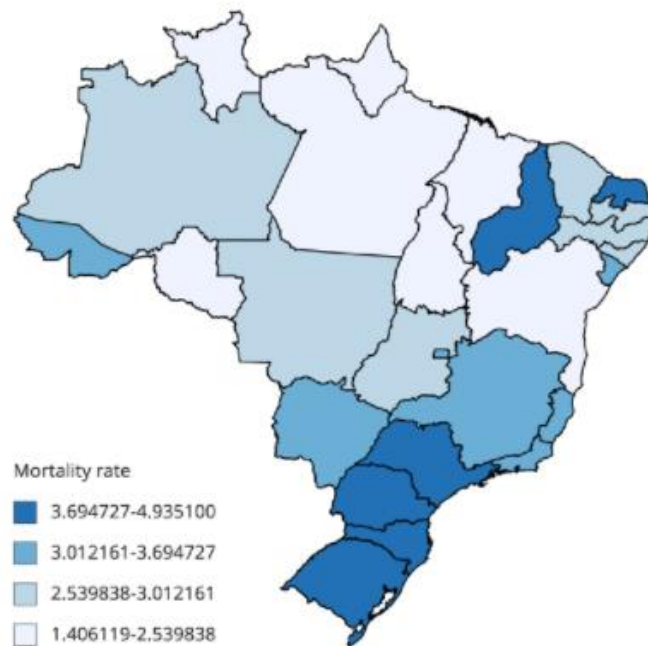


Figura 2. Mapa coroplético do Brasil demonstrando os óbitos por 100.000 habitantes associados à leucemia no ano de 2016.

Fonte: Gouveia et al. (2020)

A cidade de Manaus apresentou um dos maiores índices de ocorrência de LLA do país, de acordo com os registros de câncer de base populacional (RCBP) de 2008. Em 2011, foi identificada novamente como a capital brasileira com maior incidência de casos, equivalente a 76,8 casos por milhão de habitantes (8), enquanto em 2016 aumentou para 87,1 casos (9).

Silva-Júnior et al. (49), realizaram um estudo transversal retrospectivo no estado do Amazonas durante o período de 2005 a 2015. Os resultados mostraram 843 casos de leucemias diagnosticados no HEMOAM, sendo que 68,45% (n=577) eram de LLA e 31,55% (n=266) de LMA. Em relação à faixa etária dos pacientes, 38,55% (325 casos, a maioria) com LLA apresentam menos de 10 anos de idade, enquanto a maior parte dos pacientes com LMA estavam acima dos 60 anos. A leucemia promielocítica aguda foi a mais prevalente com 13,16%. Conforme já foi mencionado em outros estudos, as leucemias afetam, principalmente, os homens. Neste estudo, 328 casos para LLA e 151 em LMA.

2.2.3 Patogênese

A hematopoese é processo de produção de células sanguíneas pela medula óssea, um tecido esponjoso encontrado dentro dos ossos chatos e epífises dos ossos longo, como fêmur e

o úmero (50). Todas as células sanguíneas são oriundas de uma única célula-mãe, conhecida como células-tronco pluripotente que amadurecem e diferenciam-se para formar os eritrócitos, leucócitos e plaquetas (figura 3) (4). No microambiente da medula óssea, as células-tronco são favorecidas para sua sobrevivência e a capacidade de autorrenovação e produção de células progenitoras diferenciadas que vão dar origem às células maduras da linhagem mieloide e linfóide. Todos esses processos decorrem da regulação de fatores de transcrição e fatores de crescimento hematopoiéticos (1, 37).

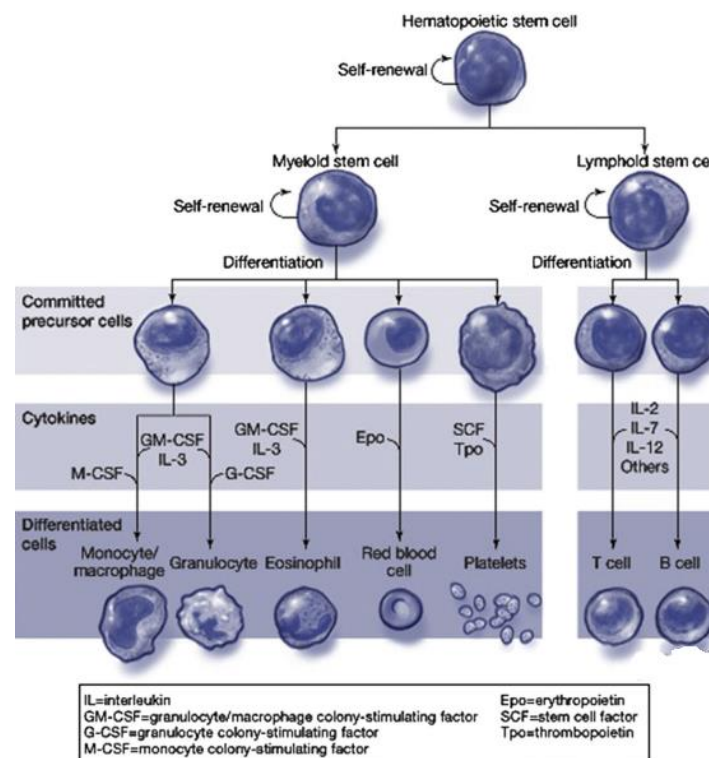


Figura 3. Diagrama esquemático representativo das fases da hematopoese.

Fonte: Rose-Inman et al. (2014).

As células pluripotentes sofrem mutações no rearranjo do DNA que as transformam em clones malignos. Estas mutações podem ocorrer devido a radiação, substâncias químicas (fatores externos) e anormalidades cromossômicas (fator interno). As células multipotentes mieloide ou linfóide raramente estão envolvidas na origem do processo de transformação maligna das células hematopoiéticas. O processo de proliferação e expansão clonal dos leucócitos ainda não está esclarecida em todos os casos de leucemia (36, 38).

As modificações nos rearranjos moleculares possibilitam a alteração na estrutura ou regulação dos genes oncogênicos das células sanguíneas. Por exemplo, na LLA existe a presença de várias alterações cromossômicas do tipo estrutural e quantitativas que incluem hipodiploidia

(<44 cromossomos), hiperdiploidia (>50 cromossomos), assim como as principais translocações cromossômicas [t(12; 21), t(1; 19), t(4; 11) e t(9; 22)] conhecido como cromossomo Filadélfia. A translocação cromossômica t(12; 21) está presente em cerca de 22% dos pacientes pediátricos e são observadas anos antes da manifestação clínica da doença (39, 40). Na LLC, a possibilidade de desenvolvê-la é sete vezes maior em parentes de pessoas com a doença. O que mostra como existe uma predisposição genética e grande parte dos genes envolvidos continuam desconhecidos. Entretanto, as aberrações cromossômicas como deleção 13q14, 11q23 e trissomia 12 são as mais encontradas em pacientes diagnosticados com a doença (4).

A LMC é decorrente da translocação recíproca entre os braços longo dos cromossomos 9 e 22 t (9;22) (q34; q11), dando origem ao cromossomo PH. Ocorre fusão de parte do gene *Abelson murine leucemia* (ABL) do cromossomo 9 com o gene *reakpoint cluster region* (BCR) do cromossomo 22, gerando o gene *BCR-ABL* que codifica a oncoproteína BCR-ABL de 210 kDA com função de tirosina quinase exacerbada, o que provoca a proliferação de leucócitos e inibição da apoptose. Ainda que o cromossomo PH esteja presente, principalmente na LMC, ele ainda pode ser encontrado em outras leucemias dependendo do ponto de quebra entre os genes *BCR* e *ABL*, por exemplo, se for de forma distinta, conseqüentemente poderá causar a formação de um gene *ABL-BCR* de 190 kDA associado a LLA (55).

2.2.4 Diagnóstico

O diagnóstico das leucemias é constituído pela distinção entre os tipos da doença por meio de exames como o hemograma, imunofenotipagem, mielograma e análises citogenética e molecular (25, 39). Na rotina, o hemograma é o principal exame que direciona para uma suspeita de leucemia, quase sempre apresentando elevada quantidade de leucócitos. A confirmação da leucemia é realizada através de punção da medula óssea e posterior análise (57) a partir dos seguintes métodos: 1) Citometria de fluxo – permite avaliar características das células leucêmicas como morfologia e tamanho, possibilitando desta forma a diferenciação dos tipos de leucemias (58); 2) Por meio da Citometria de Fluxo é possível realizar a Imunofenotipagem – possibilita a detecção e distinção dos marcadores de superfície presentes nas células cancerígenas das células saudáveis (58); 3) Citogenética – permite detectar alterações cromossômicas; e 4) Molecular – permite identificar os tipos de mutações (56).

2.2.5 Tratamentos convencionais para leucemia

Atualmente, o tratamento para leucemia é selecionado de acordo com o diagnóstico e características da doença e do paciente, com a finalidade de escolher o tratamento mais adequado, por isso é necessário avaliar vários aspectos tais como a idade, a fase da doença e o tipo de leucemia. Os principais tratamentos são quimioterapia, radioterapia, terapia direcionada, imunoterapia e transplante de medula óssea, podendo serem usados de forma isolada ou combinados (55).

A quimioterapia é a forma de tratamento mais aplicada atualmente. Os principais medicamentos utilizados são citarabina, daunorrubicina, mitoxantrona e metotrexato para LMA (59). Na LMC, uso de hidroxiureia e o agente alquilante busulfan são os mais frequentes (60). Para LLA, são utilizados prednisona, doxorrubicina, asparaginase e vincristina (61). Para LLC, utiliza-se cytox-a e fludarabina. Com intuito de melhorar a eficácia do tratamento, muitas vezes é realizada a combinação desses medicamentos (62). Apesar de prolongar a vida do paciente, a quimioterapia nem sempre promove a sua cura (15).

Os medicamentos quimioterápicos agem sistematicamente, danificando tanto as células neoplásicas como as células saudáveis e produzem muitos efeitos colaterais no paciente como: desnutrição, distúrbios neurológicos, endócrinos, hipotireoidismo, doenças cardiovascular, pulmonares e osteonecrose, câncer secundário e dor crônica (63). Os medicamentos quimioterápicos têm sido capazes de melhorar a eficiência do tratamento dos pacientes com LMA, levando ao aumento da sobrevida de aproximadamente 65% das crianças com LMA (64). Apesar disso, a quimioterapia apresenta sérias desvantagens tais como: existem pacientes que não respondem ao tratamento; cerca de metade dos que respondem ao tratamento sofrem recidiva e geralmente vão a óbito (64).

A radioterapia causa a supressão e morte das células neoplásicas mediante o uso de radionuclídeo como: actínio-225, iodo-131, astato 211, cobre-67, ítrio-90, lutécio-177, bismuto-213 (65). A radioterapia e a quimioterapia podem ser administradas em um mesmo paciente, especialmente, os que serão submetidos ao transplante de células-tronco. A imunossupressão grave da medula óssea é um dos principais efeitos colaterais da radioterapia, fazendo com que o paciente desenvolva leucopenia, anemia e trombocitopenia (66).

A imunoterapia consiste em estimular o aumento da eficácia da resposta imune para eliminação de células cancerígenas, já que o câncer tem como um dos seus mecanismos de

defesa a imunossupressão. Todos os subtipos de leucemias apresentam antígenos específicos, por exemplo, a LMA com CD33, LLA com CD19 e CD22, a LLC com CD20 e CD200. Estes antígenos específicos são alvos para os receptores usados na imunoterapia aplicada como as células natural killer ativadas, linfócitos T, anticorpos monoclonais (28). Embora a imunoterapia apresente efeitos colaterais reduzidos comparada à quimioterapia convencional, o seu custo é muito elevado e os medicamentos imunoterápicos com alvo para os inibidores de checkpoint podem gerar uma regulação negativa, o que induz ao desenvolvimento de doenças autoimunes e até mesmo o óbito de pacientes leucêmicos (54,55).

O transplante de células-tronco hematopoiéticas (TCTH) é classificado de acordo com o local de onde será retirado as células: células-tronco do sangue periférico, medula óssea e cordão umbilical. O seu principal efeito colateral é o enxerto-contra-hospedeiro (GVHD). Em razão disso, é importante induzir a imunossupressão no paciente e verificar a compatibilidade do antígeno leucocitário humano (HLA) entre o doador e o receptor, pois quanto maior a compatibilidade, menos chances de rejeição pelos linfócitos T (52, 56).

Os tratamentos atuais para leucemia apresentam limitações e dificuldades relacionadas a resistência aos medicamentos quimioterápicos e recidiva do câncer. A partir disso, surge a necessidade da combinação de compostos e medicamentos já existentes com a aplicação da nanotecnologia para oferecer uma nova perspectiva contra a resistência à quimioterapia, a recorrência do câncer e, principalmente, uma possível cura sem a necessidade de transplante.

2.3 RESISTÊNCIA À QUIMIOTERAPIA

A resistência das células cancerígenas aos medicamentos quimioterápicos é um grande desafio para o sucesso da terapia curativa do câncer, uma vez que reduz significativamente a eficácia do tratamento e aumenta o risco de recidiva (70). Existem dois tipos de resistência: a primária ou intrínseca (quando as células não respondem ao medicamento antes da exposição ao mesmo) e a adquirida (quando as células se tornam resistentes após o tratamento) (11,12). A resistência adquirida está relacionada à exposição ao medicamento, que inicialmente é eficaz contra o câncer, mas que, com o tempo, pode levar seleção clonal no qual as células cancerígenas sofrem mutações, resultando em resistência ao medicamento. A exposição a um único tipo de medicamento pode levar à resistência a outros fármacos com estrutura e função diferentes, o que é conhecido como resistência cruzada ou resistência a múltiplas drogas (MDR) (57, 58).

O desenvolvimento da MDR é um indicador de mau prognóstico, pois diminui a sobrevida de pacientes com leucemia, especialmente em casos de LLA infantil e LMA(72). A resistência à quimioterapia é a principal causa de recorrência e óbito em pacientes com leucemia linfóide aguda de células T (LLA-T), tanto em crianças quanto em adultos. Estudos mostram que cerca de 20% das crianças e 40% dos adultos recidivam após o tratamento intensivo com medicamentos quimioterápicos (73).

As células neoplásicas hematopoéticas desenvolvem diversas estratégias para sobreviver, adaptar e proliferar, o que resulta em uma resistência aos medicamentos (71). Essa resistência pode ser conferida por diversos mecanismos independentes, como modificações na farmacocinética e no metabolismo da droga, diminuição da capacidade de reparo do DNA, alterações nas vias de sinalização relacionadas à apoptose, proliferação, diferenciação, autofagia e aumento de proteínas que interferem no transporte celular de drogas (bombas de efluxo)(74). Essas células também podem sofrer novas anormalidades cromossômicas e epigenéticas que contribuem para a resistência (59, 60).

O principal mecanismo de resistência às drogas é mediado pela glicoproteína P (PGP), que resulta da expressão dos genes de resistência a múltiplas drogas 1 (MDR1) (76). A PGP é uma glicoproteína presente na membrana celular que atua como uma bomba de efluxo, utilizando a energia da quebra do ATP para realizar o transporte ativo de medicamentos quimioterápicos para fora da célula (76). Esse processo diminui a concentração citoplasmática dos medicamentos nas células neoplásicas, o que resulta na resistência cruzada a medicamentos que não são estruturalmente semelhantes (76).

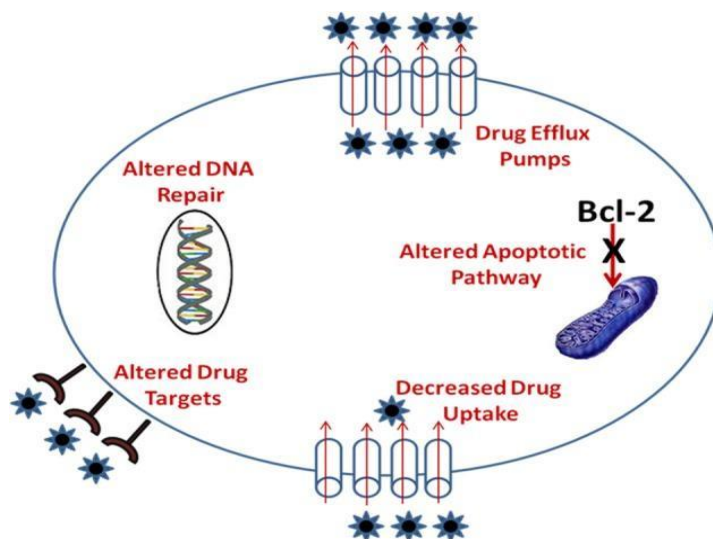


Figura 4. Mecanismos de múltipla resistência aos medicamentos.

Fonte: Adaptado Kapse-Mistry et al. (2014).

A maior parte dos medicamentos quimioterápicos entram nas células neoplásicas através de difusão da membrana celular, o que os torna vulneráveis à ação de bombas de efluxo e evitam que as drogas entrem no citoplasma (62, 63). Entretanto, as nanopartículas possuem tamanho elevado para serem transportadas por difusão. Elas são endocitadas e passam pela membrana celular, resultando em maior acúmulo intracelular (62, 63). As nanopartículas quando internalizadas nos endossomos liberam os medicamentos nas regiões perinucleares mais próximo do seu sítio de ação. Contudo, as nanopartículas aumentam a concentração dos medicamentos pela endocitose, fornecem uma forma de carregar, encapsular medicamentos quimioterápicos para deter o desenvolvimento da MDR (62, 63).

A resistência à quimioterapia é um desafio frequente no tratamento da leucemia, podendo levar à recidiva e, em casos mais graves, à morte do paciente. No entanto, a aplicação do uso de sistemas nanoparticulados de entrega tem sido considerada uma estratégia promissora para superar essa limitação(62, 63) Por meio de seu mecanismo de direcionamento, as nanopartículas são capazes de entregar o fármaco diretamente às células cancerígenas, evitando sua expulsão pelas bombas de efluxo um dos principais mecanismos de resistência à quimioterapia. Isso resulta em um aumento da absorção intracelular do fármaco, melhora a solubilidade do fármaco nas células leucêmicas e aumenta sua biodisponibilidade. Além disso, as nanopartículas reduzem o efeito citotóxico nas células saudáveis devido ao seu sistema de entrega direcionada (62, 63).

2.4 NANOTECNOLOGIA

Nanotecnologia é o estudo da produção de partículas com tamanhos que variam entre 10 e 1000 nm, sendo aplicada em diversas áreas, incluindo a medicina (64, 65). Nos últimos anos, a nanotecnologia tem sido reconhecida como uma alternativa promissora e inovadora para encapsular diferentes classes de fármacos, com o objetivo de aumentar a eficácia terapêutica e reduzir a toxicidade, principalmente dos medicamentos quimioterápicos (81). A falta de especificidade dos fármacos às células neoplásicas e a alta resistência à quimioterapia são as principais desvantagens do tratamento convencional do câncer, além de seus frequentes efeitos colaterais (82). O desenvolvimento de nanopartículas tem representado uma das principais aplicações desta tecnologia, visando superar e melhorar as dificuldades do tratamento de diversos tipos de câncer, sendo que um terço das pesquisas relacionadas às nanopartículas tem sido voltado para esta área (82).

2.4.1 Classificação das Nanopartículas

As nanopartículas (NPs) podem ser classificadas em orgânicas e inorgânicas, que são produzidas por diferentes tipos de materiais com tamanhos variados, podendo ser encontradas nas formas de 0D, 1D, 2D ou 3D (53, 68). As NPs orgânicas são compostas principalmente por proteínas, lipossomos, polímeros e lipídios, enquanto as inorgânicas são compostas por metais, ouro, carbono, sílica mesoporosa e partículas magnéticas (53, 68). Quando esses materiais estão em nanoescala, apresentam várias propriedades únicas, como propriedades eletrônicas, ópticas e catalíticas (84). As NPs orgânicas geralmente demonstram elevada biocompatibilidade, enquanto as NPs inorgânicas oferecem vantagens em termos de função e propriedades. O tamanho pequeno das NPs, em torno de 10 a 500 nm, permite uma excelente absorção intracelular, e sua grande área superficial possibilita a funcionalização com diferentes biomoléculas (85).

As NPs apresentam a capacidade de transportar tanto drogas hidrofílicas quanto hidrofóbicas. Além disso, os fármacos podem ter sua taxa de liberação controlada através da modificação da cadeia lateral do polímero, desenvolvimento de novos polímeros ou síntese de copolímeros (86). Quando encapsulados, esses fármacos possuem uma taxa de liberação controlada que pode depender do tempo ou do ambiente (86). Existem dois tipos principais de NPs: as nanoesferas, formadas por uma matriz polimérica, e as nanocápsulas, que possuem um sistema reservatório contendo um núcleo oleoso ou aquoso coberto por uma fina parede polimérica (Figura 5) (87).

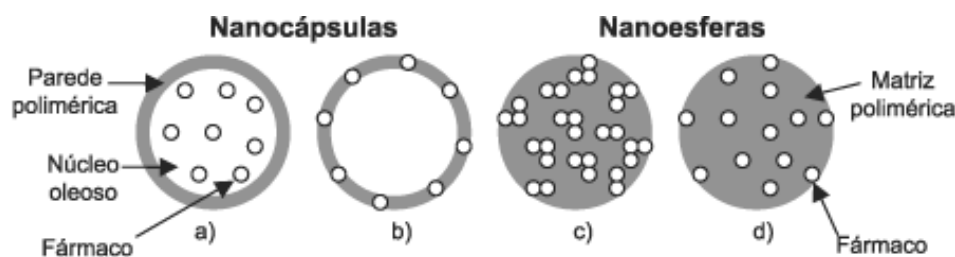


Figura 5: Representação esquemática de nanocápsulas e nanoesferas poliméricas: a) fármaco dissolvido no núcleo oleoso das nanocápsulas; b) fármaco adsorvido a parede polimérica das nanocápsulas; c) fármaco retido na matriz polimérica das nanoesferas; d) fármaco adsorvido ou disperso molecularmente na matriz polimérica das nanoesferas.

Fonte: Schaffazick et al. 2003

2.4.2 Mecanismo de ação das nanopartículas

As NPs têm o potencial de induzir a apoptose em células cancerígenas por meio de vários mecanismos, sendo um dos mais bem elucidados a geração de espécies reativas de oxigênio (EROS) (88). Por exemplo, as NPs de metal, como prata e zinco, podem levar à apoptose ou necrose celular por meio da geração de EROS (89). Essas moléculas danificam a membrana celular, desnaturam proteínas e causam danos ao DNA. Já as NPs de proteínas são vantajosas por serem biodegradáveis, característica que os metais não possuem (90). A albumina é um exemplo comumente utilizado, pois é facilmente degradada e apresenta boa biocompatibilidade (91).

Conforme o estudo de Chung et al.(85), as NPs de zinco foram aplicadas em células de carcinoma hepatocelular (HepG2) em diferentes concentrações de 50-500mg. A dosagem mais alta (500mg) mostrou que cerca de 86% das células HepG2 morriam dentre 24 horas (92). As NPs de prata já foram aplicadas em vários estudos com células cancerígenas do epitélio alveolares humanas (A549) e células de ovário (90). Além disso, já foi comprovada a eficácia de NPs de metal em células de leucemia mieloide e câncer de mama (93).

As NPs apresentam outros mecanismos que induzem à apoptose em células cancerígenas, como a regulação positiva e negativa de proteínas, alterações nas respostas imunológicas e inibição da transcrição. Esses mecanismos podem ter atividade citotóxica contra as células cancerígenas. É importante ressaltar que ainda há muita especulação sobre os processos envolvidos nesses mecanismos, mas é consolidado que o resultado final é a morte celular, principalmente por apoptose (88).

2.4.2 Mecanismo de direcionamento das nanopartículas

As NPs direcionam o fármaco ao tecido tumoral por meio de dois mecanismos de ação: vetorização ativa e passiva (figura 6). Ambos os mecanismos aumentam o acúmulo de fármacos no local de ação, permitindo a redução das doses administradas e, conseqüentemente, diminuindo a toxicidade do tratamento (94).

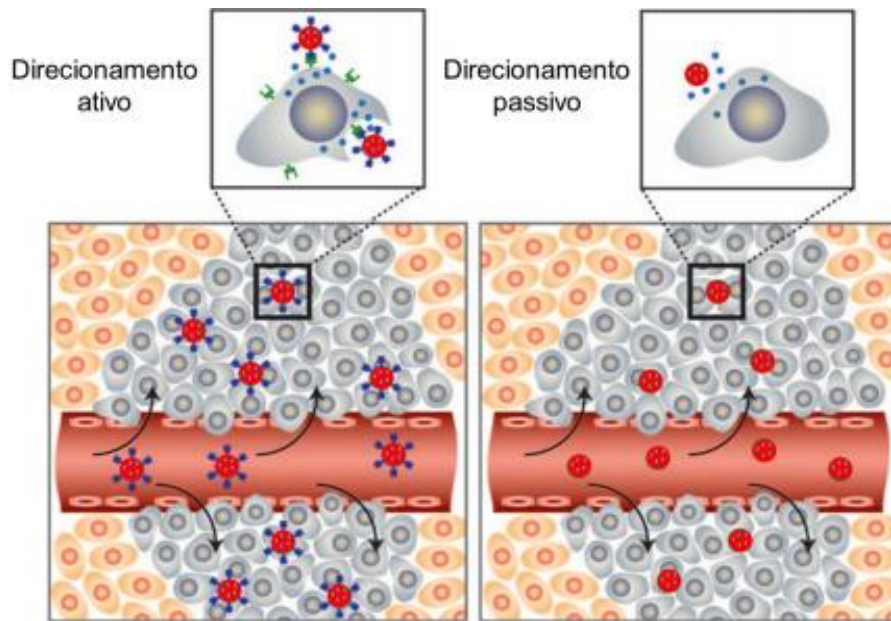


Figura 6. Mecanismo de direcionamento Ativo e Passivo das NPs.

Fonte: Adaptado de Farokhzad et al. (2009).

O efeito de permeação e retenção aumentada (Enhanced Permeability and Retention, EPR) é um exemplo de vetorização passiva, que ocorre devido ao aumento da permeabilidade vascular no tecido neoplásico. Esse aumento é resultado da angiogênese e do processo inflamatório, permitindo que as NPs extravasem para o espaço extravascular. Importante destacar que as NPs não extravasam para tecidos saudáveis. (76, 77). As fenestrações nos vasos sanguíneos de um tecido saudável variam entre 15 e 30 nm, enquanto que, com a permeabilidade aumentada, podem chegar a 100 a 780 nm. Portanto, as NPs, com um tamanho médio de 200 nm, conseguem acessar as células neoplásicas através dessas fenestrações (76, 77).

A vetorização ativa das NPs consiste em modificar a sua superfície pela adição de ligantes, tais como anticorpos, peptídeos, aptâmeros de RNA e glicose, para direcioná-las especificamente às células neoplásicas que possuem receptores específicos para estes ligantes. Isso reduz a ação inespecífica dos tratamentos, o que diminui a toxicidade nos tecidos saudáveis (75, 10). Esse método tem se mostrado promissor para o tratamento de leucemias, uma vez que a base molecular de cada subgrupo de pacientes com doenças hematológicas tende a ser bem definida, com translocações cromossômicas comuns, variações oncogênicas, perfis de expressão gênica e fenótipo imune distintos (97).

As células de tumores sólidos exigem um direcionamento específico para serem atingidas pelas NPs, enquanto as células de tumores líquidos estão presentes em toda a corrente sanguínea, tornando-as mais expostas às NPs (97). Como resultado, muitas das barreiras que as NPs enfrentam para alcançar tumores sólidos não são críticas em tumores líquidos. No entanto, é importante enfatizar que as NPs ainda podem ser opsonizadas por proteínas do sangue e reconhecidas pelo sistema fagocitário mononuclear, o que pode afetar sua eficácia no tratamento de tumores líquidos (97).

2.4.3 Nanopartículas e sustentação da liberação prolongada de medicamentos antileucêmicos

As NPs possuem a capacidade de sustentar a liberação das drogas que estão carregadas a elas por um determinado período, o que permite reduzir a frequência de aplicação dos medicamentos, diminuindo, conseqüentemente, a toxicidade das drogas para os pacientes. Por esse motivo, a aplicação de NPs é reconhecida como uma alternativa promissora para ultrapassar os limites da quimioterapia convencional (9, 78).

O etoposídeo é um dos medicamentos mais utilizados na quimioterapia para LLA e da LMA, apresentando biodisponibilidade oral variável de 24-74% e meia-vida terminal de 1,5 horas pela via intravenosa. Em um estudo utilizando as nanopartículas de PLGA (polimérica) para encapsular o etoposídeo, apresentou liberação sustentada por até 72h (99). Em outro estudo a citarabina, antimetabólito, usado na LMA, apresentou liberação *in vitro* completada em aproximadamente 2h, já quando encapsulada em nanopartículas de PLGA, a liberação foi sustentada por cerca de 24h. A liberação sustentada desses medicamentos diminuiria os efeitos colaterais quando comparada a exposição às altas dosagens na quimioterapia convencional (100).

2.4.4 Bismuto

Os compostos de bismuto possuem diversas aplicações. Sendo frequentemente utilizado para tratar doenças gastrointestinais, como por exemplo, os sais de bismuto mais usados: o subsalicilato de bismuto (Pepto-Bismol), citrato de bismuto coloidal (De-Nol), bismuto ranitidina citrato (Pylorid). O bismuto também é conhecido pela sua ação antibacteriana contra a bactéria *Helicobacter pylori* (98, 99). Em relação, a atividade antitumoral do bismuto, temos como exemplo os compostos de tropolonas e ditiocarbamatos de bismuto (III) (18).

A atividade citotóxica do bismuto está relacionada ao seu mecanismo de inibição de enzimas lipases, glicosidases e a produção de espécies reativas de oxigênio (EROS) que causam danos a membrana das mitocôndrias (101, 102). Marzano et al. (2021), observaram que dois novos complexos Bi (III) com ligantes assimétricos [NN'O] apresentaram elevada citotoxicidade nas células de leucemia mieloide crônica, com valores de IC₅₀ na faixa de 0,3–0,4 μmol L⁻¹ (103).

O estudo de Cabral-Romero et al. (2020) investigou a atividade antitumoral de um hidrogel carregado com nanopartículas lipofílicas de bismuto (Bis-BAL) em diferentes linhagens celulares, incluindo células cancerígenas de câncer cervical (HeLa), próstata (DU145) e cólon humano (HCT-116), e células não cancerígenas como fibroblastos pulmonares não cancerígenos HLF e LL 47 [MaDo]. Os resultados demonstraram que o hidrogel de nanopartículas de bismuto lipofílico reduziu significativamente o crescimento das células cancerígenas, apresentando eficácia *in vitro* comparável à das drogas docetaxel e cisplatina. Além disso, o composto não apresentou atividade citotóxica contra as células não cancerígenas utilizadas como controle (104).

2.4.5 Crajiru

A espécie vegetal *Fridericia chica* ou *Arrabidaea chica* é conhecida popularmente como crajiru, pertence a família *Bignoniaceae* e é amplamente distribuída em regiões tropicais do Brasil, especialmente no estado do Amazonas (19). Dentre os seus usos populares, destacam-se os efeitos contra cólicas intestinais, diarreia, anemia e infecções (19). Um dos motivos que explicam o potencial do crajiru como agente terapêutico é a presença de compostos fenólicos, que são metabólitos secundários encontrados nos extratos das suas folhas (118). Estudos apontam a eficiência dos extratos das folhas de crajiru com atividades antitumorais, antivirais, cicatrizantes, anti-inflamatórias e antioxidantes (20, 21).

No estudo de Ribeiro et.al (2012) foi avaliada a atividade antitumoral de extratos aquoso e etanólico do Crajiru em modelo *in vivo*. Os resultados demonstram que após dez dias de tratamento com os extratos ocorreu diminuição considerável do tumor sólido de Ehrlich. Além disso, observaram que a atividade antitumoral do extrato de crajiru possa está relacionada à sua ação anti-inflamatória, já que os resultados apontaram uma diminuição da quantidade de linfócitos TCD4⁺ e o aumento de neutrófilos (105).

Em outro estudo Rodrigues M et.al (2015), o extrato de cajuru foi avaliado em forma nanoemulsão (ACE-NE) como fonte de fotossensibilizadores para terapia fotodinâmica antitumoral. Observou-se que o ACE-NE tem uma excelente absorção da luz vermelha e, sob fotoativação (λ 660 nm, 4,5 J/ cm²), produz espécies reativas de oxigênio. Além disso, quando o ACE-NE foi testado fotoativado *in vitro* este apresentou uma IC50 de 1,3 μ g ACE/mL contra células de adenocarcinoma de mama humano (MCF-7). Na ausência de luz, a ACE não demonstrou atividade citotóxica tanto para células epiteliais mamárias humanas (MCF-10A) quanto para células MCF-7 (106).

2.4.6 Entrega intracelular pelas nanopartículas

A entrega intracelular de fármacos é uma abordagem que visa direcionar as NPs para compartimentos subcelulares ou organelas das células neoplásicas, aumentando a biodisponibilidade dos medicamentos em seus locais de ação e reduzindo significativamente os efeitos colaterais (98). Estudos realizados por Chen et al. (107) utilizando NPs de nanofibras de poli(ácido láctico) e dióxido de titânio (TiO₂) mostraram uma alta concentração da daunorrubicina em células leucêmicas K562. Já as NPs acopladas a oligopeptídeo duplo, desenvolvidas por Fan et al. (108), foram testadas para entregar trióxido de arsênio em nichos vasculares e osteoblásticos da medula óssea. Essas NPs apresentaram melhor proteção do trióxido de arsênio até atingir as células leucêmicas, além de ter induzido a eliminação de células precursoras da LMC *in vitro*.

Em um estudo realizado por Yadav et. al (109), os autores avaliaram a citotoxicidade e absorção celular de NPs de PLGA carregadas de etoposídeo (ETO-PLGA NP), copolímero em bloco PLGA-MPEG (ETO-PLGA-MPEG NP) e copolímero PLGA-Plurônico (ETO-PLGA-PLU NP) em linhagem celular L1210 (Leucemia linfocítica em camundongos). Os resultados demonstraram aumento da citotoxicidade devido a elevada captação de NPs pelas células neoplásicas. As NPs PLGA-MPEG carregada com etoposídeo e PLGA-Plurônico demonstraram citotoxicidade sustentada por até cinco dias. Desta forma, as NPs que carrearam os medicamentos apresentaram melhor redução da viabilidade das células L1210 em um período de três dias, quando comparadas com o uso isolado do etoposídeo, o qual alcançou a sua eficiência total em 24h. Nesse estudo, foram usadas imagens confocais Z-stack para demonstrar a atividade de fluorescência em cada seção das células L1210, demonstrando que as nanopartículas foram internalizadas pelas células (figura 7).

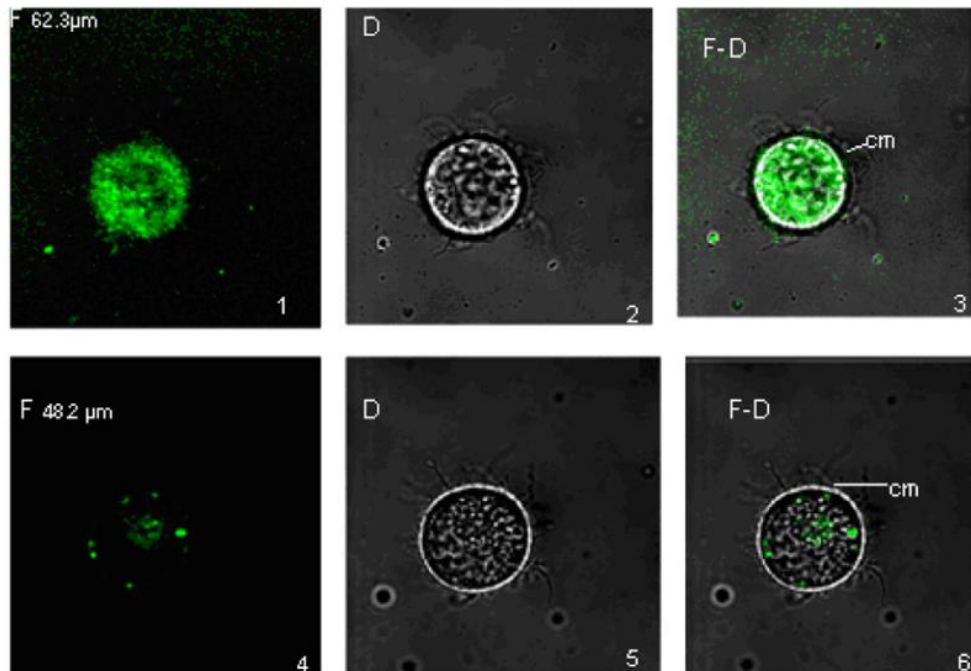


Figura 7. Comparação da imagem de fluorescência (F), imagem diferencial (D) e sobreposição da imagem da diferença de fluorescência (F – D) em células L1210 para captação de PLGA – MPEG NP.

Imagens 1, 2 e 3 foram tomadas a 62,3μm e 4, 5 e 6 a 48,2μm da superfície.

Fonte: Yadav et al. (2011).

2.4.7 Nanopartículas e aplicação clínica em pacientes leucêmicos

Atualmente, várias NPs terapêuticas foram aprovadas para uso clínico pelo FDA nos Estados Unidos ou pela Agência Europeia de Medicamentos (EMA) (110, 111). Entre as primeiras aprovadas para leucemia estão a mylotarg-LMA em 2000 (34), a Oncospar-LLA infantil em 2006 e a lipossomal doxorubicina (Dox®), que demonstrou melhor eficácia e segurança em comparação ao tratamento convencional com a doxorubicina (35). Em 2012, foi aprovado o Marqibo, uma formulação de vincristina encapsulada em bicamada lipídica rígida de esfingomielina, sendo uma importante alternativa para pacientes adultos com LLA do tipo cromossomo Filadélfia negativo que sofreram recidiva por duas ou mais vezes. Em um estudo clínico, o Marqibo atingiu taxa de resposta global de 35% (36). Outras nanopartículas aprovadas para aplicação em câncer incluem mylotarg, Ontak, Ocospar e Abraxane (Figura 8) (110, 112).

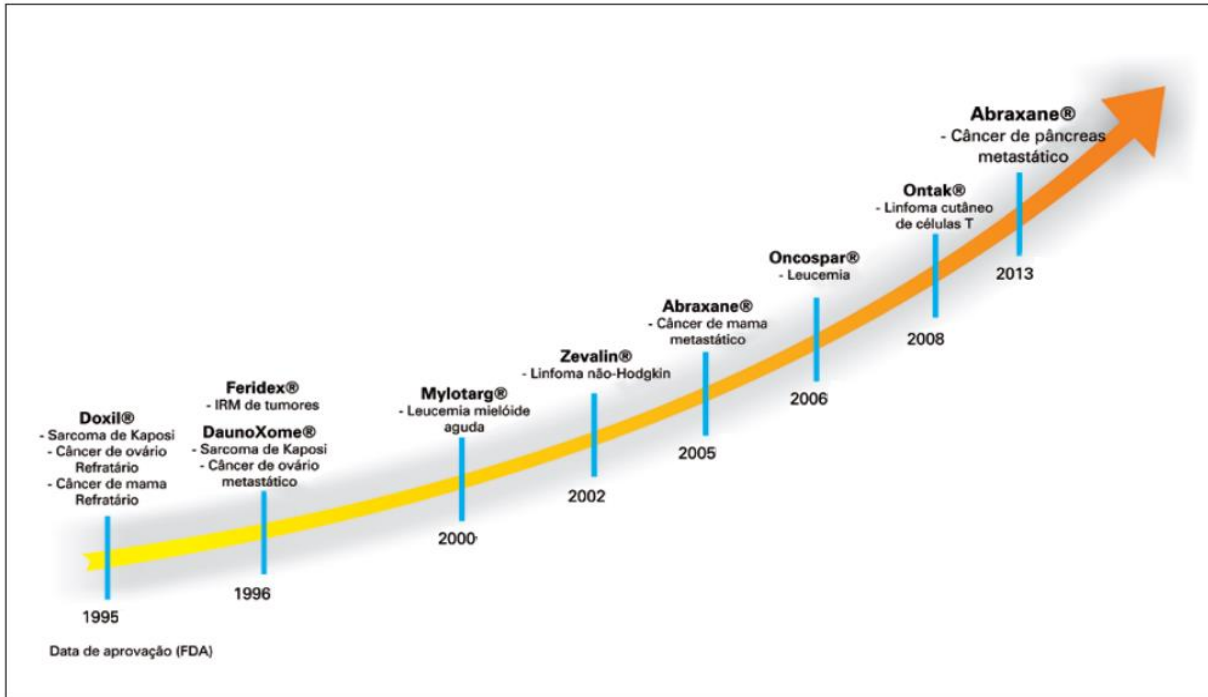


Figura 8: Linha do tempo representando exemplos de nanopartículas que foram aprovadas pela Food and Drug Administration (FDA).

Fonte: Adaptado de Vieira et al. (2015).

Em 2017, a VYXEOS foi a primeira nanopartícula aprovada clinicamente com combinação sinérgica de medicamentos quimioterápicos anexados em uma proporção molar de citarabina para daunorrubicina de 5:1 para o tratamento de LMA em adultos. Tendo como resultado a melhora na sobrevida global de 9,6 meses em comparação com 5,9 meses no controle (medicamento isolado). Essa pesquisa também demonstrou que VYXEOS possibilitou a melhora na eficácia da dose cumulativa de daunorrubicina e citarabina mais baixa em comparação com seus equivalentes isolados (37).

Aproximadamente metade dos pacientes com câncer não são curados pelos tratamentos atuais, tornando o uso de nanopartículas uma alternativa promissora para reduzir esse percentual (16). Embora a quimioterapia convencional seja essencial para o tratamento da leucemia, seus resultados ainda não são completamente satisfatórios devido aos vários problemas relacionados à formulação e farmacocinética, resistência adquirida aos medicamentos e toxicidade prolongada. Portanto, é necessário desenvolver tratamentos alternativos mais seguros e eficazes na entrega de agentes terapêuticos aos locais alvo, como proposto pelo uso dos sistemas nanoencapsulados (16).

O uso de nanopartículas terapêuticas apresenta grande potencial como alternativa no tratamento da leucemia, visando superar as limitações da quimioterapia convencional, tais como a resistência aos quimioterápicos e seus efeitos colaterais. De fato, várias nanopartículas já foram aprovadas para uso clínico, como a mylotarg-LMA, Oncospar-LLA e o Marqibo, demonstrando sua eficácia no combate à leucemia. Com isso, a utilização de compostos nanoparticulados representa uma importante estratégia para alcançar melhores resultados terapêuticos e reduzir o percentual de casos de leucemia que não alcançam a cura.

3 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

- Avaliar a atividade anticancerígena e imunomoduladora *in vitro* de compostos nanoparticulados.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a atividade citotóxica *in vitro* de compostos nanoparticulados contra células cancerígenas e não cancerígenas;
- Analisar a atividade imunomoduladora dos compostos nanoparticulados;
- Avaliar a capacidade dos compostos em inibir a expansão clonal de células cancerígenas.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ASPECTOS ÉTICOS

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Fundação HEMOAM (Número do Parecer: 4.982.395) (CAAE 51257921.2.0000.0009) dia 17 de setembro de 2021, em concordância com a resolução 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde (CNS), a qual preconiza as diretrizes e Normas Regulamentares da Pesquisa Envolvendo Seres Humanos. Este estudo faz parte do projeto Horizon 2020-MSCA-RISE-2016-734759, acrônimo VAHVISTUS, realizado em parceria com o Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia – INPA via acordo firmado com a União Europeia.

4.2 OBTENÇÃO DA NANOPARTÍCULA DE BISMUTO

Neste estudo, foram utilizados dois compostos nanoparticulados de Bismuto e Crajiru. A nanopartícula de bismuto (BI-MES) e o controle Mercaptoetano sulfonato de sódio (MESNa) (ligante) foram fornecidos pelo Departamento de Química da Universidade de Helsinque. Sendo a nanopartícula de óxido hidratado de bismuto (Bi-MES) (BiCl_3 solution 1.0 M in 1.0 HCl; peso molecular (Bi)=208.98) e o ligante Mercaptoetano sulfonato de sódio (MESNa), peso molecular (MESNa)=164.18. Este ligante é necessário para manter a estabilização das nanopartículas e assim evitar a agregação.

4.3 OBTENÇÃO DA NANOCÁPSULA CARREGADAS COM CRAJIRU

A nanocápsula carregadas com crajiru foram produzidas e fornecidos pelo Laboratório de Tecnologia Farmacêutica da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Amazonas. O extrato de Crajiru para produção das nanocápsulas foi cedido pelo Dr. Francisco Célio da Embrapa/AM.

4.4 PREPARAÇÃO DE NANOCÁPSULA CARREGADAS COM CRAJIRU

As nanocápsulas de Crajiru foram preparadas pelo método de deposição interfacial de polímero seguido de deslocamento do solvente. Segundo FESSI *et al.*(1989) (113) e Florentino *et al.*(2021) (114).

Preparação da fase orgânica: em um agitador magnético a 400 rpm (Fisatom, Brasil), foi preparada uma solução acetona (15 mL), Span 20 (500 mg), palmitato de isopropila (500 mg) e Crajiru (50mg). Posteriormente, foi adicionado o Kollicoat MAE (500 mg) previamente dissolvido em 5 mL de etanol 96% e a agitação foi mantida por 20 minutos.

Preparação da fase aquosa: composto por água (50 mL) e Tween 80 (500mg), foi mantida em agitação a 400 rpm por 20 minutos, em temperatura ambiente. A fase orgânica foi adicionada à fase aquosa ($\approx 1\text{mL}/\text{min}$) usando uma bureta e a mistura foi agitada por mais 15 minutos a 400 rpm. Posteriormente, a mistura foi homogeneizada por 5 min em agitador de alta cisalha Ultraturrax® (IKA, Suíça) a 10 mil rpm. Para formar as nanocápsulas de Crajiru, o solvente foi eliminado em um evaporador rotativo a vácuo (IKA, Suíça) a 50°C e as nanocápsulas armazenadas em frasco âmbar. As nanopartículas foram preparadas no laboratório de Tecnologia Farmacêutica da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Amazonas (UFAM) e após todas as análises físico-químicas para avaliar a qualidade das nanopartículas, as mesmas foram cedidas para a realização do presente estudo.

4.5 PREPARAÇÃO DE NANOPARTÍCULA DE BISMUTO

Foram utilizadas as soluções: BiCl_3 1,0 M em 1,0 HCl; M.w. (Bi) = 208,98 e Sulfonato de mercaptoetano de sódio (MESNa), P.M.=164,18. Foi dissolvido 0,985 g de MESNa (~ 6 mmol) em 3 mL de água sob agitação suave à temperatura ambiente. Em seguida foi adicionado 3,0 mL de solução de Bi. A solução transparente tornou-se amarelo claro e foi filtrado através da membrana filtrantes de 0,45 μm . Depois sob agitação moderada, foi adicionado gota a gota 30 mL de água no béquer de 100ml. O que demorou cerca de 30 min. Em seguida foi adicionado solução de NaOH 1,0 M até $\text{pH} = 7,0 \pm 0,5$. Após isso, a solução foi transferida para a bolsa de diálise e realizada a diálise em 2,5 L de água deionizada por 2,5 - 3 h. Teste para Bi e Cl e, em seguida a solução dialisada foi transferida para um frasco de armazenamento. Este protocolo é pioneiro e foi desenvolvido por pesquisadores do Departamento de Química da Universidade de Helsinque.

4.6 CULTURA DE CÉLULAS

As Linhagens de células leucêmicas humanas HL-60 (ATCC® CCL-240™ - Leucemia mieloide aguda) e K-562(ATCC® CCL-243™-Leucemia mieloide crônica) foram cultivadas em meio RPMI (meio RPMI 1640/Gibco, Rockville, MD) suplementado com 10% de soro

bovino fetal inativado (SFB; Gibco), 100 µg/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina. Todas as células serão mantidas a 5% de CO₂, na temperatura de 37 °C e em incubadora de CO₂. Essas linhagens celulares foram gentilmente cedidas pelo Laboratório de Biologia Molecular da UNICAMP. A linhagem celular Vero foi gentilmente cedida pela Fundação Oswaldo Cruz de Manaus e foram utilizadas neste estudo com o objetivo de verificar se os compostos nanoparticulados apresentam alguma ação citotóxica contra células não cancerígenas. A linhagem Vero foi mantida em frascos T75 contendo Dulbecco's modified Eagle's médium (DMEM) suplementado nas mesmas condições descritas acima para células de linhagem cancerígenas. A troca de meio de cultura e repique foi efetuado em média de 48h para cada linhagem celular.

4.7 ISOLAMENTO E PREPARAÇÃO DE CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGUE PERIFÉRICO HUMANO (PBMC)

Os indivíduos que decidiram participar do presente estudo foram convidados a assinarem um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). Após a assinatura foi feita a coleta de sangue periférico com anticoagulante (EDTA) de doadores de sangue (n=10) do HEMOAM. As células mononucleares de sangue periférico (PBMC) foram isoladas por meio de centrifugação gradiente de densidade utilizando Ficoll-Hypaque (GE Healthcare). Em seguida, as células mononucleares foram coletadas e lavadas três vezes em RPMI antes de serem cultivadas sob as mesmas condições mencionadas anteriormente.

4.8 AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR

A viabilidade celular foi medida por ensaio de Metiltiazoletrazolium (MTT) utilizando as linhagens celulares K562, HL60 e as linhagens não cancerígenas Vero e PBMC, conforme descrito anteriormente (115). A linhagem celular permanente (10⁴ células/poço) e a primária (PBMCs, 10⁵ células/poço) foram cultivadas em placas de cultura de 96 poços e tratadas em triplicatas com diferentes concentrações dos compostos, variando de 0,37µg/mL a 50µg/mL para a nanopartícula cotendo Crajiru nos tempos de 24h e de 0,18 µg/mL a 3µg/mL para BI-MES e MES, nos tempos de 24h. As placas foram incubadas por 24 horas a 37 °C em atmosfera de 5% de CO₂. Após o período de incubação, foi retirado o sobrenadante e adicionado 10µL de uma solução de MTT (5mg /mL) e 100µL de meio RPMI sem vermelho de fenol em cada poço,

seguido por uma incubação a 37°C durante 4h. A reação foi interrompida utilizando 100µL de DMSO.

O crescimento celular foi avaliado por meio da absorbância através de espectrofotometria utilizando um filtro de comprimento de onda de 570 nm. A viabilidade celular relativa das células foi estimada usando a seguinte equação: (absorbância óptica A 570 da amostra tratada) / (A 570 da amostra não tratada) × 100. Todos os testes foram feitos em triplicata.

4.9 ENSAIO DE FORMAÇÃO DE COLÔNIAS

O crescimento clonal foi avaliado por meio de ensaio de formação de colônias, conforme descrito anteriormente (115). Em resumo, cerca de $0,5 \times 10^3$ da linhagem K-562 e HL-60 foram cultivadas em placas de 6 poços com diferentes concentrações das substâncias em metilcelulose semissólida (MethoCult 4230, StemCell Technologies Inc., Vancouver, BC, Canadá). As colônias foram detectadas após 8 a 10 dias de cultura com adição de reagente MTT (1 mg/mL) e a contagem das colônias foi realizado por meio software de quantificação Image J (US National Institute of Health, Bethesda, MD, EUA). Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

4.10 ANÁLISE DE DOSAGEM DE CITOCINAS

As PBMCs isoladas foram cultivadas em meio RPMI-1640 na placa de 96 poços e incubadas a 37 °C por um período de 18h. Em seguida, as células foram tratadas com diferentes concentrações dos compostos nanoparticulados, conforme descrito anteriormente (115). Após a incubação, os sobrenadantes foram coletados para dosagem de citocinas.

Os níveis das interleucina-4 (IL4), IL6, IL10, IL12, interferon- γ (IFN γ) e fator de necrose tumoral- α (TNF α) foram avaliados por meio de kit de ensaio imunoenzimático (ELISA) comercialmente disponível (ImmunoTools, Friesoythe, Germany). O ensaio foi realizado de acordo com instruções do fabricante. Foram utilizados poços em duplicata para cada amostra individual. Os resultados das concentrações de cada citocina são expressos em pg/mL.

4.11 ANÁLISE DE DADOS

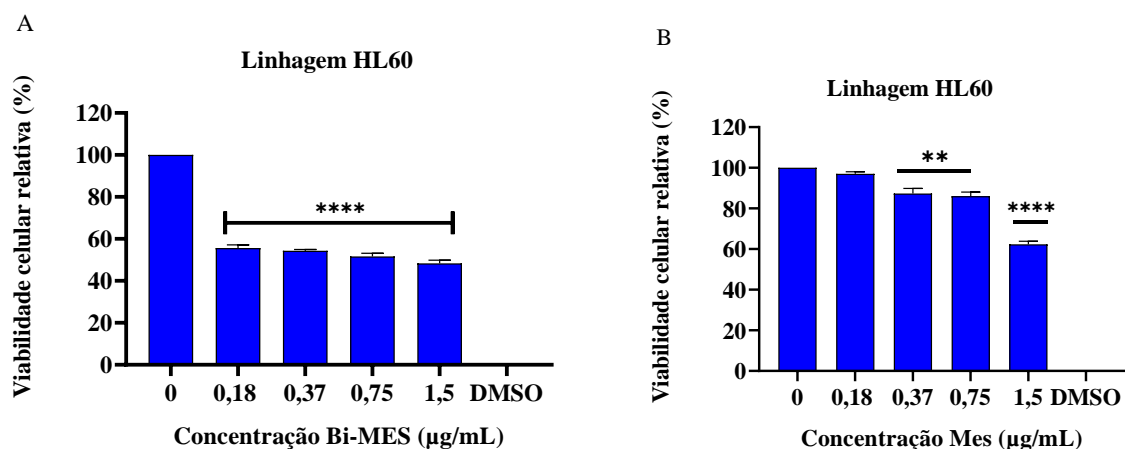
Os dados obtidos foram analisados por meio do software GraphPad Prism (v.8.0). Todas as variáveis quantitativas foram expressas por média \pm desvio padrão ou mediana. Os teste Qui-quadrado ou exato de Fisher para variáveis categóricas também foram utilizados. Teste 't' de student ou ANOVA foram utilizados para avaliar citotoxicidade relativa dos compostos nanoparticulados testados. Valores de $p \leq 0,05$ foram considerados estatisticamente significantivos.

5 RESULTADOS

5.1 ATIVIDADE CITOTÓXICA DAS NANOPARTÍCULAS DE BISMUTO

Em relação a nanopartícula de bismuto (BI-MES), os resultados indicam que a nanopartícula apresentou uma atividade citotóxica significativa nas concentrações de 0,18 $\mu\text{g/ml}$ a 1,5 $\mu\text{g/ml}$ na linhagem celular HL60 ($P < 0.0001$) e K562 ($P < 0.001$) em comparação com o controle (células não tratadas) (**Figuras 9.A e 9.C**), respectivamente. Já o ligante MES (controle) apresentou efeito citotóxico significativo nas concentrações de 0,37 a 1,5 $\mu\text{g/ml}$ ($P < 0.01$) em células HL60 (**Figura 9.B**), porém essa atividade foi muito inferior quando comparado ao BI-MES. Não foi observada atividade citotóxica do controle em células K562 (**Figura 9.D**) nas concentrações testadas.

Em células Vero, a nanopartícula Bi-MES apresentou atividade citotóxica ($p < 0.05$) em todas as concentrações testadas ($p < 0.05$) (**Figura 9.E**), enquanto que o ligante MES (controle) não demonstrou efeito citotóxico nestas células (**Figura 9.F**). Entretanto, a atividade de Bi-MES em células Vero foi menor quando comparada à atividade citotóxica observada nas células cancerígenas HL60 e K562. Em média, a nanopartícula Bi-MES reduziu a viabilidade das células HL60 em 49% e de K562 em 38%, enquanto que nas células Vero a redução média foi de apenas 27%. Embora a citotoxicidade de BI-MES tenha sido menor em células não cancerígenas em comparação a células cancerígenas, outros testes são necessários realizar para confirmar a eficácia e segurança desta nanopartícula.



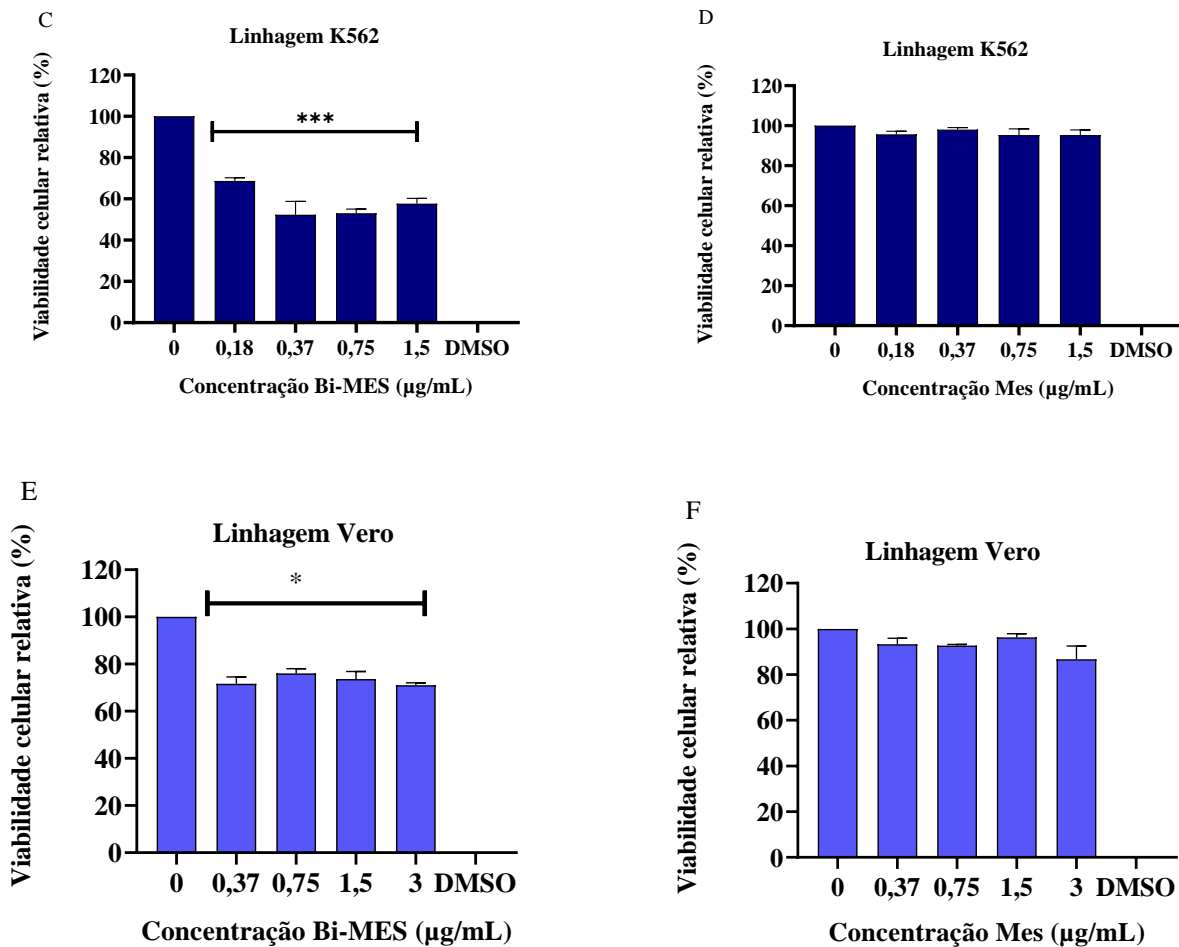


Figura 9: Atividade citotóxica da nanopartícula de bismuto (Bi-MES) e seu ligante (MES). Células HL60 (A) e K562 (C) tratadas nas concentrações de 0,18-1,5µg/ml com a nanopartícula Bi-MES no período de 24h. Células HL60 (B) e K562 (D) tratadas nas concentrações de 0,18-3µg/ml com o ligante MES (controle) no período de 24h. Células Vero tratadas nas concentrações de 0,37-3µg/ml da nanopartícula Bi-MES (E) e o ligantes MES (F) no período de 24h. A análise estatística realizada através do ANOVA. *: indica diferença significativa em comparação ao controle (células não tratadas), sendo: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$.

5.2 ANÁLISE DE FORMAÇÃO DE COLÔNIAS DAS NANOPARTÍCULAS DE BISMUTO

Para avaliar o efeito das nanopartículas na inibição ou redução da expansão clonal de células cancerígenas, foi realizado o ensaio de formação de colônias, como descrito anteriormente. Os resultados indicaram que o tratamento com a nanopartícula de Bi-MES e ligante (MES) reduziu significativamente a formação de colônias de células HL60 em 79% e 62%, respectivamente, em comparação com células não tratadas ($p < 0,0001$) (**Figuras 10.A e 10.B**).

Além disso, os resultados indicaram que o tratamento ocasionou a diminuição no tamanho das colônias de células quando comparado as células não tratadas (controles). Essa observação pode ser evidenciada nas imagens das colônias apresentadas nas **Figuras 10.C e 10.D**, respectivamente para Bi-MES e MES em comparação aos seus respectivos controles.

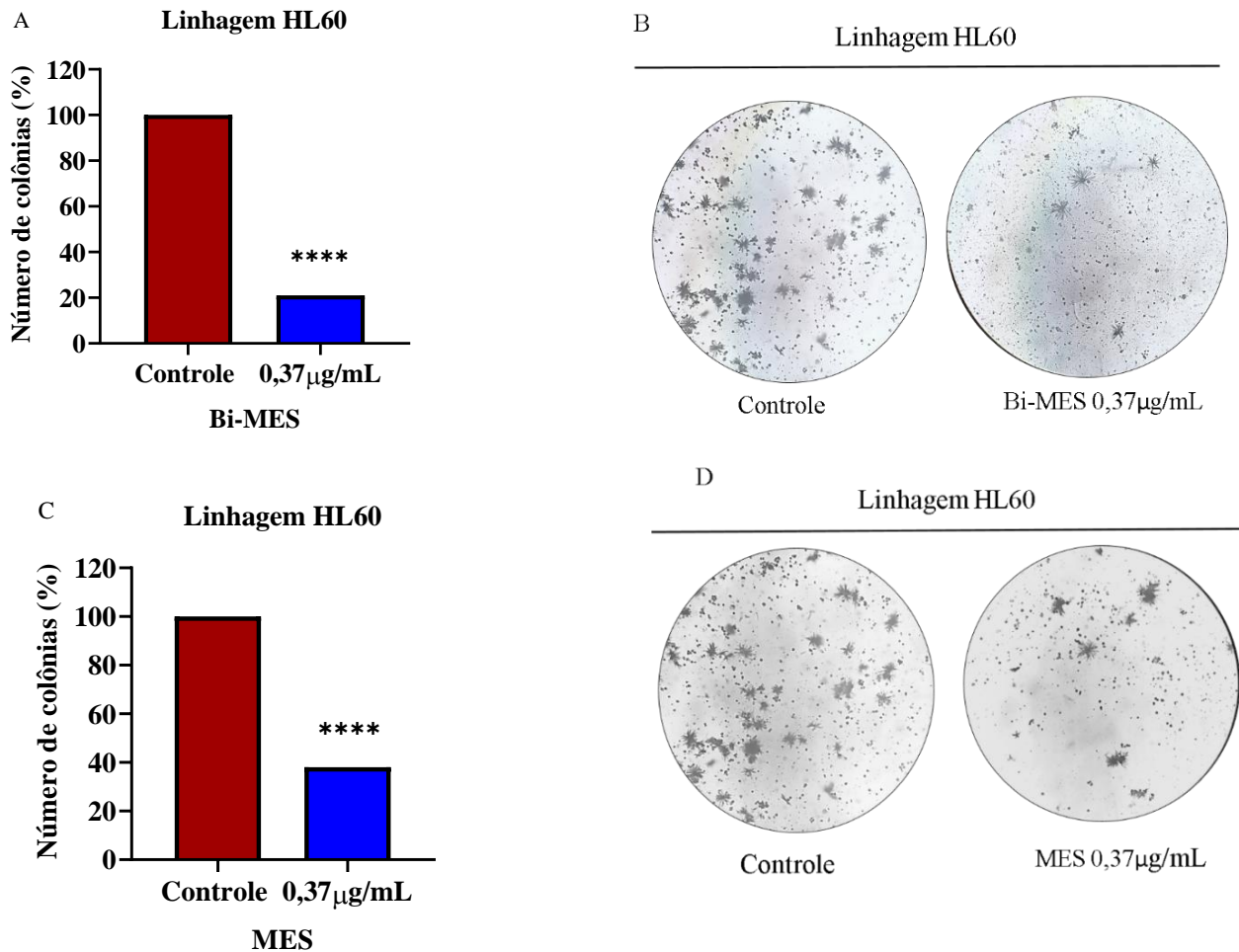
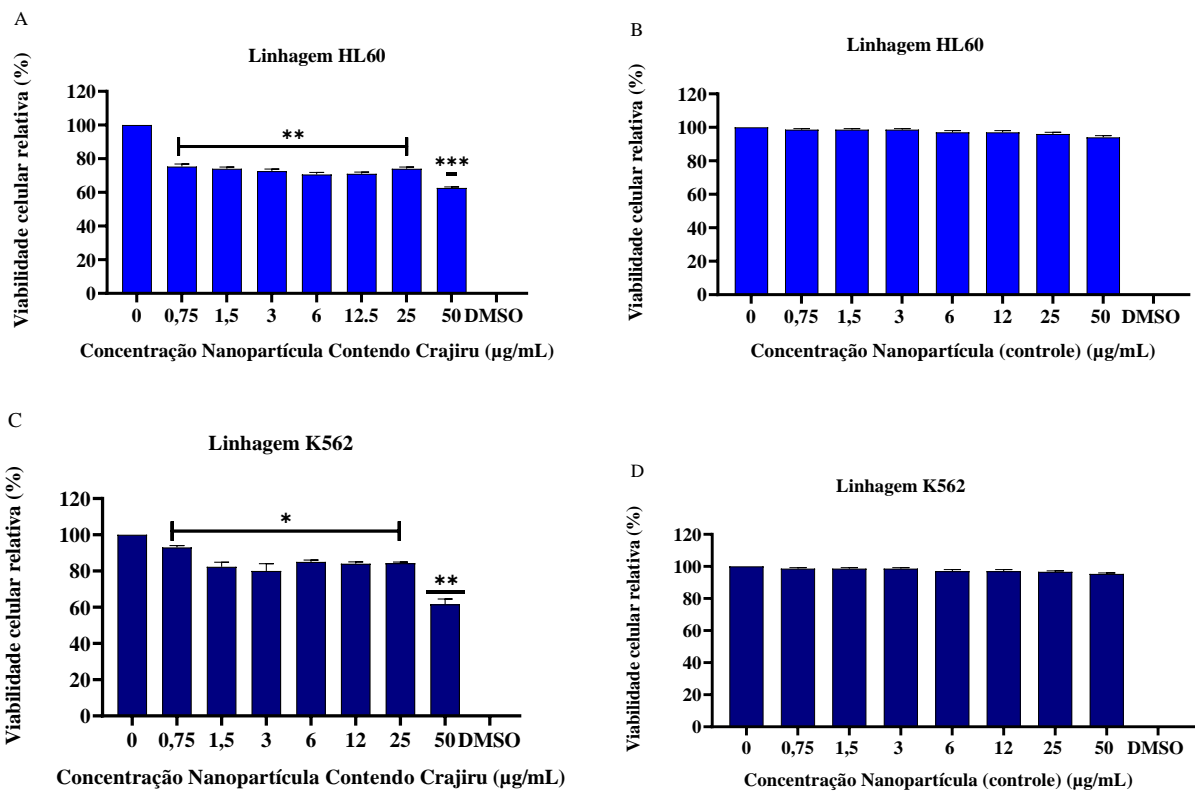


Figura 10: Efeito da nanopartícula de bismuto (Bi-MES) e seu ligante (MES) na formação de colônias de células leucêmicas HL60. Quantificação de colônias formadas por células HL60 após o tratamento com a concentração de 0,37 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de Bi-MES (A) e MES (C). Imagem de microscopia óptica representativa (40x) retrata a formação da colônia para células HL60 após tratamento com BI-MES (B) e MES (D). A significância estatística foi representada por asteriscos: **** $p < 0,0001$.

5.3 ATIVIDADE CITOTÓXICA DAS NANOPARTÍCULAS CONTENDO CRAJIRU

Os resultados demonstraram que a nanopartícula contendo crajiru (nanopartícula-CRJ) apresentou atividade citotóxica significativa contra a linhagem celular HL60 em todas as concentrações testadas (0,75 a 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$; $p < 0,01$) no período de tratamento de 24 horas, em comparação ao controle (células não-tratadas) (**Figura 11.A**).

Em relação a linhagem K562, a nanopartícula-CRJ apresentou atividade citotóxica significativa nas concentrações de 0,75 a 0,25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ($p = 0,05$) e 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ($p = 0,01$) (**Figura 11.C**). A Nanopartícula (controle) não apresentou atividade citotóxica tanto na linhagem HL60 quanto na K562 nas mesmas concentrações testadas (**Figura 11.B e D**). Tanto a nanopartícula-CRJ como o controle (nanopartícula) não apresentaram atividade citotóxica significativa contra células não cancerígenas Vero (**Figura 11.E e F**) e PBMCs humanas (**Figura 11.G e H**). A ausência de atividade citotóxica em células não cancerígenas (em todas as concentrações testadas) demonstra seletividade da atividade citotóxica da nanopartícula-CRJ contra células cancerígenas.



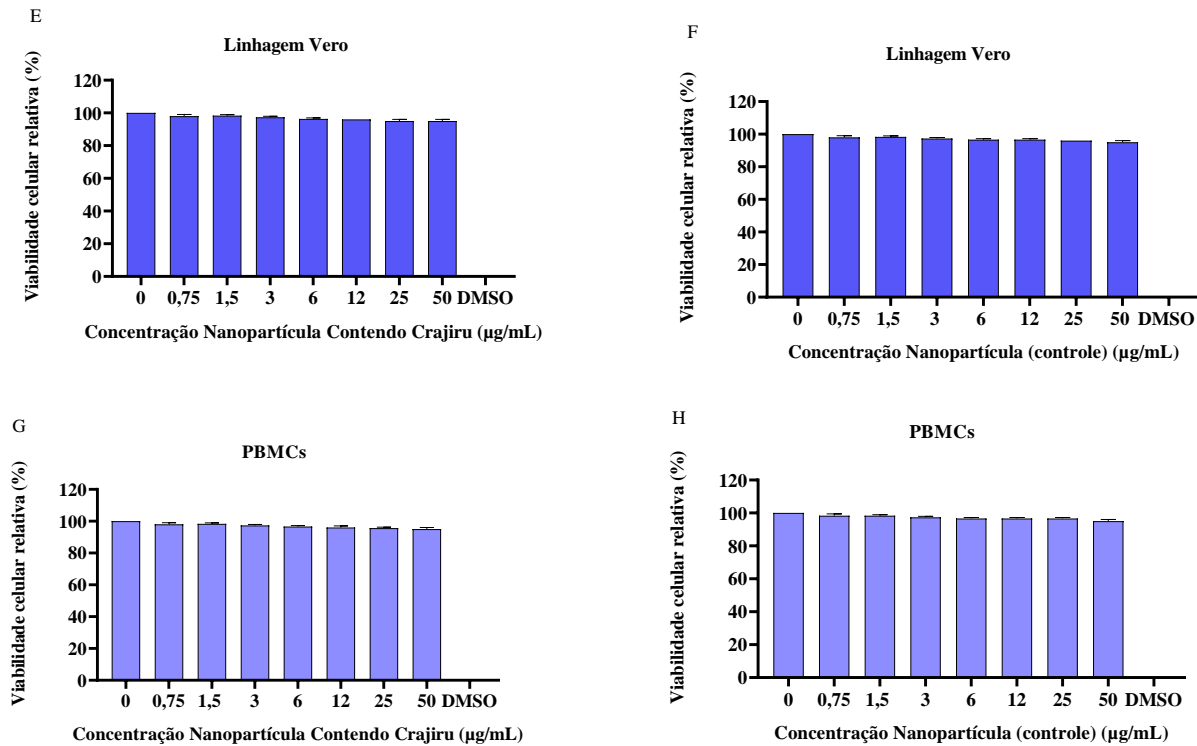


Figura 11: Atividade citotóxica da nanopartícula contendo Crajiru. Células HL60 (A) e K562 (C) tratadas nas concentrações de 0,75-50µg/mL com a nanopartícula-CRJ no período de tempo de 24h. Células HL60 (B) e K562 (D) tratadas nas concentrações de 0,75-50µg/mL com a nanopartícula (controle), no período de tempo de 24h. Células Vero (E) e PBMCs (G) humanas tratadas com a nanopartícula-CRJ, e da nanopartícula controle (F e H), respectivamente. A análise estatística realizada através do ANOVA. *: indica diferença significativa em comparação ao controle (células não tratadas), sendo: * $p < 0.05$. ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

5.4 ANÁLISE DE FORMAÇÃO DE COLÔNIAS NANOPARTÍCULAS CONTENDO CRAJIRU

Para a nanopartícula-CRJ, os resultados obtidos indicaram uma diminuição significativa de aproximadamente 93,95% na formação de colônias em células HL60 na concentração de 25 µg/mL e de 100% na concentração de 50 µg/mL (**Figuras 12.A e 12.B**) quando comparada ao controle (células não tratadas). Já em células K562, foi observada uma inibição completa na formação de colônias já na concentração de 25 µg/mL em comparação com células não tratadas ($p < 0,0001$). Além disso, assim como aconteceu com as nanopartículas de bismuto, os tamanhos das colônias foram reduzidos após o tratamento com a nanopartícula-CRJ (**Figuras 12.C e 12.D**).

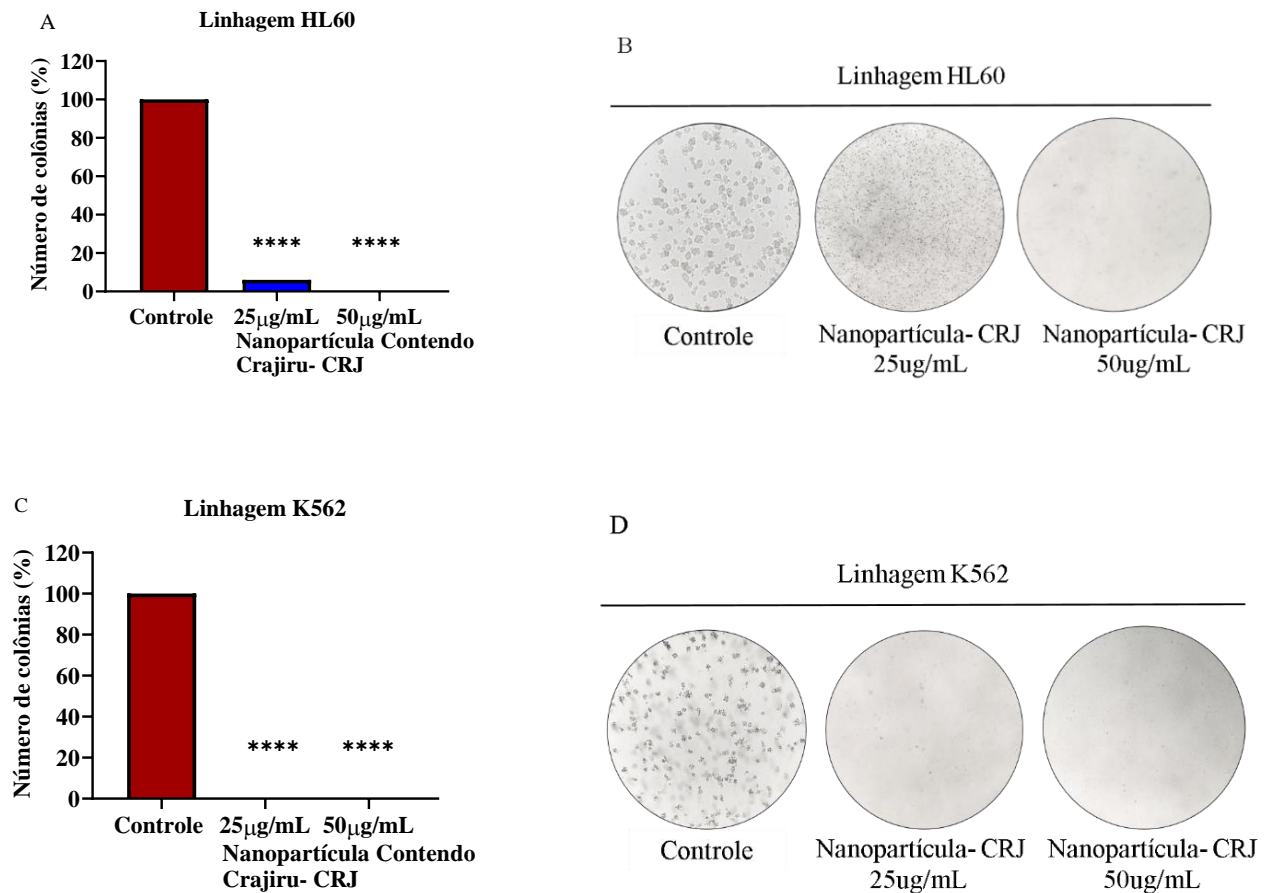


Figura 9: Efeito da nanopartícula contendo cajúru na formação de colônias de células leucêmicas HL60 e K562. Quantificação de colônias formadas por células HL60 após o tratamento com a nanopartícula-CRJ, em suas respectivas concentrações 25µg/mL e 50µg/mL (A) e (C). Imagem de microscopia óptica representativa retrata a formação da colônia para células HL60 e K562 (B) e (D). A significância estatística foi representada por asteriscos; **** $p < 0,0001$.

5.5 ATIVIDADE IMUNOMODULADORA DA NANOPARTÍCULAS CONTENDO CRAJIRU

Os resultados demonstraram que a nanopartícula-CRJ (12µg/mL) estimulou de forma significativa a produção das citocinas IL-6 ($p=0.0002$), IL-10 ($p=0.0005$), IL-12 ($p=0.001$) e TNF- α ($p=0.005$) em PBMCs humano após 24 horas de tratamento com a nanopartícula CRJ (12µg/mL) em comparação com PBMCs não tratadas (controle) (**Figura 13**). Dentre as citocinas dosadas, a IL-6 apresentou concentração mais elevada pós-tratamento com a nanopartícula-CRJ. Estes resultados sugerem que a nanopartícula-CRJ possui potencial para modular a resposta imunológica.

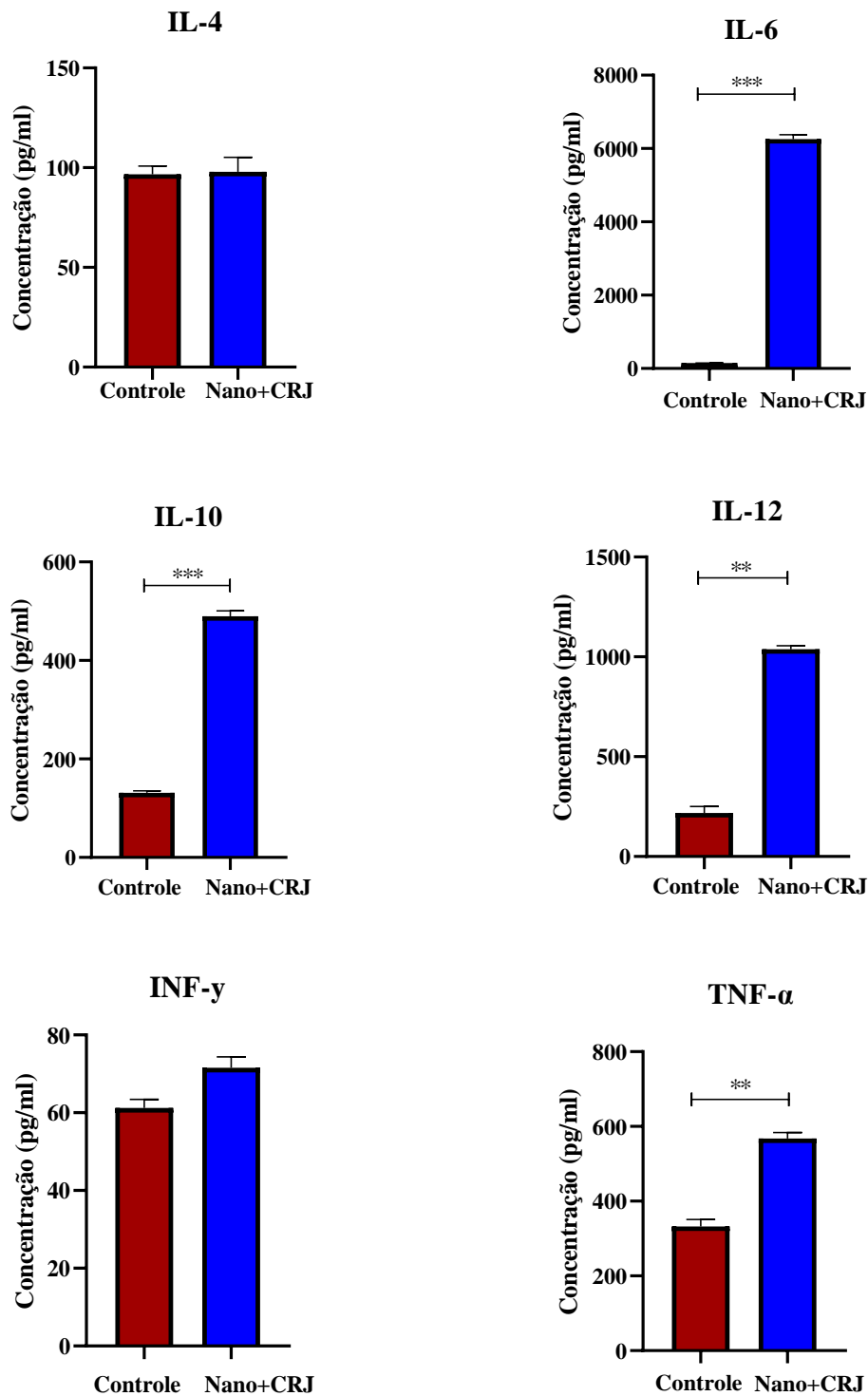


Figura 10: Atividade imunomoduladora da nanopartícula contendo o Crajiru(nano+CRJ). Os níveis das citocinas IL4, IL6, IL10, IL12, IFN γ e TNF α foram dosados do sobrenadante de PBMCs humanas tratadas com a concentração de 12 μ g/mL do a nanopartícula-CRJ por ELISA. A análise estatística realizada através do ANOVA. **: indica diferença significativa em comparação ao grupo controle, sendo: $p < 0.005$, *** $p < 0.0005$, **** $p < 0.0002$ e ** $p < 0.001$.

6 DISCUSSÃO

Nanopartículas têm sido estudadas como uma opção para o tratamento de leucemia, apresentando vantagens como baixa toxicidade e superação da resistência aos quimioterápicos (16, 15). Neste estudo, avaliou-se a atividade citotóxica e imunomoduladora *in vitro* das nanopartículas de bismuto e das contendo cajiru e contra linhagens celulares de Leucemia mieloide.

A nanopartícula de bismuto (Bi-MES) demonstrou atividade citotóxica significativa contra as células K562 e HL60 em todas as concentrações avaliadas. Por outro lado, o ligante MES (controle) apresentou atividade citotóxica apenas na concentração de 3 µg/ml na linhagem K562 e nas concentrações de 0,37 µg/ml e 1,5 µg/ml na linhagem HL60. Embora tenha sido observada atividade citotóxica da nanopartícula de bismuto em células Vero, essa atividade foi menor em comparação com a linhagem cancerígena HL60 e K562.

Entre os diversos metais pesados, o bismuto é considerado menos tóxico para o organismo humano (15, 16). Além disso, o bismuto é um metal que é estável em pH muito baixo. Isso significa que em pH mais alto, como o encontrado em condições biológicas normais, o bismuto pode se tornar citotóxico para as células humanas (116). No entanto, a estratégia de utilizar nanopartículas de bismuto permite que esse metal seja usado em pH mais alto, otimizando as concentrações necessárias para obter um efeito biológico. Ou seja, o bismuto na forma de nanopartícula, pode ser entregue às células em um pH fisiológico apresentando citotoxicidade para células cancerígenas ao mesmo passo que gera um menor dano às células saudáveis (15, 16).

Vale ressaltar que as nanopartículas de bismuto têm a capacidade de serem oxidadas e dissolvidas em íons de bismuto em pH baixo devido aos íons de bismuto estarem totalmente hidratados e estáveis em condições ácidas. Isso implica que o microambiente ácido do câncer, que geralmente possui um pH entre 6,4 e 7,2, pode induzir a biodegradação das nanopartículas de bismuto (116). Essa característica é relevante do ponto de vista terapêutico, porque a degradação das nanopartículas de bismuto no microambiente do câncer pode permitir que os íons de bismuto exerçam seus efeitos no combate ao câncer. Portanto, a biodegradação das nanopartículas de bismuto em íons de bismuto no microambiente ácido do câncer é uma propriedade vantajosa para aplicações terapêuticas específica (116).

Em relação a atividade antineoplásica antitumoral do bismuto, são exemplos os compostos de tropolonas e ditiocarbamatos de bismuto (III), que apresentam efeito citotóxico descrito contra células leucemia L1210 e células leucêmicas promielocíticas humanas (LPA)(18). Em um estudo anterior, avaliou-se nanopartículas de óxido de bismuto (III), as quais apresentam um grande potencial para aplicações biomédicas devido às suas propriedades físico-químicas ajustáveis (117). Em nosso estudo não foi possível realizar os testes de apoptose para analisar o mecanismo de ação das nanopartículas de bismuto. Entretanto, estudos apontam que a atividade citotóxica do bismuto, como a observada em nosso estudo, está relacionada principalmente ao seu mecanismo de inibição de enzimas lipases, glicosidasas e a produção de espécies reativas de oxigênio (EROS) que causam danos à membrana das mitocôndrias (118, (119).

No estudo de Hernandez-Delgadillo et al. (2018), observaram que NPs lipofílicos de bismuto (BisBAL) exibem citotoxicidade significativa para células MCF-7 de câncer de mama e toxicidade relativamente baixa para células MCF-10A não cancerígenas (120). Em um outro estudo Ahmed et al. (2021) observaram que nanopartícula de óxido de bismuto (III) (Bi_2O_3 NPs) apresentaram citotoxicidade significativa para células de câncer de pulmão (A549) e de fígado (HepG2). Enquanto nas células não cancerígenas de hepatócitos primário não foi apresentada atividade citotóxica demonstrando a seletividade da nanopartícula de óxido de bismuto (III) (117).

Em nosso estudo encontramos resultados semelhantes uma vez que foi observado que a nanopartícula de bismuto teve um impacto significativo na redução da viabilidade das células cancerígenas K562 e, principalmente, nas células HL60, além de apresentarem menor citotoxicidade em relação às células não cancerígenas Vero. Foi observado que o tratamento com a nanopartícula de bismuto teve um efeito significativo na inibição e redução da formação de colônias nas células HL60. Esses resultados indicam que as nanopartículas de bismuto têm um potencial efeito inibitório na expansão clonal de células cancerígenas. Infelizmente, devido às limitações da quantidade de nanopartículas de bismuto, não foi possível avaliar a atividade citotóxica em PBMC humano. No entanto, testes adicionais serão realizados pelo nosso grupo de pesquisa posteriormente para melhor caracterizar a atividade citotóxica desta nanopartícula.

Neste estudo, também foram avaliadas as atividades citotóxicas de nanopartículas contendo Crajiru (nanopartícula -CRJ). Estudos têm mostrado a eficácia terapêutica dos extratos de *F. chica*, com atividade antiviral, cicatrizante, anti-inflamatória e antitumoral descrita contra várias linhagens celulares tais como ACC-62 (melanoma), NCI-h460 (pulmão),

PC-3 (próstata), HT29 (cólon), OVCAR-03 (ovário), 786-0 (rim) e K562 (leucemia mieloide crônica) (20, 21, 121).

O estudo realizado por Servat-Medina L et al. (2015) foi demonstrado que o uso de NPs carregadas com o extrato de *A. chica* mostrou uma redução do índice de lesão ulcerativa em doses mais baixas em comparação com o uso do extrato livre. Isso indica que encapsular o extrato em NPs de quitosana permitiu uma redução da dose necessária para alcançar o efeito gastroprotetor desejado. Além disso, o estudo mostrou que as NPs contendo o extrato de *A. chica* (AcE-NPs) apresentaram um comportamento distinto quando comparadas ao extrato livre. Elas foram capazes de manter a concentração efetiva em níveis mais baixos, demonstrando a capacidade de preservar a atividade do composto bioativo mesmo em concentrações reduzidas. Por outro lado, em concentrações mais elevadas, as AcE-NPs estimularam a proliferação celular, evidenciando uma associação positiva entre a nanotecnologia e a fitoterapia no que diz respeito à atividade proliferativa (122).

Em nosso estudo as nanopartículas-CRJ apresentaram uma ação citotóxica seletiva, demonstrando atividade citotóxica nas células cancerígenas HL60 e K562, mas sem afetar as células não cancerígenas Vero e PBMC. Esse resultado é de extrema importância, pois indica que as nanopartículas-CRJ têm potencial para combater especificamente as células cancerígenas, sem prejudicar as células saudáveis. Além disso, as nanopartículas CRJ apresentaram um efeito inibitório significativo na formação e redução do tamanho de colônias de células HL60 e K562. Sugerindo que a nanopartícula-CRJ pode ter um efeito inibitório no crescimento e na proliferação das células cancerígenas.

Durante o desenvolvimento do câncer, é comum que ocorra uma supressão do sistema imunológico (123). No entanto, isso pode ser alterado por meio de drogas imunomoduladoras que têm se mostrado promissoras no combate à doença (123). Compostos que influenciam o sistema imune, seja através da supressão ou do estímulo à resposta imune são considerados os mais eficazes no tratamento do câncer (124). Assim, é evidente que o sistema imunológico desempenha um papel ativo na carcinogênese e, portanto, é um importante aliado no combate à doença (125).

Neste estudo, investigamos o potencial imunomodulador das nanopartículas-CRJ. Infelizmente, não foi possível avaliar a atividade imunomoduladora das nanopartículas de bismuto devido à limitação de sua quantidade necessária para os testes imunológicos. Os

resultados para as nanopartículas CRJ indicaram que o composto foi capaz de estimular a produção das citocinas IL-6, IL-10, IL-12/23p40 e TNF- α em PBMCs humanas.

A IL-6 tem uma função antitumoral importante, pois estimula a ativação, proliferação e sobrevivência de linfócitos T, além de induzir sua migração para os linfonodos e para o microambiente tumoral, onde podem exercer sua ação citotóxica contra as células cancerígenas (126, 127). Dessa forma, a sinalização da IL-6 pode remodelar a resposta imune dos linfócitos T, transformando-a de imunossupressora para responsiva, o que contribui para o controle da progressão do câncer (126). No entanto, dentro do microambiente tumoral, a IL-6 também pode agir promovendo a progressão do câncer e a metástase (128, 129). Portanto, a função da sinalização da IL-6 relacionada à carcinogênese pode depender de diversos fatores, como o tipo de linhagem celular, a localização e a gravidade do câncer (130).

A IL-10 é uma citocina com perfil anti-inflamatório que exerce um papel fundamental na regulação do microambiente tumoral(131). Esta citocina é responsável por regular diversos fatores pró-inflamatórios e pode favorecer a regressão do tumor, uma vez que aumenta a citotoxicidade de células T CD8+ no microambiente tumoral (131). Além disso, os resultados indicaram um aumento significativo nos níveis de IL-12/23p40 e TNF- α após o tratamento com as nanopartículas CRJ. A IL-12/23p40 são citocinas pleiotrópicas e essenciais na resposta imune contra o câncer, por meio da regulação de células *Natural Killer* e linfócitos T CD8+ do tipo Th1 (132, 120). Já a TNF- α desempenha importante função na vigilância do crescimento tumoral e é alvo de estudos de imunoterapias anticâncer (121, 122).

Em resumo, os resultados deste estudo indicam que tanto as nanopartículas de bismuto quanto as de contendo cajiru apresentam potencial anticancerígeno, sem causar citotoxicidade significativa em células não cancerosas nas concentrações testadas. Além disso, a nanopartícula contendo cajiru demonstra uma atividade imunomoduladora promissora, tornando-se uma possível aliada terapêutica no contexto das leucemias mieloides. No entanto, são necessários estudos adicionais para compreender melhor os mecanismos de ação e a segurança das nanopartículas de bismuto e as de contendo cajiru.

7 LIMITAÇÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS

Neste estudo, enfrentamos algumas dificuldades que impediram a realização de testes adicionais para uma melhor caracterização do potencial antineoplásico das nanopartículas. Entre elas, destaca-se a impossibilidade de realizar a análise da fase específica do ciclo celular em que atuam para induzir a apoptose em células cancerosas. As dificuldades encontradas incluíram atrasos no envio das nanopartículas de bismuto provenientes da Universidade Helsinque para Manaus, (principalmente durante o período pandêmico). Além disso, a limitação na quantidade disponível da nanopartícula de bismuto impossibilitou a realizações de vários testes.

Para uma caracterização mais abrangente do potencial das nanopartículas de bismuto e da contendo crajiru, são necessários outros testes, tais como ensaios de COX para avaliar sua atividade anti-inflamatória, ensaio de apoptose para avaliar sua capacidade de induzir a morte celular programada, e ensaios de expressão gênica para avaliar sua capacidade de modular a expressão de genes relacionados à progressão do câncer e resistência aos tratamentos. Além disso, são necessárias a utilização das técnicas de microscopia de varredura eletrônica de transmissão (TEM) e de varredura (SEM) para a obtenção de imagens de alta resolução das nanopartículas em diversos níveis de detalhamento. Essas imagens permitiriam a análise da morfologia, tamanho, distribuição e localização celular das nanopartículas, possibilitando a avaliação da eficácia da entrega das nanopartículas no local-alvo, bem como sua capacidade de penetrar em tecidos e células específicas. Tais análises serão feitas em estudos posteriores realizados pelo no grupo de pesquisa.

Além disso, é imprescindível avaliar a atividade antineoplásica dessas nanopartículas em outros tipos de neoplasia hematológicas, como leucemia linfóide aguda e crônica. Esses testes adicionais fornecerão informações cruciais sobre o potencial terapêutico dessas nanopartículas em diferentes tipos de leucemia, bem como sua possível aplicação clínica.

8 CONCLUSÕES

- As nanopartículas contendo cajuru e as nanopartículas de bismuto apresentaram atividade citotóxica significativa contra as células leucêmicas da linhagem mielóide, enquanto tiveram menor ou nenhuma toxicidade em células não cancerígenas. O que sugere que as nanopartículas utilizadas neste estudo apresentam potencial terapêutico no tratamento da leucemia mielóide.
- Tanto as nanopartículas contendo cajuru quanto as de bismuto apresentaram atividade inibitória na expansão clonal de células cancerígenas, demonstrando seu efeito inibitório no crescimento e proliferação clonal.
- As nanopartículas contendo cajuru estimularam a produção de citocinas (IL-6, IL-10, IL-12/23p40 e TNF- α) em PBMC humano, indicando um potencial imunomodulador.
- Os resultados destacam a relevância das nanopartículas de bismuto e cajuru como possíveis agentes eficazes no tratamento da leucemia, com perspectivas promissoras para futuras pesquisas e desenvolvimento de tratamentos anticancerígenos.
- Estudos adicionais são necessários para compreender melhor os mecanismos subjacentes às atividades anticancerígenas e imunomoduladoras observadas, bem como para avaliar melhor a eficácia e segurança das intervenções em modelos experimentais.

9 REFERÊNCIAS

1. Sampaio MM, Santos MLC, Marques HS, Gonçalves VL de S, Araújo GRL, Lopes LW, et al. Chronic myeloid leukemia-from the Philadelphia chromosome to specific target drugs: A literature review. *World J Clin Oncol*. 24 de fevereiro de 2021;12(2):69–94.
2. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Thiele J, Borowitz MJ, Le Beau MM, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*. 19 de maio de 2016;127(20):2391–405.
3. Morales C, Cárdenas VT. Leucemia mieloide crônica: diagnóstico y tratamiento. 2010;13.
4. Hoffbrand AV, Moss PHA. Fundamentos em hematologia. 6. ed. Porto Alegre: Artmed;2018.
5. French-American-British Classification - an overview | ScienceDirect Topics [Internet]. [citado 21 de outubro de 2021]. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/topics/medicine-and-dentistry/french-american-british-classification>
6. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*. novembro de 2018;68(6):394–424.
7. INCA. Estimativa 2020. Incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: [s.n.].
8. de Souza Reis R, de Camargo B, de Oliveira Santos M, de Oliveira JM, Azevedo Silva F, Pombo-de-Oliveira MS. Childhood leukemia incidence in Brazil according to different geographical regions. *Pediatr Blood Cancer*. janeiro de 2011;56(1):58–64.
9. Reis R de S, Santos M de O, de Camargo B, Oliveira JFP, Thuler LCS, Pombo-de-Oliveira MS. Early childhood leukemia incidence trends in Brazil. *Pediatr Hematol Oncol*. março de 2016;33(2):83–93.
10. McNeil SE. Nanoparticle therapeutics: a personal perspective. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol*. junho de 2009;1(3):264–71.
11. Buenz EJ, Verpoorte R, Bauer BA. The Ethnopharmacologic Contribution to Bioprospecting Natural Products. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 6 de janeiro de 2018;58:509–30.
12. Hill B. Drug resistance. *Int J Oncol*. 1º de agosto de 1996;9(2):197–203.
13. Mitscher LA, Pillai SP, Gentry EJ, Shankel DM. Multiple drug resistance. *Med Res Rev*. novembro de 1999;19(6):477–96.
14. Bharali DJ, Siddiqui IA, Adhami VM, Chamcheu JC, Aldahmash AM, Mukhtar H, et al. Nanoparticle Delivery of Natural Products in the Prevention and Treatment of Cancers: Current Status and Future Prospects. *Cancers*. 26 de outubro de 2011;3(4):4024–45.

15. Soni G, Yadav KS. Applications of nanoparticles in treatment and diagnosis of leukemia. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. fevereiro de 2015;47:156–64.
16. Pérez-Herrero E, Fernández-Medarde A. Advanced targeted therapies in cancer: Drug nanocarriers, the future of chemotherapy. *Eur J Pharm Biopharm*. 1º de junho de 2015;93:52–79.
17. Tiekink ERT. Antimony and bismuth compounds in oncology. *Crit Rev Oncol Hematol*. junho de 2002;42(3):217–24.
18. Tiekink ERT. Antimony and bismuth compounds in oncology. *Crit Rev Oncol Hematol*. junho de 2002;42(3):217–24.
19. Lima JCS, de Oliveira RG, Silva VC, de Sousa PTJr, Violante IMP, Macho A et al. Anti-inflammatory activity of 4',6,7-trihydroxy-5-methoxyflavone from *Fridericia chica* (Bonpl.) LG Lohmann. *Nat Prod Res* 2020;34:726- 730. doi:10.1080/14786419.2018.1495636.
20. Batalha ADSJ, Souza DCM, Ubiera RD, Chaves FCM, Monteiro WM, da Silva FMA, Koolen HHF, Boechat AL, Sartim MA. Therapeutic Potential of Leaves from *Fridericia chica* (Bonpl.) L. G. Lohmann: Botanical Aspects, Phytochemical and Biological, Anti-Inflammatory, Antioxidant and Healing Action. *Biomolecules*. 2022 Aug 31;12(9):1208. doi: 10.3390/biom12091208. PMID: 36139047; PMCID: PMC9496332.
21. Moragas-Tellis CJ, Almeida-Souza F, Chagas M, Souza PVR, Silva-Silva JV, Ramos YJ et al. The Influence of anthocyanidin profile on antileishmanial activity of *Arrabidaea chica* morphotypes. *Molecules* 2020;25. doi:10.3390/molecules 25153547.
22. Velpeau A. Sur la résorption du pus et sur l'altération du sang dans les malades. *Rev Med (Paris)*. 1827;2:216-218.
23. Piller G. Leukaemia - a brief historical review from ancient times to 1950. *Br J Haematol*. fevereiro de 2001;112(2):282–92.
24. Dreyfus C. Some milestones in the history of hematology. New York: Grune and Stratton 1957; 55.
25. Bennett JH. A case of hypertrophy of the spleen and liver in which death due to blood suppuration occurred. *Edinb Med Surg J*. 1845; 64: 413-423.
26. Virchow R . Weisses blut. *Notizen de Froriep*. 1845; 36 : 151-156.
27. GOODMAN LS, WINTROBE MM, DAMESHEK W, GOODMAN MJ, GILMAN A, McLENNAN MT. NITROGEN MUSTARD THERAPY: Use of Methyl-Bis(Beta-Chloroethyl)amine Hydrochloride and Tris(Beta-Chloroethyl)amine Hydrochloride for Hodgkin's Disease, Lymphosarcoma, Leukemia and Certain Allied and Miscellaneous Disorders. *J Am Med Assoc*. 21 de setembro de 1946;132(3):126–32.
28. Biliéri FR, Gavinho B. A IMUNOTERAPIA PARA O TRATAMENTO DA LEUCEMIA. *Rev UNIANDE*. 30 de setembro de 2019;20(2):53–68.

29. Feynman R. There's Plenty of Room at the Bottom. Em: Feynman and Computation. CRC Press; 2002.
30. Bangham AD, Standish MM, Watkins JC. Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. *J Mol Biol.* 1º de agosto de 1965;13(1):238-272.
31. Scheffel U, Rhodes BA, Natarajan TK, Wagner HN. Albumin microspheres for study of the reticuloendothelial system. *J Nucl Med Off Publ Soc Nucl Med.* julho de 1972;13(7):498-503.
32. Gradishar WJ, Tjulandin S, Davidson N, Shaw H, Desai N, Bhar P, et al. Phase III Trial of Nanoparticle Albumin-Bound Paclitaxel Compared With Polyethylated Castor Oil-Based Paclitaxel in Women With Breast Cancer. *J Clin Oncol.* 1º de novembro de 2005;23(31):7794-803.
33. Schwendener RA, Fiebig HH, Berger MR, Berger DP. Evaluation of incorporation characteristics of mitoxantrone into unilamellar liposomes and analysis of their pharmacokinetic properties, acute toxicity, and antitumor efficacy. *Cancer Chemother Pharmacol.* 1991;27(6):429-39.
34. Bross PF, Beitz J, Chen G, Chen XH, Duffy E, Kieffer L, et al. Approval summary: gemtuzumab ozogamicin in relapsed acute myeloid leukemia. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* junho de 2001;7(6):1490-6.
35. Dinndorf PA, Gootenberg J, Cohen MH, Keegan P, Pazdur R. FDA drug approval summary: pegaspargase (oncaspar) for the first-line treatment of children with acute lymphoblastic leukemia (ALL). *The Oncologist.* agosto de 2007;12(8):991-8.
36. Harrison TS, Lyseng-Williamson KA. Vincristine Sulfate Liposome Injection. *BioDrugs.* 1º de fevereiro de 2013;27(1):69-74.
37. Krauss AC, Gao X, Li L, Manning ML, Patel P, Fu W, et al. FDA Approval Summary: (Daunorubicin and Cytarabine) Liposome for Injection for the Treatment of Adults with High-Risk Acute Myeloid Leukemia. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 1º de maio de 2019;25(9):2685-90.
38. Tebbi CK. Etiology of Acute Leukemia: A Review. *Cancers.* janeiro de 2021;13(9):2256.
39. Stieglitz E, Loh ML. Genetic predispositions to childhood leukemia. *Ther Adv Hematol.* agosto de 2013;4(4):270-90.
40. De Kouchkovsky I, Abdul-Hay M. "Acute myeloid leukemia: a comprehensive review and 2016 update". *Blood Cancer J.* 1º de julho de 2016;6(7):e441.
41. Abreu GM, Sousa SC de, Gomes EV. Leucemia Linfóide e Mieloide: Uma breve revisão narrativa / Lymphoid and Myeloid Leukemia: A brief narrative review. *Braz J Dev.* 13 de agosto de 2021;7(8):80666-81.
42. Meenaghan T, Dowling M, Kelly M. Acute leukaemia: making sense of a complex blood cancer. *Br J Nurs Mark Allen Publ.* 26 de fevereiro de 2012;21(2):76, 78-83.

43. Gralnick HR, Galton D a. G, Catovsky D, Sultan C, Bennett JM. Classification of Acute Leukemia. *Ann Intern Med.* 1º de dezembro de 1977;87(6):740–53.
44. SEER [Internet]. [citado 24 de setembro de 2021]. Leukemia - Cancer Stat Facts. Disponível em: <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/leuks.html>
45. Noone A , Howlader N , Krapcho M , Miller D , Brest A , Yu M , Ruhl J , Tatalovich Z , Mariotto A , Lewis D , et al. SEER Cancer Statistics Review, 1975 - 2015 . Instituto Nacional do Câncer , Bethesda , Maryland. 2017.
46. Bispo JAB, Pinheiro PS, Kobetz EK. Epidemiology and Etiology of Leukemia and Lymphoma. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 1º de junho de 2020;10(6):a034819.
47. Siegel DA, Henley SJ, Li J, Pollack LA, Dyne EAV, White A. Rates and Trends of Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia — United States, 2001–2014. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 15 de setembro de 2017;66(36):950.
48. Gouveia M de S, Batista JKM, Passos TS, Prado BS, Siqueira CE, Almeida-Santos MA. Comparison of factors associated with leukemia and lymphoma mortality in Brazil. *Cad Saúde Pública* [Internet]. 3 de agosto de 2020 [citado 24 de setembro de 2021];36. Disponível em: <http://www.scielo.br/j/csp/a/xLqHBXqZPR4WGkRSxWcctyb/?lang=en>
49. Silva-Junior AL, Alves FS, Kerr MWA, Xabregas LA, Gama FM, Rodrigues MGA, et al. Acute lymphoid and myeloid leukemia in a Brazilian Amazon population: Epidemiology and predictors of comorbidity and deaths. *PloS One.* 2019;14(8):e0221518.
50. Ho MSH, Medcalf RL, Livesey SA, Traianedes K. The dynamics of adult haematopoiesis in the bone and bone marrow environment. *Br J Haematol.* agosto de 2015;170(4):472–86.
51. Rose-Inman H, Kuehl D. Acute Leukemia. *Emerg Med Clin North Am.* 1º de agosto de 2014;32(3):579–96.
52. Lyengar, V., & Shimanovsky, A. (2021). Leukemia. In *StatPearls*. StatPearls Publishing.
53. Ma Y, Dobbins SE, Sherborne AL, Chubb D, Galbiati M, Cazzaniga G, et al. Developmental timing of mutations revealed by whole-genome sequencing of twins with acute lymphoblastic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 30 de abril de 2013;110(18):7429–33.
54. Moorman AV, Ensor HM, Richards SM, Chilton L, Schwab C, Kinsey SE, et al. Prognostic effect of chromosomal abnormalities in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia: results from the UK Medical Research Council ALL97/99 randomised trial. *Lancet Oncol.* maio de 2010;11(5):429–38.
55. Kang ZJ, Liu YF, Xu LZ, Long ZJ, Huang D, Yang Y, et al. The Philadelphia chromosome in leukemogenesis. *Chin J Cancer.* 27 de maio de 2016;35:48.
56. INCA - Instituto Nacional de Câncer [Internet]. 2018 [citado 24 de setembro de 2021]. Leucemia. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/leucemia>
57. Severson C. Hematologic Malignancies in Adults. *Can Oncol Nurs J.* 1º de maio de 2016;26(2):177.

58. Jabbour E, Cortes JE, Kantarjian HM. Molecular monitoring in chronic myeloid leukemia: response to tyrosine kinase inhibitors and prognostic implications. *Cancer*. 15 de maio de 2008;112(10):2112–8.
59. Hills RK, Castaigne S, Appelbaum FR, Delaunay J, Petersdorf S, Othus M, et al. Addition of gemtuzumab ozogamicin to induction chemotherapy in adult patients with acute myeloid leukaemia: a meta-analysis of individual patient data from randomised controlled trials. *Lancet Oncol*. 1º de agosto de 2014;15(9):986–96.
60. Bolin RW, Robinson WA, Sutherland J, Hamman RF. Busulfan versus hydroxyurea in long-term therapy of chronic myelogenous leukemia. *Cancer*. 1982;50(9):1683–6.
61. Blackburn LM, Bender S, Brown S. Acute Leukemia: Diagnosis and Treatment. *Semin Oncol Nurs*. 1º de dezembro de 2019;35(6):150950.
62. Chronic lymphocytic leukemia: 2017 update on diagnosis, risk stratification, and treatment - Hallek - 2017 - American Journal of Hematology - Wiley Online Library [Internet]. [citado 25 de setembro de 2021]. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ajh.24826>
63. Rogers PC, Melnick SJ, Ladas EJ, Halton J, Baillargeon J, Sacks N. Children’s Oncology Group (COG) Nutrition Committee. *Pediatr Blood Cancer*. 2008;50(S2):447–50.
64. Adebayo IA, Usman AI, Shittu FB, Ismail NZ, Arsad H, Muftaudeen TK, Samian MR. Boswellia dalzielii-Mediated Silver Nanoparticles Inhibited Acute Myeloid Leukemia (AML) Kasumi-1 Cells by Inducing Cell Cycle Arrest. *Bioinorg Chem Appl*. 2020 Sep 22;2020:8898360. doi: 10.1155/2020/8898360. PMID: 33029114; PMCID: PMC7528135.
65. Bodet-Milin C, Kraeber-Bodéré F, Eugène T, Guérard F, Gaschet J, Bailly C, et al. Radioimmunotherapy for Treatment of Acute Leukemia. *Semin Nucl Med*. 1º de março de 2016;46(2):135–46.
66. Safety of Yttrium-90 Ibritumomab Tiuxetan Radioimmunotherapy for Relapsed Low-Grade, Follicular, or Transformed Non-Hodgkin’s Lymphoma | Journal of Clinical Oncology [Internet]. [citado 29 de setembro de 2021]. Disponível em: <https://ascopubs.org/doi/10.1200/JCO.2003.08.043>
67. Tan S, Li D, Zhu X. Cancer immunotherapy: Pros, cons and beyond. *Biomed Pharmacother*. 1º de abril de 2020;124:109821.
68. Kroschinsky F, Stölzel F, von Bonin S, Beutel G, Kochanek M, Kiehl M, et al. New drugs, new toxicities: severe side effects of modern targeted and immunotherapy of cancer and their management. *Crit Care*. 14 de abril de 2017;21(1):89.
69. Svenberg P, Remberger M, Svenilsson J, Mattsson J, Leblanc K, Gustafsson B, et al. Allogenic stem cell transplantation for nonmalignant disorders using matched unrelated donors. *Biol Blood Marrow Transplant*. 1º de dezembro de 2004;10(12):877–82.
70. Longley D, Johnston P. Molecular mechanisms of drug resistance. *J Pathol*. 2005;205(2):275–92.

71. Kartal-Yandim M, Adan-Gokbulut A, Baran Y. Molecular mechanisms of drug resistance and its reversal in cancer. *Crit Rev Biotechnol*. 3 de julho de 2016;36(4):716–26.
72. Huh HJ, Park CJ, Jang S, Seo EJ, Chi HS, Lee JH, et al. Prognostic Significance of Multidrug Resistance Gene 1 (MDR1), Multidrug Resistance-related Protein (MRP) and Lung Resistance Protein (LRP) mRNA Expression in Acute Leukemia. *J Korean Med Sci*. abril de 2006;21(2):253–8.
73. Follini E, Marchesini M, Roti G. Strategies to Overcome Resistance Mechanisms in T-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia. *Int J Mol Sci*. 20 de junho de 2019;20(12):3021.
74. Auberger P, Tamburini-Bonnefoy J, Puissant A. Drug Resistance in Hematological Malignancies. *Int J Mol Sci*. janeiro de 2020;21(17):6091.
75. Alfarouk KO, Stock CM, Taylor S, Walsh M, Muddathir AK, Verduzco D, et al. Resistance to cancer chemotherapy: failure in drug response from ADME to P-gp. *Cancer Cell Int*. 2015;15:71.
76. Krishna R, Mayer LD. Multidrug resistance (MDR) in cancer. Mechanisms, reversal using modulators of MDR and the role of MDR modulators in influencing the pharmacokinetics of anticancer drugs. *Eur J Pharm Sci Off J Eur Fed Pharm Sci*. outubro de 2000;11(4):265–83.
77. Vauthier C, Dubernet C, Chauvierre C, Brigger I, Couvreur P. Drug delivery to resistant tumors: the potential of poly(alkyl cyanoacrylate) nanoparticles. *J Control Release Off J Control Release Soc*. 5 de dezembro de 2003;93(2):151–60.
78. Kirtane AR, Kalscheuer SM, Panyam J. Exploiting nanotechnology to overcome tumor drug resistance: Challenges and opportunities. *Adv Drug Deliv Rev*. 30 de novembro de 2013;65(13):1731–47.
79. Bea DB, Tejada AP, Pardo AA, et al. Nanomedicine: general aspects of a promissory future. *R e v Habanera Cienc Méd*. 2011;10(3):410-21.
80. Farokhzad OC, Langer R. Impact of Nanotechnology on Drug Delivery. *ACS Nano*. 27 de janeiro de 2009;3(1):16–20.
81. Abriata JP, Eloy JO, Riul TB, Campos PM, Baruffi MD, Marchetti JM. Poly-epsilon-caprolactone nanoparticles enhance ursolic acid in vivo efficacy against *Trypanosoma cruzi* infection. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 1º de agosto de 2017;77:1196–203.
82. Hare JJ, Lammers T, Ashford MB, Puri S, Storm G, Barry ST. Challenges and strategies in anti-cancer nanomedicine development: An industry perspective. *Adv Drug Deliv Rev*. 1º de janeiro de 2017;108:25–38.
83. Asai T. Nanoparticle-mediated delivery of anticancer agents to tumor angiogenic vessels. *Biol Pharm Bull*. 2012;35(11):1855–61.
84. Hasan S. (2015). A review on nanoparticles: their synthesis and types. *Res. J. Recent Sci*. 4, 1–3. [Google Scholar].

85. Mendes R., Carreira B., Baptista P. V., Fernandes A. R. (2016). Non-small cell lung cancer biomarkers and targeted therapy – two faces of the same coin fostered by nanotechnology. *Expert Rev. Precis. Med. Drug Dev.* 1, 155–168. 10.1080/23808993.2016.1159914 [CrossRef] [Google Scholar] [Ref list].
86. Wang L, Wang Z, Cao L, Ge K. Constructive strategies for drug delivery systems in antiviral disease therapy by biosafety materials. *Biosaf Health.* 2022 Jun;4(3):161-170. doi: 10.1016/j.bshealth.2022.03.008. Epub 2022 Mar 11. PMID: 35291339; PMCID: PMC8912974.
87. G. Barratt Colloidal drug carriers: achievements and perspectives *Cell. Mol. Life Sci.*, 60 (2003), pp. 21-37.
88. Mundekkad D, Cho WC. Nanoparticles in Clinical Translation for Cancer Therapy. *Int J Mol Sci.* 2022 Feb 1;23(3):1685. doi: 10.3390/ijms23031685. PMID: 35163607; PMCID: PMC8835852.
89. ZnO Nanoparticles: A Promising Anticancer Agent - Gunjan Bisht, Sagar Rayamajhi, 2016 [Internet]. [citado 29 de setembro de 2021]. Disponível em: <https://journals.sagepub.com/doi/10.5772/63437>
90. Dual functions of silver nanoparticles in F9 teratocarcinoma stem cell | IJN [Internet]. [citado 29 de setembro de 2021]. Disponível em: <https://www.dovepress.com/dual-functions-of-silver-nanoparticles-in-f9-teratocarcinoma-stem-cell-peer-reviewed-fulltext-article-IJN>
91. Protein Nanoparticles as Drug Delivery Carriers for Cancer Therapy [Internet]. [citado 29 de setembro de 2021]. Disponível em: <https://www.hindawi.com/journals/bmri/2014/180549/>
92. Chung IM, Abdul Rahuman A, Marimuthu S, Vishnu Kirthi A, Anbarasan K, Rajakumar G. An Investigation of the Cytotoxicity and Caspase-Mediated Apoptotic Effect of Green Synthesized Zinc Oxide Nanoparticles Using *Eclipta prostrata* on Human Liver Carcinoma Cells. *Nanomaterials.* 12 de agosto de 2015;5(3):1317–30.
93. Lee MJ, Lee SJ, Yun SJ, Jang JY, Kang H, Kim K, et al. Silver nanoparticles affect glucose metabolism in hepatoma cells through production of reactive oxygen species. *Int J Nanomedicine.* 22 de dezembro de 2015;11:55–68.
94. Wong HL, Bendayan R, Rauth AM, Xue HY, Babakhanian K, Wu XY. A mechanistic study of enhanced doxorubicin uptake and retention in multidrug resistant breast cancer cells using a polymer-lipid hybrid nanoparticle system. *J Pharmacol Exp Ther.* junho de 2006;317(3):1372–81.
95. Khawar IA, Kim JH, Kuh HJ. Improving drug delivery to solid tumors: priming the tumor microenvironment. *J Control Release Off J Control Release Soc.* 10 de março de 2015;201:78–89.
96. Tomasina J, Lheureux S, Gauduchon P, Rault S, Malzert-Fréon A. Nanocarriers for the targeted treatment of ovarian cancers. *Biomaterials.* janeiro de 2013;34(4):1073–101.

97. Sriraman S. K., Aryasomayajula B., Torchilin V. P. (2014). Barriers to drug delivery in solid tumors. *Tissue Barriers* 2, e29528. 10.4161/tisb.29528 [PMC free article] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar] [Ref list].
98. Panyam J, Labhasetwar V. Sustained cytoplasmic delivery of drugs with intracellular receptors using biodegradable nanoparticles. *Mol Pharm*. 12 de janeiro de 2004;1(1):77–84.
99. Yadav KS, Sawant KK. Formulation optimization of etoposide loaded PLGA nanoparticles by double factorial design and their evaluation. *Curr Drug Deliv*. janeiro de 2010;7(1):51–64.
100. Yadav KS, Sawant KK. Modified Nanoprecipitation Method for Preparation of Cytarabine-Loaded PLGA Nanoparticles. *AAPS PharmSciTech*. 1º de setembro de 2010;11(3):1456–65.
101. Ahmad S, Isab AA, Ali S, Al-Arfaj AR. Perspectives in bioinorganic chemistry of some metal based therapeutic agents. *Polyhedron*. 8 de maio de 2006;25(7):1633–45.
102. Huang R, Wallqvist A, Covell DG. Anticancer metal compounds in NCI's tumor-screening database: putative mode of action. *Biochem Pharmacol*. 1º de abril de 2005;69(7):1009–39.
103. Marzano IM, Tomco D, Staples RJ, Lizarazo-Jaimes EH, Gomes DA, Bucciarelli-Rodriguez M, et al. Dual anticancer and antibacterial activities of bismuth compounds based on asymmetric [NN'O] ligands. *J Inorg Biochem*. setembro de 2021;222:111522.
104. Cabral-Romero C, Solís-Soto JM, Sánchez-Pérez Y, et al. Antitumor activity of a hydrogel loaded with lipophilic bismuth nanoparticles on cervical, prostate, and colon human cancer cells. *Anticancer Drugs*. 2020;31(3):251-259. doi:10.1097/CAD.0000000000000863.
105. Ribeiro AFC, Telles TC, Ferraz VP, Souza-Fagundes EM, Cassali GD, Carvalho AT et al. Effect of *Arrabidaea chica* extracts on the ehrlich solid tumor development. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 2012;22:364-373.
106. Rodrigues M, Muehlmann L, Longo J, Silva R, Graebner I, Degterev I, et al. Photodynamic Therapy Based on *Arrabidaea chica* (Crajiro) Extract Nanoemulsion: In vitro Activity against Monolayers and Spheroids of Human Mammary Adenocarcinoma MCF-7 Cells. *J Nanomedicine Nanotechnol*. 1º de janeiro de 2015;06.
107. Chen C, Lv G, Pan C, Song M, Wu C, Guo D, et al. Poly(lactic acid) (PLA) based nanocomposites—a novel way of drug-releasing. *Biomed Mater*. setembro de 2007;2(4):L1–4.
108. Fan L, Liu C, Hu A, Liang J, Li F, Xiong Y, et al. Dual oligopeptides modification mediates arsenic trioxide containing nanoparticles to eliminate primitive chronic myeloid leukemia cells inside bone marrow niches. *Int J Pharm*. 15 de abril de 2020;579:119179.
109. Yadav KS, Jacob S, Sachdeva G, Sawant KK. Intracellular Delivery of Etoposide Loaded Biodegradable Nanoparticles: Cytotoxicity and Cellular Uptake Studies. *J Nanosci Nanotechnol*. 1º de agosto de 2011;11(8):6657–67.

110. Longley D, Johnston P. Molecular mechanisms of drug resistance. *J Pathol.* 2005;205(2):275–92.
111. Kartal-Yandim M, Adan-Gokbulut A, Baran Y. Molecular mechanisms of drug resistance and its reversal in cancer. *Crit Rev Biotechnol.* 3 de julho de 2016;36(4):716–26.
112. Huh HJ, Park C-J, Jang S, Seo E-J, Chi H-S, Lee J-H, et al. Prognostic Significance of Multidrug Resistance Gene 1 (MDR1), Multidrug Resistance-related Protein (MRP) and Lung Resistance Protein (LRP) mRNA Expression in Acute Leukemia. *J Korean Med Sci.* abril de 2006;21(2):253–8.
113. FESSI, H.; PUISIEUX, F.; DEVISSAGUET, J.P.; AMMOURY, N.; BENITA, S. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. *Int. J. Pharm.*, v. 55, p. R1–R4, 1989.
114. FLORENTINO NETO, S., PRADA, A. L., ACHOD, L. D. R., TORQUATO, H. F. V., LIMA, C. S., PAREDES-GAMERO, E. J., T.P. SOUZA. AMADO, J. R. R. (2021). α -amyrin-loaded nanocapsules produce selective cytotoxic activity in leukemic cells. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 139, 111656.
115. Oliveira R, Pontes G, Kostyuk A, Camargo G, Dhyani A, Shvydenko T, et al. Anticancer and Immunomodulatory Activities of a Novel Water-Soluble Derivative of Ellipticine. *Molecules.* 1º de maio de 2020;25:2130.
116. Cuimei Liu, Lingyu Zhang, Xiangjun Chen, Shengnan Li, Qinghe Han, Lu Li, Chungang Wang, Biomolecules-assisted synthesis of degradable bismuth nanoparticles for dual-modal imaging-guided chemo-photothermal therapy, *Chemical Engineering Journal*, Volume 382, 2020, 122720, ISSN 1385-8947, <https://doi.org/10.1016/j.cej.2019.122720>. (<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1385894719321230>).
117. Ahamed M, Akhtar MJ, Khan MAM, Alaizeri ZM, Alhadlaq H. Facile Synthesis of Zn-Doped Bi₂O₃ Nanoparticles and Their Selective Cytotoxicity toward Cancer Cells. *ACS Omega.* 2021 Jun 29;6(27):17353-17361. doi: 10.1021/acsomega.1c01467. PMID: 34278121; PMCID: PMC8280700.
118. Huang R, Wallqvist A, Covell DG. Anticancer metal compounds in NCI's tumorscreening database: putative mode of action. *Biochem Pharmacol.* 1o de abril de 2005;69(7):1009–39.
119. Marzano IM, Tomco D, Staples RJ, Lizarazo-Jaimes EH, Gomes DA, BucciarelliRodriguez M, et al. Dual anticancer and antibacterial activities of bismuth compounds based on asymmetric [NN'O] ligands. *J Inorg Biochem.* setembro de 2021;222:111522.
120. Hernandez-Delgadillo R, García-Cuéllar CM, Sánchez-Pérez Y, Pineda-Aguilar N, Martínez-Martínez MA, Rangel-Padilla EE, Nakagoshi-Cepeda SE, Solís-Soto JM, Sánchez-Nájera RI, Nakagoshi-Cepeda MAA, Chellam S, Cabral-Romero C. In vitro evaluation of the antitumor effect of bismuth lipophilic nanoparticles (BisBAL NPs) on breast cancer cells. *Int J Nanomedicine.* 2018 Oct 5;13:6089-6097. doi: 10.2147/IJN.S179095. PMID: 30323596; PMCID: PMC6179729.

121. Denise Taffarello, Michelle P. Jorge, Ilza M^a de O. Sousa, Marta C. T. Duarte, Glyn M. Figueira, Nubia de C. A. Queiroz, Rodney A. F. Rodrigues, Joao E. de Carvalho, Ana L. T. R. Goes, Mary A. Foglio, José M. Riveros, Marcos N. Eberlin e Elaine C. Cabral ATIVIDADE DE EXTRATOS DE *Arrabidaea chica* (HUMB. & BONPL.) VERLOT OBTIDOS POR PROCESSOS BIOTECNOLÓGICOS SOBRE A PROLIFERAÇÃO DE FIBROBLASTOS E CÉLULAS TUMORAIS HUMANAS *Quim. Nova*, Vol. 36, No. 3, 431-436, 2013.
122. Servat-Medina L, González-Gómez A, Reyes-Ortega F, Sousa IM, Queiroz Nde C, Zago PM, Jorge MP, Monteiro KM, de Carvalho JE, San Román J, Foglio MA. Chitosan-tripolyphosphate nanoparticles as *Arrabidaea chica* standardized extract carrier: synthesis, characterization, biocompatibility, and antiulcerogenic activity. *Int J Nanomedicine*. 2015 Jun 9;10:3897-909. doi: 10.2147/IJN.S83705. PMID: 26089666; PMCID: PMC4467739.
123. Wahid B, Ali A, Rafique S, Waqar M, Wasim M, Wahid K, Idrees M. An overview of cancer immunotherapeutic strategies. *Immunotherapy* 2018, 10, 999–1010. [CrossRef] [PubMed].
124. Weiden J, Tel J, Figdor C G. Synthetic immune niches for cancer immunotherapy. *Nat. Rev. Immunol.* 2018, 18, 2012–2019. [CrossRef] [PubMed].
125. Shurin, M. Cancer as an immune-mediated disease. *ImmunoTargetsTher.* 2012, 1, 1–6. [CrossRef] [PubMed].
126. Mikucki, M.E.; Fisher, D.T.; Ku, A.W.; Appenheimer, M.M.; Muhitch, J.B.; Evans, S.S. Preconditioning thermal therapy: flipping the switch on IL-6 for anti-tumour immunity. *Int. J. Hyperther. Off. J. Eur. Soc. Hyperthermic Oncol. North Am. Hyperther. Gr.* 2013, 29, 464–473, doi:10.3109/02656736.2013.807440.
127. Fisher, D.T.; Chen, Q.; Skitzki, J.J.; Muhitch, J.B.; Zhou, L.; Appenheimer, M.M.; Vardam, T.D.; Weis, E.L.; Passanese, J.; Wang, W.-C.; et al. IL-6 trans-signaling licenses mouse and human tumor microvascular gateways for trafficking of cytotoxic T cells. *J. Clin. Invest.* 2011, 121, 3846–3859, doi:10.1172/JCI44952.
128. Grivennikov SI, Greten F R, Karin M. Immunity, Inflammation, and Cancer. *Cell* 2010, 140, 883–899. [CrossRef].
129. Schreiber RD, Old LJ, Smyth MJ. Cancer immunoediting: Integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science* 2011, 331, 1565–1570. [CrossRef].
130. Fisher DT, Appenheimer MM, Evans SS. The two faces of IL-6 in the tumor microenvironment. *Semin. Immunol.* 2014, 26, 38–47. [CrossRef].
131. Oft, M. IL-10: master switch from tumor-promoting inflammation to antitumor immunity. *Cancer Immunol. Res.* 2014, 2, 194–199, doi:10.1158/2326-6066.CIR-13-0214.
132. Lu, X. Impact of IL-12 in Cancer. *Curr. Cancer Drug Targets* 2017, 17, 682–697, doi:10.2174/1568009617666170427102729.
133. Nguyen, K.G.; Vrabel, M.R.; Mantooth, S.M.; Hopkins, J.J.; Wagner, E.S.; Gabaldon, T.A.; Zaharoff, D.A. Localized Interleukin-12 for Cancer Immunotherapy. *Front. Immunol.* 2020, 11, 575597, doi:10.3389/fimmu.2020.575597.

134. Josephs, S.F.; Ichim, T.E.; Prince, S.M.; Kesari, S.; Marincola, F.M.; Escobedo, A.R.; Jafri, A. Unleashing endogenous TNF-alpha as a cancer immunotherapeutic. *J. Transl. Med.* 2018, 16, 242, doi:10.1186/s12967-018-1611-7.
135. Shen, J.; Xiao, Z.; Zhao, Q.; Li, M.; Wu, X.; Zhang, L.; Hu, W.; Cho, C.H. Anti-cancer therapy with TNF α and IFN γ : A comprehensive review. *Cell Prolif.* 2018, 51, e12441, doi:10.1111/cpr.12441.

• www.instagram.com/ppgh_uea