



**Universidade de Brasília**  
Instituto de Ciências Biológicas  
Departamento de Biologia Celular  
Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular

**Avaliação toxicológica e antitumoral do tratamento  
sistêmico com citrato de ródio (II) livre e associado a  
nanopartículas de maghemita em modelo experimental de  
câncer de mama**

**RAPHAEL CÂNDIDO APOLINÁRIO PEIXOTO**

**Brasília, março de 2012**

**RAPHAEL CÂNDIDO APOLINÁRIO PEIXOTO**

**Avaliação toxicológica e antitumoral do tratamento  
sistêmico com citrato de ródio (II) livre e associado a  
nanopartículas de maghemita em modelo experimental de  
câncer de mama**

Dissertação apresentada ao Programa  
de Pós-Graduação em Biologia  
Molecular, Universidade de Brasília,  
como pré-requisito para obtenção do  
Título de Mestre.

**Orientadora:** Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Sônia Nair Bão

**Brasília, março de 2012**

**RAPHAEL CÂNDIDO APOLINÁRIO PEIXOTO**

**Avaliação toxicológica e antitumoral do tratamento sistêmico com citrato de ródio (II) livre e associado a nanopartículas de maghemita em modelo experimental de câncer de mama**

**COMISSÃO EXAMINADORA**

Prof<sup>ª</sup>. Dra. Sônia Nair Bão (IB, UnB)  
(Orientadora)

Prof<sup>ª</sup>. Dra. Lídia Andreu Guillo (UFG)  
(Membro titular)

Prof<sup>ª</sup>. Dra. Zulmira Marques Lacava (IB, UnB)  
(Membro titular)

Prof<sup>ª</sup>. Dra. Silene Paulino Lozzi (IB, UnB)  
(Membro suplente)

Ao meu pai pelas oportunidades e lições proporcionadas  
e à minha mãe pelo carinho revigorante!

## AGRADECIMENTOS

À energia suprema que conduz minha vida guiando os caminhos por mim escolhidos.

À Prof. Dra. Sônia Nair Bão, pelo constante incentivo ao trabalho e, sobretudo, pelo exemplo de competência, de objetividade e de contínua busca pelo saber. Afinal, com você, Prof. Sônia, aprendi que *“até para morrer é preciso aprender”*.

Às Doutoradas Lidia Guillo, Zulmira Lacava e Silene Lozzi, por terem aceitado o convite de participar da banca examinadora, obrigado pela contribuição com esta dissertação.

Ao Prof. Dr. Aparecido de Souza, à Eloiza Nunes e ao Matheus Oliveira da Silva, pela síntese das composições utilizadas neste trabalho e por serem tão prestativos.

Aos professores Dr. Ricardo Bentes, Dra. Zulmira Lacava e Dra. Sônia Freitas, por terem disponibilizado os laboratórios, fundamentais para a realização da pesquisa.

Aos colaboradores José Souza, pelas análises histopatológicas do fígado, e Ana Luisa Miranda Vilela, pela elaboração estatística. Ana, mais uma vez o meu MUITO OBRIGADO por todo apoio e compreensão, suas orientações foram valiosas para a conclusão desta dissertação.

Aos professores César Grisólia, Márcia Mortari e Maria Fernanda, pela ajuda no planejamento dos experimentos de avaliação toxicológica e nas análises histológicas.

Aos membros da banca de qualificação Dr. José Raimundo Corrêa, Dra. Anamélia Lorenzetti e Dra. Maria de Fátima, que, com suas sugestões, proporcionaram o melhor desenvolvimento deste trabalho.

Às queridas colegas Flávia Arruda, Luciana Landim, Adriana Melo, Dona Zélia, Ieler Ferreira e Mariana Roll, pelo empenho e eficiência nos dias de eutanásia dos camundongos. A contribuição de vocês foi essencial.

Ao grupo composto pela Dra. Marcella Carneiro, Ricardo Guirelli e Luis Augusto, pelos estudos em conjunto, durante minha graduação, que deram embasamento para a realização desta pesquisa.

Às amigas Ludmilla, Mary-Ann, Beatriz Chiyin Ma e Luciana Pereira, pelos ensinamentos científicos e, acima de tudo, pelo companheirismo nos momentos conturbados e pelos sinceros conselhos que tornaram às vindas ao laboratório algo muito prazeroso.

Aos amigos de laboratório Ingrid Gracielle, Felipe Coutinho, Renatinha, Mayara Simonelly, Daniel Ardisson, Isadora Vitti, Dulce Oliveira, Natália Lemos e Cláudio Lopes, pelos momentos alegres e divertidos. Nossos almoços foram sempre revigorantes. Lola, obrigado por ter ingressado na minha vida com seu encanto libertador, me ensinando a importância em se ter autonomia sobre os sentimentos.

Ao João Paulo, pelas sugestões nas análises morfométricas de necrose tumoral, e aos colegas Jaqueline Rodrigues e Samuel Mussi pelo auxílio durante a utilização do citômetro de fluxo.

À minha família, Cândido e Apolinário Peixoto, pela vida e pelos ensinamentos que me proporcionaram. Agradeço à Geny, pela “mãezona” que tem sido desde minha infância. Lucas e Gabriel, meus irmãos queridos, obrigado pelos momentos alegres e divertidos que temos sempre. Aos meus avós, Nize e Agildo, pelo zelo e carinho, amo vocês.

Aos meus fiéis amigos Carlos, Igor, Fillype e Vinícius, por serem verdadeiros irmãos. Vinícius, essa conquista é nossa.

À Bélin P. Mezzomo pelo apoio, incentivo e por fazer parte do meu crescimento. Você é uma batalhadora, tenho certeza do seu sucesso. Por Enquanto é difícil enxergar a alegria que existe na vida, mas momentos tristes passam e com eles nossa felicidade se torna mais real.

Ao CNPq pelo auxílio financeiro e ao Laboratório SABIN, pelas análises laboratoriais, imprescindíveis para a elaboração desta dissertação.

À Universidade de Brasília, por ter proporcionado a minha formação profissional e a realização desta pesquisa.

## RESUMO

O Câncer de mama é uma das principais causas de morte entre as mulheres em todo mundo, com estimativa do Instituto Nacional de Câncer de 52.680 novos casos no Brasil em 2012. Agentes antitumorais à base de metal, como a cisplatina, podem induzir respostas favoráveis em tumores sólidos humanos, embora seus efeitos colaterais limitem seu uso na clínica. Portanto, já foi descrito que citrato de ródio (II), um composto metálico análogo à cisplatina, apresentou atividade antitumoral em carcinoma ascítico de Ehrlich. Além disso, o desenvolvimento de técnicas que consigam entregar agentes antitumorais com maior seletividade representa uma das maiores áreas de interesse na pesquisa do câncer. Nanobiotecnologia é um novo campo de pesquisa envolvendo avanços na detecção, diagnóstico e tratamentos de câncer. Nanopartículas envolvem uma variedade de nanossistemas coloidais que podem ser usadas para entrega de drogas. Algumas delas possuem propriedades magnéticas e devido ao seu tamanho reduzido (4-12 nm) permitem maior permeabilidade e retenção no tumor. Assim, a associação de citrato de ródio (II) com nanopartículas magnéticas poderia melhorar o efeito antitumoral, em função da maior especificidade a células e a tecidos específicos. Deste modo, o objetivo deste estudo foi avaliar as respostas toxicológicas e os efeitos antitumorais do tratamento sistêmico com citrato de ródio (II) livre e associado com nanopartículas de maghemita em câncer de mama. Camundongos BALB/c fêmeas foram inoculados com  $2 \times 10^4$  células de carcinoma mamário 4T1 para o estabelecimento do tumor. Após sete dias, os animais foram tratados com citrato de ródio (II) livre, citrato de ródio (II) associado com nanopartículas de maghemita e citrato associado com nanopartículas de maghemita, por via intravenosa. Os tratamentos foram realizados a cada três dias e os animais foram eutanasiados depois da terceira dose. Os tumores foram removidos cirurgicamente, medidos, pesados e processados para as análises histopatológicas com intuito de avaliar a atividade antitumoral. As imagens foram adquiridas em microscópio de luz Zeiss Axiophot e as áreas de necrose tumoral foram medidas com software Motic Images Plus 2.0. Para as avaliações toxicológicas, amostras de sangue foram analisadas por testes bioquímicos e hematológicos. Não foram observadas diferenças significativas de volume e peso tumoral, embora todos os tratamentos tenham resultado em redução não significativa comparados ao controle. Citrato de ródio (II) livre e associado com nanopartículas promoveram um aumento não significativo da área de necrose em relação ao grupo controle. Além disso, análises bioquímicas e hematológicas de camundongos BALB/c sem implante tumoral não apresentaram efeitos tóxicos relativos aos compostos utilizados. Assim, citrato de ródio (II) livre e associado com nanopartículas de maghemita apresentaram atividade antitumoral em carcinoma mamário 4T1, indicando que, com adequado ajuste da dose, essas composições podem apresentar potencial terapêutico para aplicação em câncer de mama.

**Palavras chave:** Câncer de mama, citrato de ródio (II), nanopartículas de maghemita, camundongos BALB/c, tratamento sistêmico.

## ABSTRACT

Breast cancer is one of the main causes of death among women around the world, with an estimated of National Cancer Institute of 52,680 new cases in Brazil in 2012. Metal-based antitumor drugs like cisplatin can induce favorable response in human solid tumors, however its adverse side effects limit its clinical activity. Therefore, it was described that rhodium (II) citrate, an metal-based compound analog to cisplatin, showed antitumor activity in Ehrlich ascites breast carcinoma. Moreover, the development of techniques that can deliver anticancer agents selectively represents one of the major areas of interest in cancer research. Nanobiotechnology is a new field of research expected to advance in cancer detection, diagnosis, and treatments. Nanoparticles encompass a variety of colloidal nanosystems which can be used for drug delivery. Some metal nanoparticles has magnetic properties and extremely reduced size (4-12 nm), allowing tissue permeability and drug retention into the tumor. Then, the association of rhodium (II) citrate with magnetic nanoparticles could improve the antitumor effect by targeting specific cells or tissues. Hence, the aim of this study was to evaluate the toxicological responses and antitumor activity of systemic treatment with rhodium (II) citrate free and associated with maghemite nanoparticles in breast cancer. Females BALB/c mice were injected with  $2 \times 10^4$  4T1 mammary carcinoma cells for tumor establishment. After seven days, animals were treated with free rhodium (II) citrate, rhodium (II) citrate loaded maghemite nanoparticles and citrate-loaded maghemite nanoparticles by intravenous administration. Treatments were carried out every three days and animals were euthanized after the third dose administration. Then, tumors were surgically removed, measured, weighted and prepared for histopathological analyses in order to evaluate the antitumor activity. Images were acquired in Zeiss Axiophot light microscopy and tumor necrosis areas were measured by Motic Images Plus 2.0 software. For toxicological investigation, blood samples were analyzed by biochemical and hematological tests. No significant differences were observed for tumor volume and weight, although all treatments resulted in a non-significant reduction compared to control. Free rhodium (II) citrate and rhodium (II) citrate associated with maghemite nanoparticles promoted a non-significant increased in necrosis area compared to control. Furthermore, biochemical and hematological analysis of BALB/c mice without tumor inoculation didn't show toxic effects of the used compounds. Thus, free rhodium (II) citrate and rhodium (II) citrate loaded maghemite nanoparticles showed antitumor activity on 4T1 mammary carcinoma, indicating that, with adequate adjustment of the dose, this compound can have potential for application in breast cancer.

**Keywords:** Breast cancer, rhodium (II) citrate, maghemite nanoparticles, BALB/c mice, systemic treatment.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura geral de carboxilatos de ródio (II). .....	22
Figura 2: Esquema da molécula de citrato de ródio (II). .....	22
Figura 3: Esquema da associação de uma nanopartícula de maghemita com uma molécula de citrato de ródio (II). .....	25
Figura 4: Esquema da estrutura da mama humana e de camundongo. ....	27
Figura 5: Esquema (A) e fotomicrografia (B) da mama de camundongo na puberdade.....	27
Figura 6: Caracterização morfológica e mensuração de nanopartículas de maghemita associada com citrato de ródio (II) (Magh-Rh <sub>2</sub> Cit) do Lote 2.....	42
Figura 7: Óbitos dos camundongos ocorridos durante o Experimento 2. ....	43
Figura 8: Peso corpóreo dos camundongos do Experimento 1. ....	45
Figura 9: Peso corpóreo dos camundongos ao longo do Experimento 2 .....	45
Figura 10: Peso corpóreo dos camundongos ao longo do Experimento 3 .....	46
Figura 11: Estabelecimento do tumor no Experimento 2 .....	47
Figura 12: Estabelecimento do tumor no Experimento 3 .....	47
Figura 13: Fotografias dos tumores do Experimento 2 .....	48
Figura 14: Volume tumoral dos camundongos do Experimento 2.....	49
Figura 15: Fotografias dos tumores do Experimento 3 .....	50
Figura 16: Peso tumoral dos camundongos do Experimento 3 .....	50
Figura 17: Peso do baço dos camundongos do Experimento 3 .....	51
Figura 18: Valor absoluto de linfócitos de camundongos do Experimento 2. ....	62
Figura 19: Valor absoluto de linfócitos de camundongos do Experimento 3 .....	64
Figura 20: Fotomicrografias de pulmão de camundongos do Experimento 1.....	67
Figura 21: Fotomicrografias de pulmão de camundongos do Experimento 2.....	68
Figura 22: Fotomicrografias de pulmão de camundongos do Experimento 3.....	69
Figura 23: Fotomicrografia do tecido hepático de camundongos BALB/c expostos ao tratamento com Rh <sub>2</sub> Cit, Magh-Rh <sub>2</sub> Cit, Magh-Cit .....	70

Figura 24: Cálculo do Índice de Alterações Histopatológico (IAH) para tecido hepático de camundongos do Experimento 1. ....	72
Figura 25: Cálculo do Índice de Alterações Histopatológico (IAH) para tecido hepático de camundongos do Experimento 2 .....	73
Figura 26: Cálculo do Índice de Alterações Histopatológico (IAH) para tecido hepático de camundongos do Experimento 3 .....	74
Figura 27: Necrose por coagulação utilizada na análise morfométrica dos tumores .....	78
Figura 28: Percentagem de necrose nos tumores do Experimento 2. ....	79
Figura 29: Regiões de necrose dos tumores do Experimento 2.....	79
Figura 30: Percentagem de necrose nos tumores do Experimento 3.....	80
Figura 31: Regiões de necrose dos tumores do Experimento 3.....	80
Figura 32: Fotomicrografias de tecido mamário de camundongos fêmeas BALB/c .....	81
Figura 33: Fotomicrografias de carcinoma mamário (linhagem 4T1) de camundongos fêmeas BALB/c sem tratamento (controle) .....	82
Figura 34: Fotomicrografias de carcinoma mamário (linhagem 4T1) de camundongos fêmeas BALB/c tratados com Rh <sub>2</sub> Cit .....	83
Figura 35: Fotomicrografias de carcinoma mamário (linhagem 4T1) de camundongos fêmeas BALB/c tratados com Magh-Rh <sub>2</sub> Cit .....	84
Figura 36: Fotomicrografias de carcinoma mamário (linhagem 4T1) de camundongos fêmeas BALB/c tratados com Magh-Cit .....	85
Figura 37: Fragmentação de DNA em células da medula óssea dos camundongos fêmeas BALB/c do Experimento 3 .....	86

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1– Concentrações de ródio (II) e de ferro nas soluções estoques do Lote 1 de Magh-Rh <sub>2</sub> Cit e de Magh-Cit .....	32
Tabela 2– Concentrações de ródio (II) e de ferro nas soluções estoques do Lote 2 de Magh-Rh <sub>2</sub> Cit e Magh-Cit .....	32
Tabela 3– Concentrações de citrato de ródio e de ferro utilizadas nas composições de Rh <sub>2</sub> Cit, Magh-Rh <sub>2</sub> Cit e Magh-Cit durante o Experimento 1 .....	33
Tabela 4– Média das concentrações de citrato de ródio e de ferro utilizadas ao longo do Experimento 2 nas composições de Rh <sub>2</sub> Cit, Magh-Rh <sub>2</sub> Cit e Magh-Cit .....	35
Tabela 5 – Concentrações de citrato de ródio e de ferro utilizadas nas composições de Rh <sub>2</sub> Cit, Magh-Rh <sub>2</sub> Cit e Magh-Cit durante o Experimento 3.....	36
Tabela 6 - Parâmetros adotados para análise histomorfométrica no fígado de camundongos fêmeas BALB/c .....	40
Tabela 7 – Níveis bioquímicos de transaminase glutâmico pirúvica (TGP), creatinina e ferro sérico dosados no soro de camundongos do Experimento 1 .....	52
Tabela 8 – Níveis bioquímicos de transaminase glutâmico pirúvica (TGP), creatinina e ferro sérico dosados no soro de camundongos do Experimento 2 .....	53
Tabela 9 – Níveis bioquímicos de transaminase glutâmico pirúvica (TGP), creatinina e ferro sérico dosados no soro de camundongos do Experimento 3 .....	54
Tabela 10 - Eritrograma de camundongos do Experimento 1 .....	56
Tabela 11 - Eritrograma de camundongos do Experimento 2 .....	57
Tabela 12 - Eritrograma de camundongos do Experimento 3 .....	58
Tabela 13 - Plaquetograma de camundongos do Experimento 1 .....	59
Tabela 14 - Plaquetograma de camundongos do Experimento 2 .....	60
Tabela 15 - Plaquetograma de camundongos do Experimento 3 .....	60
Tabela 16 – Leucograma de camundongos do Experimento 1.....	61
Tabela 17 – Leucograma de camundongos do Experimento 2.....	62
Tabela 18 – Leucograma de camundongos do Experimento 3.....	63
Tabela 19 – Exame de rotina da urina - EAS de camundongos do Experimento 1.....	65

Tabela 20 - Alterações histopatológicas do fígado de camundongos do Experimento 1 com respectivos estágios e frequências das modificações no tecido hepático .....	71
Tabela 21 - Alterações histológicas do fígado de camundongos do Experimento 2 com respectivos estágios e frequências das modificações no tecido hepático .....	72
Tabela 22 - Alterações histológicas do fígado de camundongos do Experimento 3 com respectivos estágios e frequências das modificações no tecido hepático .....	73
Tabela 23 - Mensurações realizadas em hepatócitos de camundongos do Experimento 1 .....	75
Tabela 24 - Mensurações realizadas em hepatócitos de camundongos do Experimento 2 .....	76
Tabela 25 - Mensurações realizadas em hepatócitos de camundongos do Experimento 3 .....	77

## LISTA DE SIGLAS

AC	Área citoplasma
AH	Área hepatócito
ALT (ou TGP)	Alanina aminotransferase (ou transaminase glutâmico pirúvica)
An	Área núcleo
CEMIB	Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica
CHCM	Concentração hemoglobínica corpuscular média
cm <sup>2</sup>	Centímetro quadrado
dL	Decilitros
DH	Diâmetro hepatócito
DMEM	Dulbecos's modified Eagle's medium
Dn	Diâmetro núcleo
DNA	Ácido desoxirribonucléico
EDTA	Ácido etilediaminotetracético
EPM	Erro padrão da média
fL	Fentolitros
g	Gramas
g/dL	Gramas por decilitro
HCM	Hemoglobina corpuscular média
HCT	Hematócrito
HGB	Hemoglobina
INCA	Instituto Nacional do Câncer
kg	Quilograma
Magh-Rh <sub>2</sub> Cit	Nanopartículas de maghemita funcionalizadas por citrato de ródio (II)
Magh-Cit	Nanopartículas de maghemita funcionalizadas citrato
MET	Microscopia eletrônica de transmissão
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
mg	Miligrama
mg/dL	Miligramas por decilitro
mg/kg	Miligrama por quilograma
µg/mL	Micrograma por mililitro
µL	Microlitro
mL	Mililitro

mm	Milímetro
mm <sup>3</sup>	Milímetro cúbico
nm	Nanômetro
NPs	Nanopartículas
PBS	Solução tamponada de fosfato
pH	Potencial de hidrogênio
pg	Picograma
RDW-CV	Amplitude ou variação da distribuição do tamanho do eritrócito (do inglês <i>Red Cell Distribution Width</i> )
RH	Razão hepatócito
Rh <sub>2</sub> Cit	Citrato de ródio (II)
SFB	Soro fetal bovino
TGP (ou ALT)	Transaminase glutâmico pirúvica (ou alanina aminotransferase)
U/L	Unidades por litro
ULDTs	Unidades lobulares dos ductos terminais
VCM	Volume corpuscular médio
VH	Volume hepatócito
VC	Volume citoplasma
Vn	Volume núcleo

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	17
1.1	Origem do câncer.....	17
1.2	Terapias convencionais do tratamento de câncer de mama.....	18
1.3	Uso de metais na quimioterapia.....	20
1.4	Nanobiotecnologia como sistema de entrega de drogas.....	22
1.5	Nanopartículas magnéticas e sua associação a citrato de ródio (II).....	24
1.6	Experimentos <i>in vivo</i> no estudo de câncer de mama.....	25
2	JUSTIFICATIVA.....	29
3	OBJETIVOS.....	30
3.1	Objetivo Geral.....	30
3.2	Objetivos Específicos.....	30
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	31
4.1	Materiais.....	31
4.1.1	Amostra de citrato de ródio (II) e dos fluidos magnéticos associados.....	31
4.1.2	Células.....	32
4.1.3	Animais.....	32
4.2	Métodos.....	33
4.2.1	Manutenção dos animais.....	33
4.2.2	Avaliação da toxicidade aguda – Experimento 1.....	33
4.2.3	Avaliação do efeito antitumoral e toxicológico – Experimentos 2 e 3.....	34
4.2.4	Coleta de material.....	36
4.2.5	Microscopia de luz.....	38
4.2.6	Avaliação genotóxica.....	41
4.2.7	Estatística.....	41
5	RESULTADOS.....	42
5.1	Caracterização das nanopartículas associadas com citrato de ródio (II) - Lote 2.....	42

5.2	Análises clínicas .....	43
5.2.1	Sobrevida .....	43
5.2.2	Avaliação da massa corporal dos camundongos .....	44
5.2.3	Avaliação do crescimento do tumor na mama .....	46
5.2.4	Mensuração dos tumores .....	48
5.2.5	Peso Baço .....	51
5.3	Análises hematológicas e bioquímicas .....	51
5.3.1	Testes bioquímicos .....	51
5.3.2	Hemograma .....	54
5.4	Análise de rotina da urina .....	64
5.5	Análises histopatológicas .....	65
5.5.1	Pulmão .....	65
5.5.2	Efeitos Histopatológicos e Histomorfometria do Fígado .....	70
5.5.3	Análises histopatológicas dos tumores .....	78
5.6	Análises de fragmentação de DNA de células da medula óssea .....	86
6	DISCUSSÃO .....	87
6.1	Considerações sobre toxicidade .....	87
6.2	Considerações sobre efeito antitumoral .....	93
7	CONCLUSÃO .....	97
8	PERSPECTIVAS .....	98
9	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	99
	<i>ANEXO 1</i> .....	106

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Origem do câncer

O câncer é a designação dada ao conjunto de manifestações patológicas que se caracterizam pela perda de controle da proliferação celular e ganho da capacidade de invadir tecidos adjacentes ou de sofrer metástases em tecidos distantes (RIBEIRO *et al*, 2003). Esse crescimento descontrolado de células reflete na formação de um novo tecido denominado neoplasma ou tumor (ROBBINS & COTRAN, 2005). O termo câncer refere-se especificamente à formação de tumores malignos, ou seja, invasivos (ALMEIDA *et al*, 2005), diferente do que ocorre em tumores benignos, localizados no seu tecido de origem (WEINBERG, 2008).

O tipo de tumor é denominado de acordo com o nome do tecido em que se originou. Geralmente, a denominação é feita indicando o nome do tecido seguido do sufixo *oma*. Por exemplo, linfoma designa um tumor no tecido linfático. Essa classificação primária é utilizada para tumores benignos e malignos. Quando tumores malignos surgem do tecido mesenquimal eles são denominados sarcomas, como ocorre em tecidos de sustentação, tais como ossos, tecido gorduroso, músculo e tecido fibroso de reforço. Os neoplasmas malignos originados de células epiteliais são denominados carcinomas. Estes constituem o tipo mais comum de câncer, incluindo pele, boca, garganta, brônquios, esôfago, estômago, intestino, bexiga, útero, ovários, ductos mamários, próstata e pâncreas. Carcinomas com padrão glandular recebem, ainda, a terminologia adenocarcinoma (ROBBINS & COTRAN, 2005; ALMEIDA *et al*, 2005).

O câncer de mama é denominado carcinoma devido à sua origem epitelial, sendo uma doença heterogênea em nível histológico e molecular (VISVADER, 2009), embora quase todos os tipos sejam adenocarcinomas (ROBBINS & COTRAN, 2005). A glândula mamária é constituída pelo tecido epitelial, formado por alvéolos e ductos que se conectam ao mamilo, e pelo estroma, composto por tecido conjuntivo e adiposo (HENNIGHAUSEN & ROBINSON, 2005). Quando as células cancerígenas ficam restritas aos ductos e lóbulos pela membrana basal, forma-se o carcinoma *in situ*. Todavia, ao infiltrar no estroma, ultrapassando as paredes do epitélio e alcançando o sistema vascular e os linfonodos, a população neoplásica de células

estabelece o carcinoma invasivo, podendo ocasionar metástases (ROBBINS & COTRAN, 2005).

A incidência do câncer já foi relativamente rara em tempos mais antigos devido, provavelmente, à menor expectativa de vida (PONCE *et al*, 1996). Atualmente, a redução das taxas de mortalidade e de natalidade com conseqüente prolongamento da expectativa de vida e envelhecimento populacional, levou ao aumento da incidência de doenças cardiovasculares e do câncer. Além disto, os atuais padrões de vida adotados em relação ao trabalho, nutrição e consumo em geral expõem os indivíduos a fatores ambientais mais agressivos, relacionados a agentes químicos, físicos e biológicos resultantes de um processo de industrialização cada vez mais intenso (INCA, 2006). Assim, hoje o câncer constitui o principal fator de morte em países desenvolvidos estando em segundo lugar em países em desenvolvimento, depois de doenças cardíacas. Em 2008 7,6 milhões de óbitos no mundo foram causados por câncer, sendo que quase dois terços ocorreram em países de médio e baixo desenvolvimento (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2011). No Brasil há uma estimativa de que ocorram 518.510 novos casos de câncer em 2012, sendo que, entre as mulheres, o câncer de mama poderá ser o segundo mais incidente, com estimativa de 52.680, depois do câncer de pele não melanoma (INCA, 2012).

## **1.2 Terapias convencionais do tratamento de câncer de mama**

Os tratamentos convencionais utilizados para o câncer de mama abrangem cirurgia, radioterapia, quimioterapia e hormonioterapia, dependendo das características psicológicas e clínicas do paciente, assim como do avanço do tumor (BERGMANN *et al*, 2000).

A cirurgia é classificada em conservadora, quando o tumor é retirado sem a perda da mama, e não conservadora, quando ocorre a mastectomia, processo de retirada da glândula mamária (BARROS *et al*, 2001). A escolha da cirurgia para o tratamento do câncer depende da natureza e do estágio da doença, estando normalmente associada a outros tratamentos. A intervenção cirúrgica pode ser necessária para garantir o acesso de quimioterápicos aos vasos sanguíneos (BOYLE & LEVIN, 2008), ou para reduzir nódulos visíveis de tumor, aumentando a eficiência da quimioterapia (AL-SHAMMAA & YONEMURA, 2008) ou da radioterapia (ALMEIDA *et al*, 2005).

Com a descoberta de um meio gerador de raios X, a radioterapia tornou-se uma ferramenta clínica essencial contra o câncer, de modo que cerca de 70 a 83% dos pacientes

portadores de carcinoma mamário recebem esse tipo de tratamento. O processo de metástase, contudo, exige um tratamento diferenciado já que tanto a cirurgia como a radioterapia possuem atuação local. Desse modo, surgiu a necessidade de um tratamento sistêmico que garantisse acesso às células neoplásicas disseminadas pelo corpo (BOYLE & LEVIN, 2008).

Nesse sentido, a quimioterapia e a hormonioterapia são utilizadas para tratamentos sistêmicos do câncer de mama (BARROS *et al*, 2001). A aplicação de hormônios deve-se à capacidade de alguns tumores, com receptor hormonal positivo, apresentarem maior crescimento na presença de estrógenos. Assim, a utilização de antagonistas do estrógeno, como o tamoxifeno, pode ser efetiva no tratamento de pacientes com câncer de mama, reduzindo a atuação desse hormônio em diferentes locais do corpo (BOYLE & LEVIN, 2008).

O tratamento de micrometástases pode, em cerca de 60-70% dos casos, ser realizado com a quimioterapia. Em 1942, o agente alquilante tipo mostarda nitrogenada (meclorometamina), comumente usado em guerras como arma química, foi aplicado com sucesso no tratamento de linfoma. Tal acontecimento marcou o início da era moderna de quimioterapia do câncer, estando os agentes alquilantes entre os compostos antitumorais mais empregados na atualidade (ALMEIDA *et al*, 2005).

Todas essas terapias, porém, apresentam desvantagens. A cirurgia e a radioterapia, por exemplo, são ineficazes contra metástases. Além disso, as células saudáveis, vizinhas ao tumor, podem sofrer danos causados pelos raios emitidos durante a radioterapia (AL-SHAMMAA & YONEMURA, 2008; BOYLE & LEVIN, 2008). Os efeitos adversos decorrentes dos tratamentos com quimioterápicos devem-se a sua falta de especificidade às células tumorais, o que implica na elevação da dose terapêutica e, conseqüentemente, em aumento da toxicidade sistêmica.

É importante ressaltar que efeitos adversos como perda de cabelo e alterações no peso corpóreo decorrentes da quimioterapia e da hormonioterapia afetam a auto-estima feminina. Ainda, disfunções sexuais como redução da libido, decorrentes da hormonioterapia, e a desfiguração do corpo, devido à mastectomia, também podem resultar em distúrbios psicológicos (BOYLE & LEVIN, 2008). Dessa forma, o desenvolvimento de técnicas que possibilitem a entrega de agentes antitumorais de forma seletiva, sem afetar tecidos saudáveis, representa uma das áreas de interesse na pesquisa contra o câncer (RAWAT *et al*, 2006).

### 1.3 Uso de metais na quimioterapia

Quimioterápicos metálicos são conhecidos desde meados do século XV, embora tenham permanecido em esquecimento até a década de 60, quando foi descoberta a ação anticancerígena do complexo inorgânico cis-diaminodicloroplatina (II) (cisplatina). Este composto, juntamente com a carboplatina (cis-diamino 1,1-ciclobutano dicarboxilato), constituem os anti-neoplásicos metálicos mais usados em tratamentos de tumores sólidos atualmente. O seu mecanismo de ação envolve a formação de ligações cruzadas intra e interfilamentares entre guaninas, principalmente no seu sítio N7 (nitrogênio na posição sete), o que causa distorções na dupla hélice e resulta em inibição da transcrição e da replicação do DNA, levando à citotoxicidade (WING *et al*, 1984; KATSAROS & ANAGNOSTOPOULOU, 2002; ZHANG & LIPPARD, 2003).

A cisplatina é uma das drogas mais utilizadas no tratamento de vários tipos de câncer, embora seu sucesso clínico seja limitado por seus efeitos adversos e pela resistência adquirida ou intrínseca do tumor. Devido a isto, compostos à base de platina têm sido testados clinicamente, buscando alternativas que possam melhorar as propriedades farmacêuticas da cisplatina, tornando a atividade antitumoral mais eficaz (ZHANG & LIPPARD, 2003).

Além desses compostos à base de platina, a ação anticâncer de outros metais de transição, como o ródio, já foi descrita (KATSAROS & ANAGNOSTOPOULOU, 2002). A atividade antitumoral de carboxilatos de ródio (II), por exemplo, tem sido estudada desde 1972, buscando superar as desvantagens do tratamento com a cisplatina, que traz elevada toxicidade e quimioresistência ao organismo (SOUZA *et al*, 1996, 2006). Análises das interações de carboxilatos de ródio (II) com DNA comprovaram que esses compostos são capazes de formar ligações cruzadas covalentes entre as hélices do DNA. O comportamento destas ligações cruzadas implica vários modos de coordenação, envolvendo interações axial-axial, axial-equatorial e equatorial-equatorial entre o “núcleo” de diródio e o DNA. A diferença de reatividade entre distintas formulações de carboxilatos de ródio com a dupla hélice está relacionada com a labilidade dos seus grupos funcionais, o que pode possibilitar interações com o DNA. Assim, o material genético é considerado um alvo potencial para a ação biológica dos compostos de carboxilato de ródio (II) (DUNHAM *et al*, 2005).

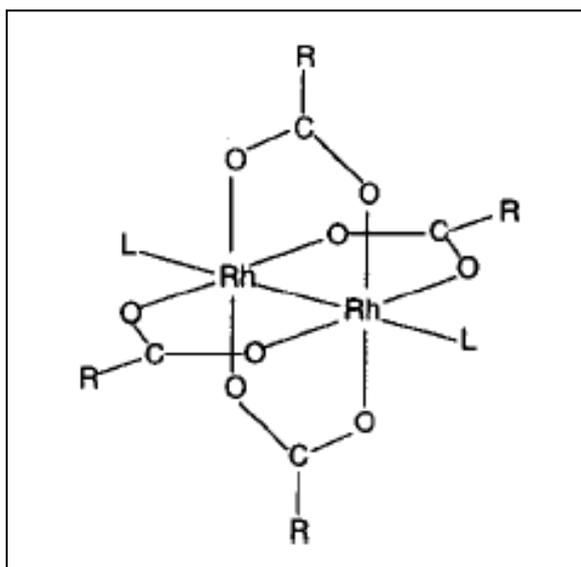
Estudos preliminares, realizados na década de 70, revelaram que carboxilatos de ródio (II) exibiram significativa atividade antitumoral *in vivo* em linhagens de tumores de L1210, carcinoma mamário ascítico de Ehrlich, sarcoma 180 e P388 (KATSAROS & ANAGNOSTOPOULOU, 2002). Os carboxilatos de ródio (II) (fórmula geral  $[Rh_2(O_2CR)_4]$ )

têm estrutura comum de quatro pontes de acetato, com uma curta ligação Rh-Rh e com posição axial coordenada (**Figura 1**) (SOUZA *et al*, 1996; GIL *et al*, 1998). Foi demonstrado que estes compostos podem interagir com o DNA de modo similar ao da cisplatina, existindo uma preferência por guanina, nas posições equatoriais dos carboxilatos de ródio (II), e por adenina, nas ligações axiais da molécula (KATSAROS & ANAGNOSTOPOULOU, 2002; DUNHAM *et al*, 2005; ANGELES-BOZA *et al*, 2006).

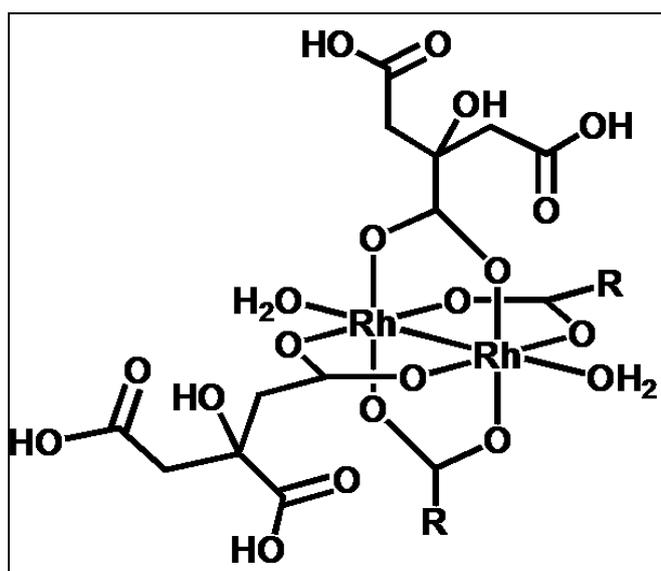
Contudo, a maioria dos carboxilatos de ródio causa efeitos tóxicos que limitam seu uso. Desse modo, novos complexos continuam sendo testados na tentativa de identificar composições com menor toxicidade, mas que consigam conservar uma significativa atividade antitumoral. Nesse sentido, foi observada uma maior taxa de sobrevivência de animais tratados com acetatos de ródio (II) não solúveis em água (REIBSCHEID *et al*, 1994). Outras avaliações sugerem que a atividade anticâncer é maior em carboxilatos de ródio (II) que apresentem radicais mais lipofílicos (GIL *et al*, 1998; KATSAROS & ANAGNOSTOPOULOU, 2002). Todavia, compostos muito hidrofóbicos são dificilmente interiorizados pelas células, tornando-se pouco efetivos (WEINBERG, 2008).

Devido à toxicidade dos carboxilatos de ródio (II) e a dificuldade de solubilizá-los em água, houve uma relativa perda de interesse pela pesquisa com esses compostos. No entanto, estratégias que permitem aumentar a solubilidade de carboxilatos de ródio (II) em água, foram estabelecidas por meio de ligantes que possuam um grupo hidrofílico em posições opostas na molécula, como ocorre com acetato metoxiacetato de ródio (II), trifluoroacetato de ródio (II) e citrato de ródio (II) (SOUZA *et al*, 1996). Dentre essa nova classe de carboxilatos de di-ródio, o citrato de ródio (II), demonstrou ser promissor para a quimioterapia, tendo apresentado significativa atividade antitumoral em tumor ascítico de Ehrlich (ZYNGIER *et al*, 1989). Contudo, devido a sua alta solubilidade em água, sua eficiência é reduzida havendo necessidade de uma elevada dose sistêmica para garantir sua eficácia como agente antitumoral *in vivo*. Deste modo, a associação do citrato de ródio (II) com um carreador faz-se necessária para aumentar a retenção deste composto no organismo (REIBSCHEID *et al*, 1994; KATSAROS & ANAGNOSTOPOULOU, 2002).

O citrato de ródio (II) é constituído por dois átomos de ródio ligados a duas moléculas de água na posição axial e a quatro moléculas de citrato, possuindo a fórmula molecular  $[Rh_2(H_2cit)_4]$  (**Figura 2**). Esse composto possui oito ácidos carboxílicos livres (-COOH) (dois para cada citrato) e duas hidroxilas (-OH) das moléculas de água (CARNEIRO *et al*, 2011a).



**Figura 1:** Estrutura geral de carboxilatos de ródio (II) (GIL *et al*, 1998).



**Figura 2:** Esquema da molécula de citrato de ródio (II) (CARNEIRO *et al*, 2011a).

#### 1.4 Nanobiotecnologia como sistema de entrega de drogas

As metodologias contemporâneas adotadas para o tratamento do câncer, particularmente as envolvidas na distribuição de drogas a alvos específicos, têm trazido progresso em relação às terapias tradicionais. A necessidade de um maior direcionamento ao sítio alvo deve-se à baixa seletividade dos quimioterápicos, que embora sejam mais tóxicos às células cancerosas, também causam injúrias aos tecidos normais, resultando em efeitos

adversos. De fato, é a toxicidade às células normais que restringe a dose e a frequência do tratamento, fatores que influenciam a persistência do câncer após a quimioterapia (RAWAT *et al*, 2006; HALEY & FRENKEL, 2008).

A entrega de drogas a alvos específicos pode envolver a criação de sistemas com dimensões reduzidas (YIH & AL-FANDI, 2006). O tamanho de nanopartículas tem influência, por exemplo, no transporte passivo de drogas através dos canais endoteliais dos vasos, além de determinar a velocidade com que as partículas sejam eliminadas pelos sistemas retículo-endoteliais. A maior demanda por sangue em tumores maiores que 2 mm<sup>3</sup> resulta no processo de angiogênese, em que há a rápida formação de vasos com ramificações anormais e diâmetros superiores aos encontrados em vasos sanguíneos de tecidos saudáveis (100 a 800 nm). Isso juntamente com a escassa drenagem linfática próxima ao tecido tumoral aumenta a permeabilidade e retenção das nanopartículas no tumor. Nesse sentido, a utilização de nanopartículas pode aumentar o índice terapêutico de agentes quimioterapêuticos, superando algumas barreiras fisiológicas e farmacológicas para tornar mais efetivo o tratamento de câncer (FAHMY *et al*, 2005; KIM & NIE, 2005; YIH & AL-FANDI, 2006; HALEY & FRENKEL, 2008).

Nanotecnologia é uma ciência interdisciplinar que abrange biologia, química, engenharia e medicina e possibilita avanços na pesquisa de câncer por meio da utilização de nanopartículas (NIE *et al*, 2007). Estas são construídas na escala nanométrica, pela definição usual de 1 a 100 nm (RAWAT *et al*, 2006; ARRUEBO *et al*, 2007), ou até algumas centenas de nanômetros, segundo alguns pesquisadores (FAHMY *et al*, 2005; SAHOO *et al*, 2007).

Nanoestruturas abrangem uma variedade de nanosistemas coloidais de origem orgânica (lipossomas e polímeros) ou inorgânica (cerâmicas e metais) (YIH & AL-FANDI, 2006). Lipossomas são vesículas concêntricas formadas por bicamada lipídica com fosfolípidos naturais ou sintéticos. Dentre as nanopartículas poliméricas, estão diferentes estruturas biodegradáveis e biocompatíveis como nanocápsulas, nanoesferas, dendrímeros, micelas poliméricas e nanogéis. As nanopartículas de cerâmica, formadas por compostos como sílica, titânio e alumínio, são capazes de envolver e proteger moléculas suscetíveis a desnaturalização por alteração de pH e de temperatura (RAWAT *et al*, 2006). Extremamente pequenas (<50 nm), as nanopartículas metálicas proporcionam o carregamento de doses mais elevadas de drogas por apresentarem maior área de superfície (FAHMY *et al*, 2005; YIH & AL-FANDI, 2006; ARRUEBO *et al*, 2007). Além disso, algumas possuem propriedades magnéticas que direcionam a droga ao alvo por meio do uso de campo magnético externo

(TARTAJ *et al*, 2005). Essas são tipicamente esféricas, com diâmetro ainda mais reduzido, variando entre 4 e 12 nm (MORAIS, 2001), tamanho essencial para aumentar sua área efetiva de superfície e melhorar a difusão da droga pelos tecidos, ultrapassando a membrana plasmática e até mesmo o envelope nuclear (TARTAJ *et al*, 2005; ARRUEBO *et al*, 2007).

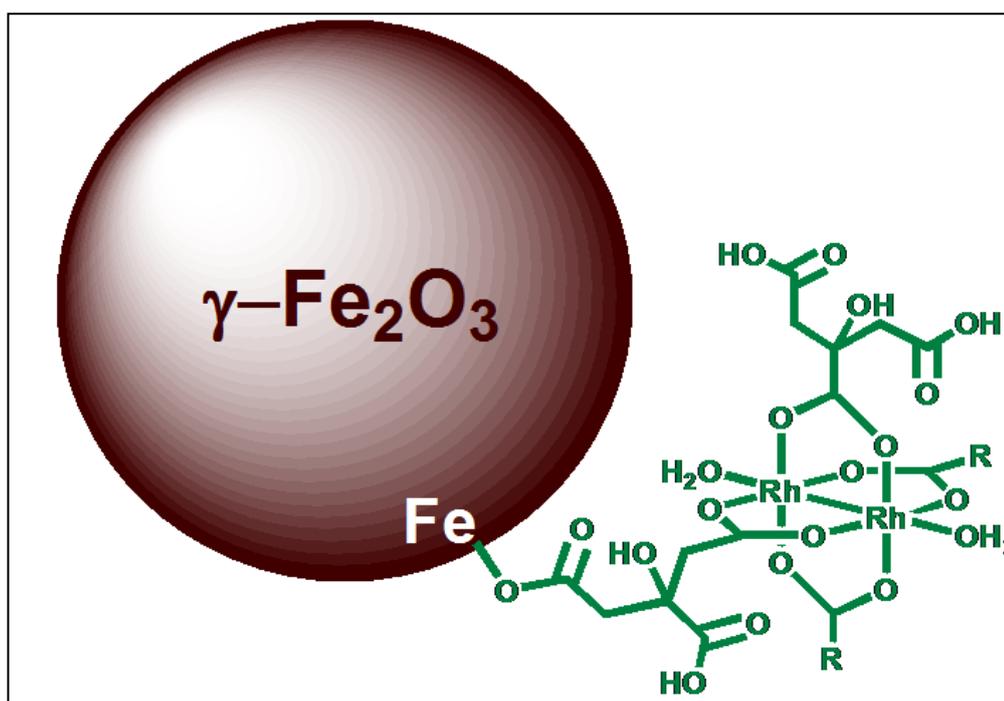
### 1.5 Nanopartículas magnéticas e sua associação a citrato de ródio (II)

Usualmente utilizados na síntese de nanopartículas magnéticas, os óxidos de ferro coloidais, como a magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) e a maghemita ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ) são ferritas insolúveis na água, que apresentam propriedades superparamagnéticas, resultantes da formação de um grande momento magnético durante a aplicação de um campo magnético externo (HILGER *et al*, 2005; COUVREUR & VAUTHIER, 2006; DOUZIECH-EYROLLES *et al*, 2007). Deste modo, nanopartículas magnéticas associadas a drogas podem ser direcionadas e acumuladas no tumor aumentando a eficácia da quimioterapia (LÜBBE *et al*, 1996; FAHMY *et al*, 2005; YIH & AL-FANDI, 2006).

Nanopartículas superparamagnéticas são interessantes para aplicações via intravenosa, pois elas não mantêm o magnetismo após a retirada do campo magnético, o que é essencial para que as partículas se mantenham estáveis, sem formar agregados capazes de ocasionar embolia nos vasos e obstruírem a sua difusão no organismo (BERRY & CURTIS, 2003, ALEXIOU *et al*, 2005). Além disso, nanopartículas magnéticas podem apresentar boa tolerância fisiológica se forem funcionalizadas de modo a evitar a sua opsonização (processo de ligação a anticorpos presentes no plasma) e consequente remoção pelo sistema retículo endotelial. Para isso, a superfície das nanopartículas deve ser modificada por meio de agentes hidrofílicos, já que componentes hidrofóbicos são eficazes em se ligar a proteínas plasmáticas. Assim, a utilização de polímeros hidrofílicos, como a dextrana, o polietileno glicol (PEG) e o poly(DL-lactic acid) (PLA), é mais adequada para estabilizar nanopartículas (ALLÉMANN *et al*, 1993; LACAVA *et al* 2001; BERRY & CURTIS, 2003; COUVREUR & VAUTHIER, 2006), pois evita a formação de agregados e reduz o processo de opsonização, resultando em uma lenta remoção das partículas pelas células fagocitárias (BERRY & CURTIS, 2003).

Fluidos magnéticos à base de água podem ser estáveis em pH neutro e em salinidade fisiológica dependendo do surfactante da partícula (LACAVA *et al*, 1999). A utilização do citrato como cobertura de nanopartículas de maghemita resulta em um fluido magnético

hidrossolúvel e com toxicidade reduzida devido à ampla distribuição desse composto no organismo (ZYNGIER *et al*, 1989; BRUGIN, 2007). O citrato de ródio (II) apresenta grupos funcionais constituídos por ácidos carboxílicos ( $-\text{COOH}$ ) e por hidroxilas ( $-\text{OH}$ ) na sua estrutura. Estes grupos funcionais são quimicamente semelhantes a moléculas bioativas usadas para funcionalizar nanopartículas magnéticas, levando a suspensões coloidais estáveis com excelente biocompatibilidade (CARNEIRO *et al*, 2011b). Esses grupos livres funcionais são apropriados para interagir com superfícies de nanopartículas de maghemita ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ) proporcionando estabilidade coloidal (**Figura 3**) (NUNES *et al*, 2010). Assim, a associação de citrato de ródio (II) com nanopartículas magnéticas poderia aumentar a especificidade com o tecido alvo e reduzir a toxicidade sistêmica, otimizando sua liberação controlada no organismo.



**Figura 3:** Esquema da associação de uma nanopartícula de maghemita com uma molécula de citrato de ródio (II) (NUNES *et al*, 2010).

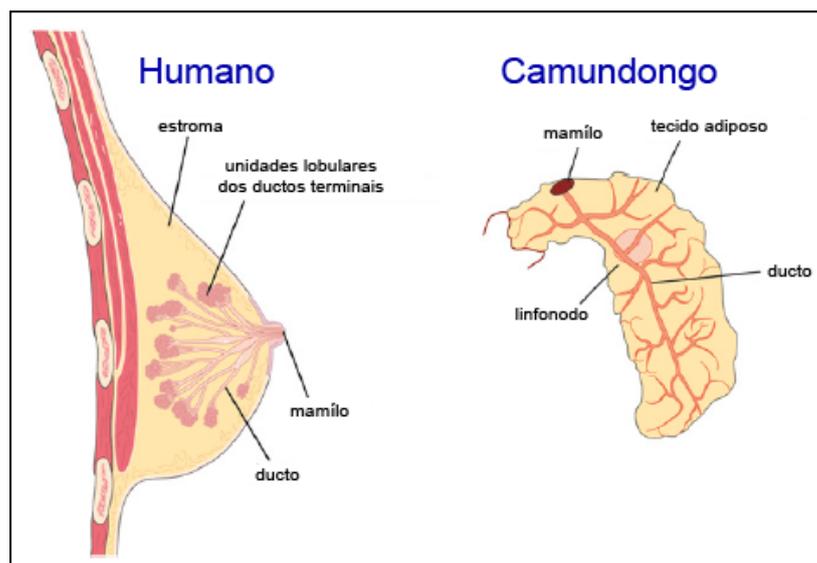
## 1.6 Experimentos *in vivo* no estudo de câncer de mama

Trabalhos experimentais envolvendo a indução de tumor em animais foram iniciados no final do século XIX, sendo que a simples observação dos pacientes com câncer era até então a metodologia mais utilizada no estudo desta doença. Foi nesse período, também, que

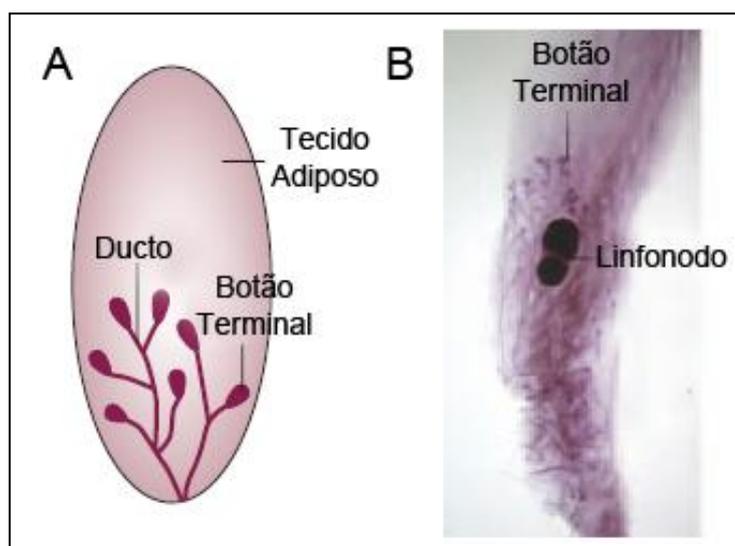
houve o aperfeiçoamento da microscopia e o descobrimento de raios X, possibilitando pesquisas mais avançadas na investigação de neoplasias (PONCE *et al*, 1996).

Modelos de câncer em animais são sistemas que mimetizam a natureza do tumor encontrado em humanos. Assim, a escolha do modelo tumoral *in vivo* é fundamental durante a investigação de uma nova droga anticancerígena. As duas metodologias mais empregadas no estabelecimento de câncer em animais de laboratório envolvem indução química ou transplante de células tumorais (KERBEL, 2003). Este procedimento é classificado em ortópico, quando as células tumorais são implantadas na mesma região anatômica de onde foram originalmente retiradas, ou ectópico, em que o crescimento tumoral ocorre em um local diferente (SHARMA *et al*, 2010). O modelo ortópico é mais apropriado para compreender a interação da droga com o tumor em seu microambiente original, trazendo informações a respeito do modo como as células neoplásicas respondem ao sistema imune, ao sangue, aos hormônios e aos fatores de crescimento (GARBER, 2006; CARNEIRO *et al*, 2010).

Assim, torna-se importante, em pesquisas com câncer de mama, observar, histopatologicamente, em animais como camundongos, a organização de células tumorais implantadas ortopicamente na glândula mamária e a sua interação com o tecido adiposo ao redor. Contudo, esse modelo tumoral pode não predizer eficientemente os efeitos da droga em estudo, pois as células e o microambiente utilizados nessas análises não são idênticos aos dos seres humanos (HEINDRYCKX *et al*, 2009; CARNEIRO *et al*, 2010). A mama humana é constituída por uma ramificação de ductos que terminam em cachos denominados de unidades lobulares dos ductos terminais (ULDTs), sendo que a maioria dos cânceres de mama surge nessas regiões. Em contraste, no tecido epitelial mamário de camundongos não existem ULDTs, havendo, no entanto, o desenvolvimento de botões terminais a cada ciclo estral (**Figura 4**) (VISVADER, 2009). A formação desses botões terminais ocorre durante a puberdade a partir do crescimento e da ramificação os ductos (**Figura 5**) (HENNIGHAUSEN & ROBINSON, 2005). Além disso, a glândula mamária de camundongos tem menos tecido conjuntivo do que a de seres humanos, mas muito mais adipócitos. Apesar das diferenças na arquitetura dos ductos entre as espécies, estudos *in vivo* com câncer de mama têm demonstrado similaridades nos grupos celulares e no tecido mamário de humanos e de camundongos (VISVADER, 2009).



**Figura 4:** Esquema da estrutura da mama humana e de camundongo (modificada de VISVADER, 2009).



**Figura 5:** Esquema (A) e fotomicrografia (B) da mama de camundongo na puberdade (modificada de HENNIGHAUSEN & ROBINSON, 2005).

O comportamento do tumor e seu padrão de progressão na glândula mamária apresentam características singulares que podem ser avaliadas por microscopia de luz. Esta ferramenta é comumente utilizada em medicina para determinar o estágio de desenvolvimento do câncer, seu caráter invasivo e o seu prognóstico. Assim, a histopatologia do tumor pode ser utilizada para identificar características como: o alto padrão de proliferação celular devido ao aumento no número de figuras mitóticas; a presença de maior densidade de vasos sanguíneos, devido à angiogênese tumoral; a proporção de necrose ocasionada pelo tratamento; e a invasão de células tumorais em tecidos distantes, indicando metástase (VISVADER, 2009).

Estudos preliminares realizados pelo nosso grupo demonstraram que o tratamento com citrato de ródio (II) livre e associado a nanopartículas de maghemita, na região do tumor (administração peritumoral), induziu regressão do carcinoma mamário 4T1 estabelecido ortopicamente em camundongos BALB/c (CARNEIRO, 2011). Contudo, não existem estudos sobre a ação sistêmica desses compostos. É importante investigar o efeito do tratamento com citrato de ródio (II) livre e associado a nanopartículas de maghemita após administração intravenosa, já que na clínica essa é a via de administração mais utilizada no tratamento de câncer metastático. Além disso, sabe-se que o ferro é degradado por vias metabólicas normais, pois quando as nanopartículas atingem a corrente sanguínea, elas são capturadas e transportadas ao fígado, baço e medula óssea, onde são degradadas. Dependendo da biodegradabilidade e tamanho, podem se acumular nas vesículas lisossomais das células de Kupffer no fígado e serem incorporadas à bile e excretadas juntamente com as fezes. Normalmente as partículas de menor tamanho são filtradas pelos rins e eliminadas pela urina, embora permaneçam por mais tempo na corrente sanguínea em virtude do menor reconhecimento pelo sistema retículo-endotelial (ARRUEBO *et al*, 2007).

Desse modo, torna-se relevante testar a ação antitumoral e toxicológica do citrato de ródio (II) livre e associado com nanopartículas de maghemita mediante tratamento sistêmico (via intravenosa) em camundongos portadores de carcinoma mamário. Para isso, a utilização da linhagem tumoral 4T1 é uma boa alternativa, já que ela apresenta comportamento metastático semelhante ao que ocorre em câncer de mama humano e também possibilita um rápido crescimento ortópico do tumor em camundongos (PULASKI & OSTRAND-ROSENBERG, 2000).

## **2 JUSTIFICATIVA**

Em virtude do câncer de mama ser a segunda causa mais comum de morte por câncer entre as mulheres e também pelo fato das terapias disponíveis provocarem efeitos adversos, torna-se necessário o desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas que possam minimizar os efeitos tóxicos e sistêmicos dos tratamentos convencionais. Neste sentido, o uso de nanopartículas magnéticas como carreadoras de fármacos ao tecido alvo pode representar uma alternativa às terapias convencionais. Assim, estudos dos efeitos biológicos, incluindo ação antitumoral e toxicidade de nanopartículas associadas a citrato de ródio (II) são fundamentais para explorar o seu potencial terapêutico.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo Geral**

Avaliar a toxicidade e a atividade antitumoral do tratamento sistêmico com citrato de ródio (II) livre e associado a nanopartículas magnéticas de maghemita em camundongos BALB/c portadores de carcinoma mamário.

#### **3.2 Objetivos Específicos**

- Analisar o efeito antitumoral após administração intravenosa de citrato de ródio (II) livre e associado a nanopartículas magnéticas de maghemita por meio de avaliações do tamanho tumoral e da histopatologia do tumor.
- Avaliar a possível toxicidade sistêmica induzida pelos tratamentos com citrato de ródio (II) livre e associado a nanopartículas magnéticas de maghemita por meio de análises bioquímicas, hematológicas, histopatológicas de pulmões e fígado e genotóxicas em células de medula óssea.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Materiais

#### 4.1.1 Amostra de citrato de ródio (II) e dos fluidos magnéticos associados

Os testes antitumorais e de toxicidade *in vivo* foram realizados com citrato de ródio (II) (Rh<sub>2</sub>Cit), livre e associado com nanopartículas (NPs). As amostras de Rh<sub>2</sub>Cit, de nanopartículas de maghemita funcionalizadas por Rh<sub>2</sub>Cit (Magh-Rh<sub>2</sub>Cit) e de nanopartículas de maghemita funcionalizadas por citrato sem ródio (II) (Magh-Cit), utilizado como controle das NPs, foram sintetizadas e caracterizadas no Instituto de Química da Universidade Federal de Goiás (UFG), pela doutoranda Eloiza da Silva Nunes, sob orientação do professor Dr. Aparecido Ribeiro de Souza. Para as avaliações biológicas, foram utilizados um único lote de Rh<sub>2</sub>Cit (2,3 mM) e dois lotes distintos de Magh-Rh<sub>2</sub>Cit e Magh-Cit com concentrações definidas de citrato de ródio e de ferro (**Tabelas 1 e 2**).

As Magh-Rh<sub>2</sub>Cit do **Lote 1** apresentaram elevada estabilidade coloidal, com diâmetro hidrodinâmico de 60 nm e potencial zeta de -38 mV, quando diluídas em soro fisiológico (NUNES *et al*, 2010). Ainda, a caracterização do diâmetro modal dessas NPs foi realizada por microscopia eletrônica de transmissão (MET) (JEOL 1011), resultando em uma média de 7,85 nm (CARNEIRO *et al*, 2011b).

O diâmetro hidrodinâmico e o potencial zeta das Magh-Rh<sub>2</sub>Cit do **Lote 2** foram adquiridos no equipamento Zetasizer ZS (Malvern), com laser de 633 nm. Essas análises foram realizadas no laboratório de Biofísica Estrutural da Universidade de Brasília, com auxílio da mestrandia Mary-Ann Elvina Xavier, sob orientação da Prof. Sônia Maria de Freitas. Além disso, a caracterização da morfologia e do diâmetro modal dessas NPs foi realizada por MET (JEOL 1011) e por microscopia eletrônica de varredura (MEV) (JEOL JSM-7001F).

**Tabela 1**– Concentrações de ródio (II) e de ferro nas soluções estoques do Lote 1 de Magh-Rh<sub>2</sub>Cit e de Magh-Cit.

	<b>Magh-Rh<sub>2</sub>Cit</b>	<b>Magh-Cit</b>
<b>[Rh<sub>2</sub>]</b>	4,11 mmol/L	-----
<b>[Fe]</b>	1,89 mol/L	0,99 mol/L

**Tabela 2**– Concentrações de ródio (II) e de ferro nas soluções estoques do Lote 2 de Magh-Rh<sub>2</sub>Cit e Magh-Cit.

	<b>Magh-Rh<sub>2</sub>Cit</b>	<b>Magh-Cit</b>
<b>[Rh<sub>2</sub>]</b>	0,79 mmol/L	-----
<b>[Fe]</b>	0,079 mol/L	0,183 mol/L

#### 4.1.2 Células

Células de carcinoma mamário murino da linhagem 4T1 foram cedidas pela Prof<sup>a</sup>. Dra. Suzanne Ostrand-Rosenberg (Departamento de Ciências Biológicas, Universidade de Baltimore; Maryland–EUA, ATCC® CRL-2539TM), para a realização do implante tumoral.

#### 4.1.3 Animais

Para a realização dos experimentos, foram utilizados camundongos fêmeas isogênicos da linhagem BALB/c (*Mus musculus*), obtidos do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área da Ciência em Animais de Laboratório (CEMIB) da Universidade de Campinas, Campinas-SP. Todos os animais foram atestados pelo Laboratório de Controle de Qualidade Animal como isentos de agentes infecciosos capazes de causarem riscos à saúde humana. A prática do presente projeto foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da Universidade de Brasília (UnBDOC n°. 109434/2008, anexo 1).

## 4.2 Métodos

### 4.2.1 Manutenção dos animais

Os camundongos foram mantidos no biotério do Laboratório Nanogen (UnB), em gaiolas de plástico, com serragem, à temperatura controlada de 23°C, com ciclo claro/escuro de 12/12 horas e com fornecimento de água filtrada e de ração *ad libitum*.

Os camundongos foram distribuídos em três diferentes experimentos: animais sem tumor, para avaliação da toxicidade sistêmica das composições em estudo (**Experimento 1**), e animais inoculados com células tumorais, para avaliação dos efeitos anti-neoplásicos dos tratamentos (**Experimento 2** e **Experimento 3**).

### 4.2.2 Avaliação da toxicidade aguda – Experimento 1

Ao atingirem 12 semanas de vida, 20 camundongos foram pesados e distribuídos em quatro grupos experimentais, de modo a manter a massa corpórea homogênea em cada grupo. Os animais foram tratados com Rh<sub>2</sub>Cit, Magh-Rh<sub>2</sub>Cit (**Lote 2**) e Magh-Cit (**Lote 2**), em doses preparadas de acordo com a massa de cada camundongo, resultando em concentrações iguais de miligramas de citrato de ródio e de ferro por quilograma de massa corporal dentro de um mesmo grupo (**Tabela 3**). O tratamento foi realizado via intravenosa, em dose única, administrada na cauda, para verificação de possível toxicidade aguda no período de 48 horas. Para estabelecer o controle do experimento, foram utilizados animais sadios inoculados com 50 µL de solução salina. A toxicidade aguda foi avaliada por meio da observação da taxa de sobrevivência, dos exames de urina, hemograma e bioquímico e das análises histopatológicas do fígado e pulmão, conforme descrito nos tópicos 4.2.4.1 - 3.

**Tabela 3**– Concentrações de citrato de ródio e de ferro utilizadas nas composições de Rh<sub>2</sub>Cit, Magh-Rh<sub>2</sub>Cit e Magh-Cit durante o Experimento 1.

	Rh <sub>2</sub> Cit	Magh-Rh <sub>2</sub> Cit	Magh-Cit
	mg/kg	mg/kg	mg/kg
[Rh <sub>2</sub> Cit]	14,1	2,8	–
[Fe]	–	16,7	22,3

### 4.2.3 Avaliação do efeito antitumoral e toxicológico – Experimentos 2 e 3

#### 4.2.3.1 Cultura e manutenção das células tumorais

As células 4T1, estocadas em nitrogênio líquido, foram descongeladas uma semana antes do experimento, transferidas para frascos de 25 cm<sup>2</sup> (TPP, USA) e cultivadas em meio de cultura Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Sigma, St. Louis, MO) suplementado com 1% de penicilina e 10% de soro fetal bovino (SFB) em incubadora úmida a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>.

Para manutenção das células, foi realizado um repique para não atingir a confluência. Neste procedimento, elas foram desprendidas da garrafa por ação de 0,25% de tripsina-EDTA (Gibco, USA) mantida no meio por 3 minutos a 37 °C. A seguir, a tripsina foi neutralizada com DMEM e descartada após centrifugação. O meio de cultura foi repostado e as células foram mantidas nas condições descritas acima, até atingir quantidade celular suficiente para os experimentos *in vivo*. Para estabelecer o número de células viáveis desejado para os experimentos, foi realizada contagem em câmara de Neubauer, com auxílio do corante azul de tripan.

#### 4.2.3.2 Inoculação de células tumorais

Os animais com 9 a 12 semanas de vida foram anestesiados com solução de quetamina/xilazina, doses aproximadas de 15 mg/kg e 5 mg/kg, respectivamente, pesados e inoculados com  $2 \times 10^4$  células 4T1 na glândula mamária abdominal esquerda, em uma suspensão de 50 µL de meio DMEM sem SFB. O período de estabelecimento do tumor foi de sete dias (CARNEIRO *et al.*, 2010).

#### 4.2.3.3 Tratamentos

Os tratamentos foram realizados após o estabelecimento tumoral na glândula mamária. Para as aplicações, foi utilizada a via intravenosa, com 50 µL de solução administrada na cauda a cada quatro dias, totalizando três aplicações de Rh<sub>2</sub>Cit, Magh-Rh<sub>2</sub>Cit e Magh-Cit

(controle das NPs). As composições nanoparticuladas de Magh-Rh<sub>2</sub>Cit e Magh-Cit empregadas nos **Experimentos 2 e 3** foram referentes aos **Lotes 1 e 2**, respectivamente.

Na avaliação do efeito antitumoral e toxicológico do **Experimento 2**, os animais foram pesados e distribuídos aleatoriamente em cinco grupos experimentais, com oito camundongos cada: (1) sadio (controle negativo), (2) controle (controle tumor), (3) Rh<sub>2</sub>Cit, (4) Magh-Rh<sub>2</sub>Cit e (5) Magh-Cit. O grupo sadio foi composto por camundongos sem tumor e sem tratamento e o grupo controle, por animais portadores de tumor tratados com água destilada, solvente do citrato de ródio (II). Previamente a cada administração, a concentração de ferro e de citrato de ródio (II) das amostras foi calculada de acordo com a média das massas corpóreas de cada grupo de camundongos. Este procedimento resultou em concentrações similares entre si, calculadas em miligramas de ferro e de citrato de ródio por quilograma de massa corporal do animal. Devido às alterações de massa de cada animal, foram calculadas as concentrações médias de ferro e de citrato de ródio (II) para as três aplicações (**Tabela 4**).

Para o **Experimento 3**, 30 animais foram pesados e distribuídos nos grupos experimentais descritos acima, porém mantendo a massa corpórea homogênea em cada grupo. Em cada administração, a concentração de ferro e a de citrato de ródio (II) das amostras foram calculadas de acordo com as massas de cada camundongo, mensuradas antes da realização da respectiva aplicação. Assim, as concentrações, tanto de ferro quanto de citrato de ródio (II), permaneceram iguais em todos os camundongos tratados, já que foram calculadas em miligramas por quilograma de massa corporal do animal. Na **Tabela 5**, está descrita a concentração de ferro e de citrato de ródio (II) usada em cada tratamento. No **Experimento 3**, também foram utilizados grupos controle e sadio, contudo, nestes animais a inoculação foi realizada com solução salina.

**Tabela 4**– Média das concentrações de citrato de ródio e de ferro utilizadas ao longo do Experimento 2 nas composições de Rh<sub>2</sub>Cit, Magh-Rh<sub>2</sub>Cit e Magh-Cit.

	<b>Rh<sub>2</sub>Cit</b>	<b>Magh-Rh<sub>2</sub>Cit</b>	<b>Magh-Cit</b>
	<b>(mg/kg)</b>	<b>(mg/kg)</b>	<b>(mg/kg)</b>
<b>[Rh<sub>2</sub>Cit]</b>	0,5	0,5	–
<b>[Fe]</b>	–	14	14

**Tabela 5** – Concentrações de citrato de ródio e de ferro utilizadas nas composições de Rh<sub>2</sub>Cit, Magh-Rh<sub>2</sub>Cit e Magh-Cit durante o Experimento 3.

	<b>Rh<sub>2</sub>Cit</b>	<b>Magh-Rh<sub>2</sub>Cit</b>	<b>Magh-Cit</b>
	<b>(mg/kg)</b>	<b>(mg/kg)</b>	<b>(mg/kg)</b>
<b>[Rh<sub>2</sub>Cit]</b>	2,4	0,5	–
<b>[Fe]</b>	–	2,8	3,7

#### 4.2.4 Coleta de material

Após 48 horas (**Experimento 1**) e no 19º dia após o implante de células tumorais, quatro dias após o último tratamento (**Experimento 2 e 3**), os camundongos foram anestesiados, pesados, submetidos a coleta de sangue e eutanasiados por deslocamento cervical.

##### 4.2.4.1 Coleta de sangue para as análises hematológicas e bioquímicas

Uma alíquota de sangue, aproximadamente 1000 µL, foi coletada por punção cardíaca com auxílio de seringas descartáveis de 1 mL. O volume sanguíneo foi, então, separado em um minitubo para análise hematológica, com anticoagulante EDTA (ácido etilenodiaminotetracético bipotássico, 10%), e em outro para a análise bioquímica, com gel separador de soro sanguíneo. Para hematologia, o sangue foi cuidadosamente homogeneizado por inversão, logo após a coleta e, em seguida, foi mantido a 4°C. Para a separação do soro, o segundo minitubo foi centrifugado (4000 rpm) por 10 minutos a 4°C.

Os testes bioquímicos (**Experimentos 1, 2 e 3**) e o hemograma (**Experimento 2**) foram realizados pelo laboratório clínico Sabin, que contribuiu em parceria com o presente projeto. As análises do hemograma dos **Experimentos 1 e 3** foram realizados no Laboratório Nanogen (UnB).

Os valores obtidos das análises do sangue de camundongos saudáveis foram adotados como referência para comparações hematológicas e bioquímicas com os demais grupos. Isso se deve à necessidade da existência de um grupo controle da mesma linhagem, idade, sexo e

estado de saúde, que estejam sob as mesmas condições ambientais (ciclo claro/escuro de 12/12 horas, temperatura de 23°C, água filtrada e ração *ad libitum*) dos animais portadores de carcinoma mamário. Os valores de referência descritos na literatura para camundongos BALB/c também foram considerados (VIANA, 2007).

O plasma sanguíneo foi obtido de amostras de sangue de camundongos sadios e de portadores de carcinoma mamário sem tratamento (controle) ou tratados com Rh<sub>2</sub>Cit, Magh-Rh<sub>2</sub>Cit e Magh-Cit. Para as dosagens de creatinina, transaminase pirúvica (TGP) e ferro sérico foram utilizados, respectivamente, os métodos colorimétrico (Jaffe), cinético otimizado U.V. e ferrozine.

A partir do eritrograma, foram estabelecidos os valores de hemácias, de hemoglobina (HGB), do hematócrito (HCT), do volume corpuscular médio (VCM), da hemoglobina corpuscular média (HCM), da concentração hemoglobínica corpuscular média (CHCM) e do coeficiente de variação da distribuição do tamanho de hemácias (RDW-CV).

Na avaliação do plaquetograma e do leucograma foi medida a quantidade de plaquetas e de leucócitos totais, em um milímetro cúbico de sangue. Nessa análise, foi estabelecida, ainda, a proporção dos diferentes glóbulos brancos, incluindo os linfócitos, os neutrófilos e monócitos, e os eosinófilos.

#### 4.2.4.2 Coleta de urina para exame de rotina

No **Experimento 1**, os camundongos foram manuseados sobre parafilme estéril, até liberação completa da urina (KURIEN & SCOFIELD, 1999). Esta foi coletada com auxílio de pipeta, e mantida em microtubos, a 4°C, até a análise. O exame de rotina da urina – EAS (elementos anormais e sedimento) foi realizado pelo laboratório clínico Sabin.

Para análises de bioquímica urinária, foi utilizado o equipamento Urisys 2400, que mensura a densidade da urina por densitometria e realiza a reflectância para avaliar os parâmetros pH e presença de proteínas, glicose, corpos cetônicos, bilirrubinas, hemoglobina, nitritos e urobilinogênio. Os elementos urinários (Leucócitos, Hemácias, Cilindros, Bactérias, Células Epiteliais) foram analisados no equipamento UF 1000, tendo como metodologia a Citometria de Fluxo.

#### 4.2.4.3 Coleta do tumor e dos órgãos

Depois de submetidos à eutanásia, os camundongos tiveram sua cavidade abdominal exposta para se observar a localização do tumor próximo à mama. Com auxílio de instrumentos cirúrgicos, o tumor foi rapidamente coletado, medido, fotografado e dividido em tamanhos próximos a 1 cm para a análise em microscopia de luz. No **Experimento 2**, os tumores foram mensurados com paquímetro, para obtenção dos parâmetros comprimento, largura e espessura. Para calcular o volume tumoral, foi utilizada a fórmula abaixo, conforme descrito por Kukowska-Latallo *et al.* (2005). No **Experimento 3**, os tumores e os baços foram pesados para verificação da redução tumoral e produção linfocitária, respectivamente.

$$\text{Volume} = (\text{comprimento} \times \text{largura}^2 \times 0,52) \text{ mm}^3$$

Os tumores e órgãos coletados (tecido mamário, pulmão e fígado) foram lavados em tampão PBS (solução tamponada de fosfato) 0,1 M. Os tecidos tumorais foram fixados por 4 horas à temperatura ambiente, com solução de paraformaldeído 4% diluído em PBS. Já os órgãos, foram mantidos por 24 horas com solução de Davidson (40 mL de glicerina, 80 mL de formol 40%, 120 mL de etanol 95%, 120 mL de água destilada, 36 mL de ácido acético). Em seguida, o material foi armazenado a 4°C em álcool 70%.

#### 4.2.4.4 Coleta da medula óssea

Logo após a retirada dos órgãos, foi coletada a medula óssea dos fêmures dos camundongos. Para isso, as epífises foram seccionadas e a medula óssea foi depositada em tubos para centrifugação, mediante lavagem do fêmur com 1 mL de SFB, utilizando-se de uma agulha acoplada a uma seringa. Posteriormente, as células da medula óssea foram centrifugadas por três minutos (2500 rpm) a 8°C, fixadas em 1 mL de etanol 70% (8°C) e armazenadas a 0°C por 24 horas.

#### 4.2.5 Microscopia de luz

Todas as amostras armazenadas em etanol 70% foram desidratadas com 80%, 90% e 100% (2 banhos) de álcool anidro hidratado. Em seguida, foram diafanizadas em solução de

etanol e xileno (1:1) e em 3 banhos de xileno 100%, infiltradas em parafina (2 banhos) e emblocadas em fôrmas de metal (3 cm × 3 cm), até resfriamento à temperatura ambiente. Para cada solução, as amostras foram submetidas à agitação contínua durante 1 hora.

Os cortes histológicos (3 a 5 µm) foram realizados em micrótomo, modelo Leica RM2235. As secções foram distendidas, previamente, em álcool 30% e, depois, em banho-maria, a 50°C, para serem coletadas com lâminas de vidro. Estas foram mantidas em estufa, a 37°C, por 12 horas.

Para coloração, os cortes histológicos foram reidratados durante 60 segundos, em três banhos de xileno 100% e em concentrações decrescentes de etanol (100 a 70%). Em seguida, foram corados com hematoxilina e eosina por 50 segundos. A desidratação foi feita com soluções crescentes de etanol e xileno 100% (60 segundos cada banho) e as lâminas foram recobertas por lamínulas, utilizando-se Entellan® como meio de montagem, e secadas em estufa (37°C) por 12 horas. As lâminas foram fotografadas com câmera fotográfica (MC 80 DX), acoplada ao microscópio de luz modelo Zeiss Axiophot.

Mudanças nos tecidos do fígado de camundongos dos **Experimentos 1, 2 e 3** foram avaliadas através do Índice de Alterações Histopatológicas-**IAH**, que é baseado na gravidade das lesões e na possibilidade de recuperação. Para cálculo do **IAH** (modificado por POLEKSIĆ & MITROVIĆ-TUTUNDŽIĆ, 1994), alterações hepáticas foram classificadas em três estágios progressivos de insuficiência funcional hepática: **estágio I** = mudanças que não danificam o tecido do fígado de forma irreversível; **estágio II** = mudanças reparáveis, que são mais graves, afetando a função dos tecidos associados; **estágio III** = mudanças que impedem o restabelecimento da estrutura funcional do fígado, mesmo com a mudança do ambiente ou suspensão do tratamento com quimioterápico e nanopartículas.

O **IAH** foi calculado pela soma do número de tipos de lesões em cada um dos três estágios e multiplicado pelo índice do estágio, utilizando-se a seguinte equação matemática proposta por Poleksić e Mitrovic-Tutundžić (1994):  $IAH = (1 \times \Sigma I) + (10 \times \Sigma II) + (100 \times \Sigma III)$ , onde I, II e III, representam o número de lesões de fase I, II e III, respectivamente.

O valor obtido de cada **IAH** dos camundongos foi utilizado para calcular o índice médio de cada grupo de animais sadio, controle e tratados com Rh<sub>2</sub>Cit, Magh-Rh<sub>2</sub>Cit e Magh-Cit. As médias do **IAH** foram divididas em cinco categorias, conforme proposto por Langiano e Martinez (2008): **0-10**: fígado funcionalmente normal; **11-20**: fígado ligeiramente a moderadamente danificado; **21-50**: fígado moderadamente a fortemente danificado; **51-100**: fígado severamente danificado; acima de **100**: fígado danificado de forma irreparável.

As mensurações histométricas foram realizadas no Programa Image Pro-Plus 6.0 (Media Cybernetics, Silver Spring, EUA/Microsoft® Windows 32-bit Systems Window® XP Vista). As imagens geradas foram obtidas com objetiva de 40X, a partir de secções histológicas do fígado de três camundongos de cada grupo experimental. Dessa forma, foram adquiridas três imagens de campos diferentes de uma mesma secção, escolhida aleatoriamente em cada lâmina histológica. Assim, foram registradas três fotomicrografias do fígado por animal, nove para cada grupo (sadio, controle e tratados com Rh<sub>2</sub>Cit, Magh-Rh<sub>2</sub>Cit e Magh-Cit), totalizando 45 imagens para os **Experimentos 2 e 3**, e 36 para o **Experimento 1** (sem o grupo controle). A quantificação dos hepatócitos foi obtida por meio de análises de 10 células em cada imagem, escolhidas aleatoriamente para quantificar os parâmetros de volume, área e diâmetro. Ao todo, as mensurações foram realizadas em 90 hepatócitos de cada grupo, com adaptações dos trabalhos de Vertemati *et al.* (2008) e Golalipour *et al.* (2009) (**Tabela 6**).

As mensurações volumétricas foram estimadas através de estudos realizados por Ke *et al.* (2008), em que os autores consideraram o hepatócito como uma esfera com volume  $V = 4/3\pi R^3$ , onde o cálculo do raio (R) se dá pela fórmula  $A = \pi R^2$ . Todos os cálculos foram realizados a partir dos valores encontrados pela utilização das ferramentas disponíveis no programa Image Pro-Plus 6.0.

**Tabela 6** - Parâmetros adotados para análise histomorfométrica no fígado de camundongos fêmeas BALB/c.

Mensurações Histométricas		
Volume	Área	Diâmetro
	AH = média	DH = média - DH maior+DH menor
$VH = 4/3\pi R^3$ (R = $AH*\pi^2$ )	AC = média-(AH-An)	
	An = média	Dn = média - Dn maior+Dn menor
$VC = 4/3\pi R^3$ (R = $AC*\pi^2$ )		
$Vn = 4/3\pi R^3$ (R = $An*\pi^2$ )	RH = média (AC/An)	

VH = volume hepatócito; VC = volume citoplasma; Vn = volume núcleo; AH = área hepatócito; AC = área citoplasma; An = área núcleo; RH = razão hepatócito; DH = diâmetro hepatócito; Dn = diâmetro núcleo.

#### 4.2.6 Avaliação genotóxica

A avaliação genotóxica foi realizada apenas com os animais do **Experimento 3**. As células obtidas da medula óssea armazenadas em álcool 70% foram homogeneizadas. Um volume de 75 µL de células foi centrifugado (2500 rpm por 3 minutos a 8°C), o sobrenadante foi descartado e as células foram lavadas com 500 µL de PBS, para remoção completa do etanol. Prosseguiu-se com a incubação celular, por 30 minutos no escuro (temperatura ambiente), em 200 µL de tampão de lise contendo 0,1% de citrato de sódio, 0,1% de Triton X-100 e 20 µg/mL de iodeto de propídeo.

As análises de fragmentação de DNA foram feitas em citômetro de fluxo (CyFlow space/Partec), no canal FL-2 (sensível a detecções na faixa de 560 e 580 nm). Os dados obtidos foram analisados com o programa FloMax Software. A determinação da fragmentação do DNA foi realizada de acordo com protocolo descrito por Peres (2005).

#### 4.2.7 Estatística

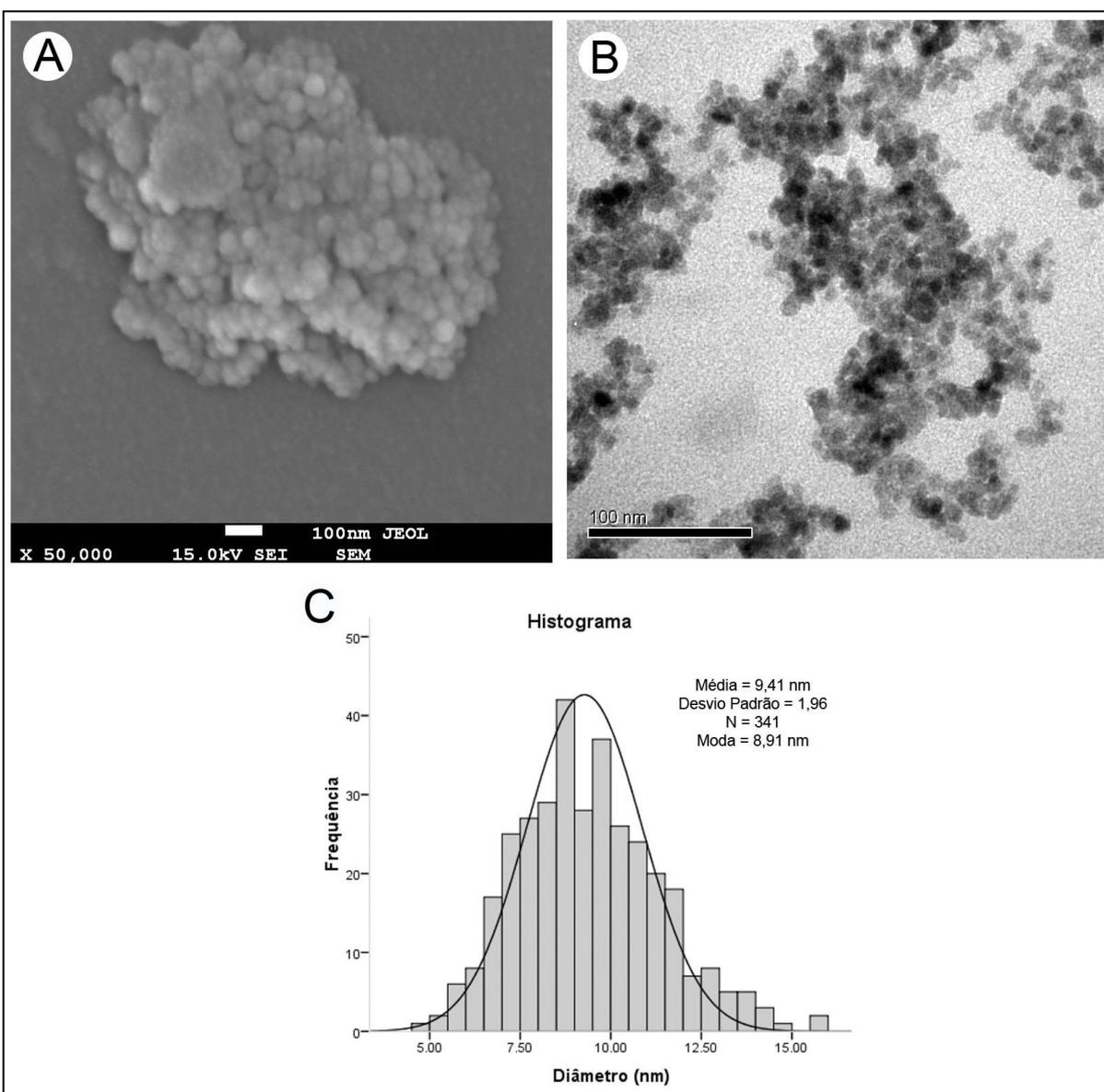
As análises estatísticas foram realizadas pelo programa SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) versão 15.0. Os dados foram apresentados pela média  $\pm$  EPM (erro padrão da média) e os valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos. As variáveis contínuas foram testadas para a distribuição normal com o teste de Shapiro-Wilk. Diferenças entre os grupos, referentes aos dados com distribuição normal, foram comparadas por ANOVA. Já para dados sem distribuição normal, foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis a fim de identificar diferença estatística. Para resultados significantes de ANOVA e de Kruskal-Wallis, foram usados, respectivamente, o pós-teste de Bonferroni e o teste de Mann-Whitney U para verificar as diferenças entre os tratamentos (comparações 2 a 2).

Para as análises histométricas do fígado, os resultados obtidos foram expressos na forma de média, desvio padrão e erro padrão da média. Para as análises de variância, utilizou-se ANOVA com nível de significância ( $\alpha = 0,05$ ) e teste de Tukey por meio do programa PDF Word Count & Frequency Statistics Software 7.0. Os gráficos foram realizados pelo programa Microsoft Office Excel 2007.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Caracterização das nanopartículas associadas com citrato de ródio (II) - Lote 2

As NPs associadas com citrato de ródio (II) apresentaram 158,7 nm de diâmetro hidrodinâmico, com índice de polidispersividade 21% e potencial zeta -48,5 mV. Agregados de NPs apresentaram morfologia esférica (Figura 6 A) com diâmetro modal de 8,91 nm (Figura 6 B e C).



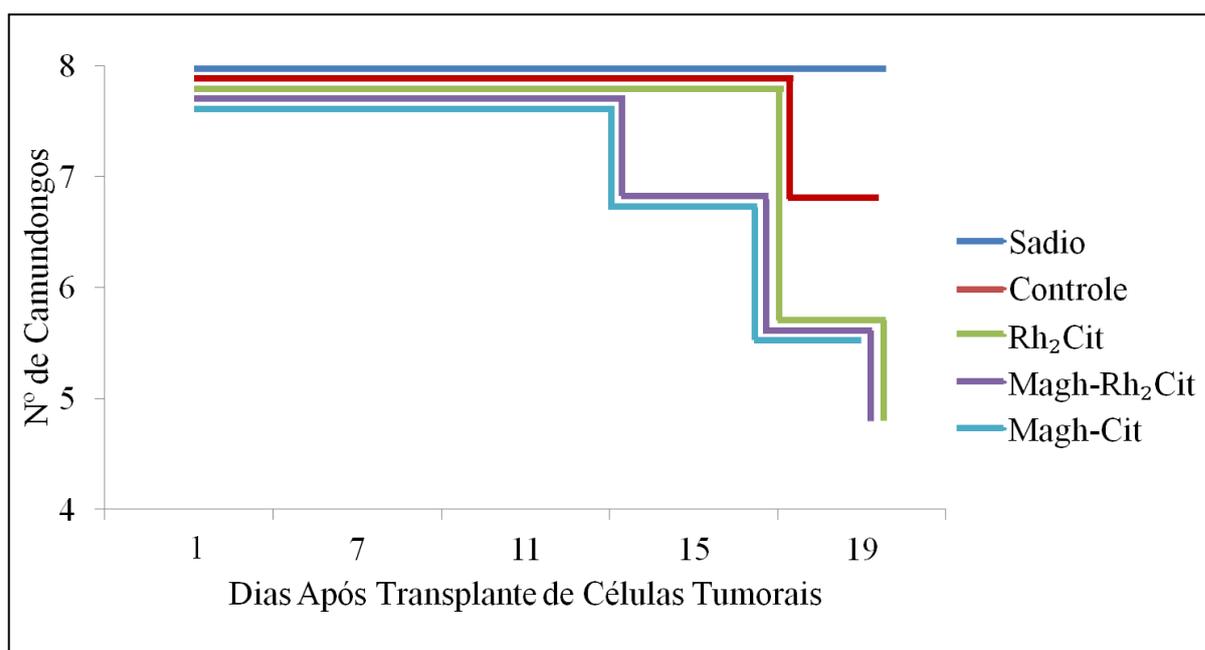
**Figura 6:** Caracterização morfológica e mensuração de nanopartículas de maghemita associada com citrato de ródio (II) ( $\text{Magh-Rh}_2\text{Cit}$ ) do Lote 2. A) Agregado de  $\text{Magh-Rh}_2\text{Cit}$  com morfologia esférica visualizada por microscopia eletrônica de varredura. B) Micrografia de  $\text{Magh-Rh}_2\text{Cit}$  visualizada por microscopia eletrônica de transmissão. C) Histograma do diâmetro de 341 NPs resultando em uma média de 9,41 nm e moda de 8,91 nm.

## 5.2 Análises clínicas

### 5.2.1 Sobrevida

Na avaliação de toxicidade aguda (**Experimento 1**), a maior concentração de Rh<sub>2</sub>Cit (14,1 mg/kg), bem como os demais tratamentos, não resultaram em morte de camundongos, observando-se 100% de sobrevida no período de 48 horas.

No **Experimento 2**, observou-se, após o segundo tratamento, o óbito de um animal tratado com Magh-Rh<sub>2</sub>Cit e com Magh-Cit. Após o 3º tratamento, verificou-se, em diferentes dias até a eutanásia, morte de camundongos de todos os grupos portadores de carcinoma mamário, resultando em um número amostral mínimo de 5 animais para as demais análises estatísticas. Na **Figura 7**, são demonstrados os óbitos ocorridos de acordo com os dias após o implante de células tumorais. No grupo de animais sadios, verificou-se 100% de sobrevida.



**Figura 7:** Óbitos dos camundongos ocorridos durante o Experimento 2.

No **Experimento 3**, observou-se a morte de um camundongo tratado com Rh<sub>2</sub>Cit e de outro com Magh-Rh<sub>2</sub>Cit, respectivamente a quatro e um dia após o término dos tratamentos. Tal fato resultou em um número amostral mínimo de 5 animais em cada grupo, para a realização das análises estatísticas.

### 5.2.2 Avaliação da massa corporal dos camundongos

Nos animais do **Experimento 1**, não foram observadas mudanças significativas na massa corporal dos camundongos de um mesmo grupo. No entanto, foi verificada diferença significativa entre os grupos (**Figura 8**).

A diferença de peso dos camundongos submetidos a diferentes tratamentos deve-se à maneira como eles foram agrupados: animais de massas próximas foram reunidos em um mesmo grupo, produzindo um erro padrão reduzido. Assim, dentro de um mesmo tratamento, foram mantidos camundongos com massas homogêneas entre si. Isso resultou em pesos diferentes entre os grupos, o que não refletiu em erro, já que os tratamentos foram realizados de acordo com a massa de cada camundongo.

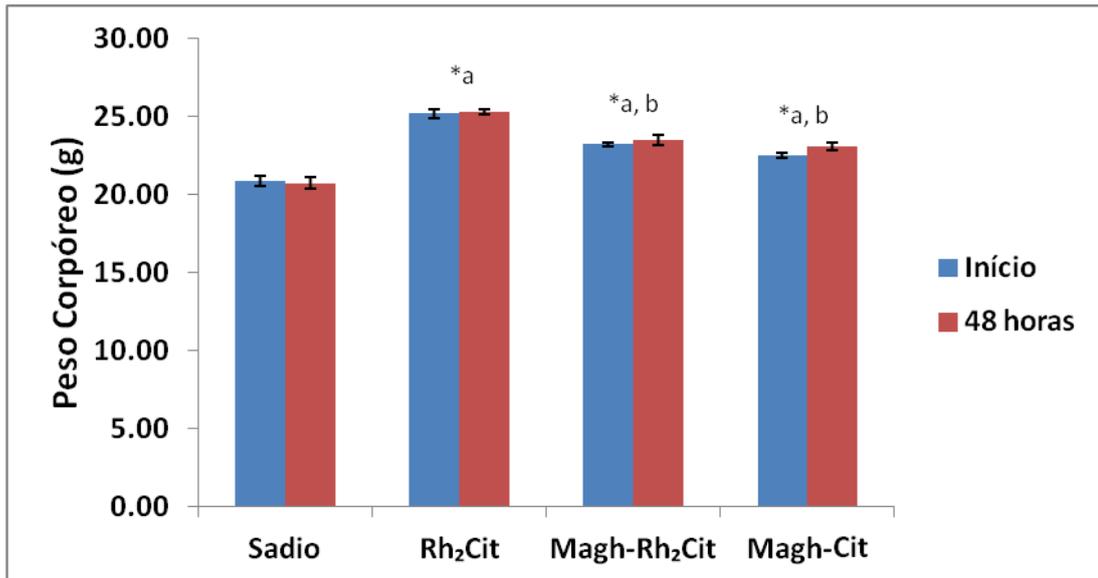
Nos **Experimentos 2 e 3**, os animais foram pesados antes do implante de células tumorais, durante os tratamentos e no dia da eutanásia.

Não foram observadas mudanças significativas na massa corporal dos animais de um mesmo grupo ao longo dos tratamentos do **Experimento 2** (**Figura 9**). A diferença de peso entre os grupos e o alto erro padrão deve-se ao modo aleatório como os animais foram agrupados. Nesse sentido, foram mantidos grupos de massas heterogêneas entre si, resultando em diferenças não significativas dos pesos entre os grupos e ao longo dos tratamentos.

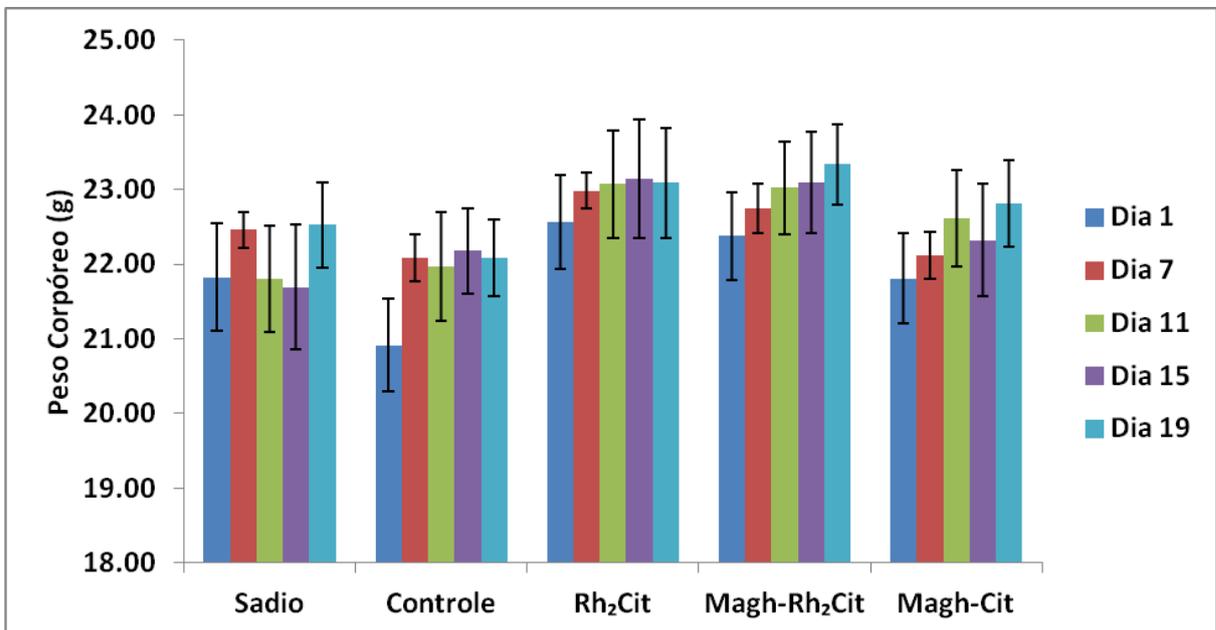
No **Experimento 3**, foram observadas diferenças significativas na massa corporal dos animais de diferentes grupos experimentais e entre camundongos de um mesmo grupo ao longo dos dias (**Figura 10**).

Assim como no **Experimento 1**, a diferença encontrada no peso entre animais de tratamentos distintos deve-se ao modo como eles foram distribuídos, ou seja, camundongos de massas semelhantes foram reunidos em um mesmo grupo. Como consequência, os pesos entre os grupos foram divergentes, não refletindo, contudo, em erro, já que os tratamentos foram realizados de acordo com a massa de cada camundongo.

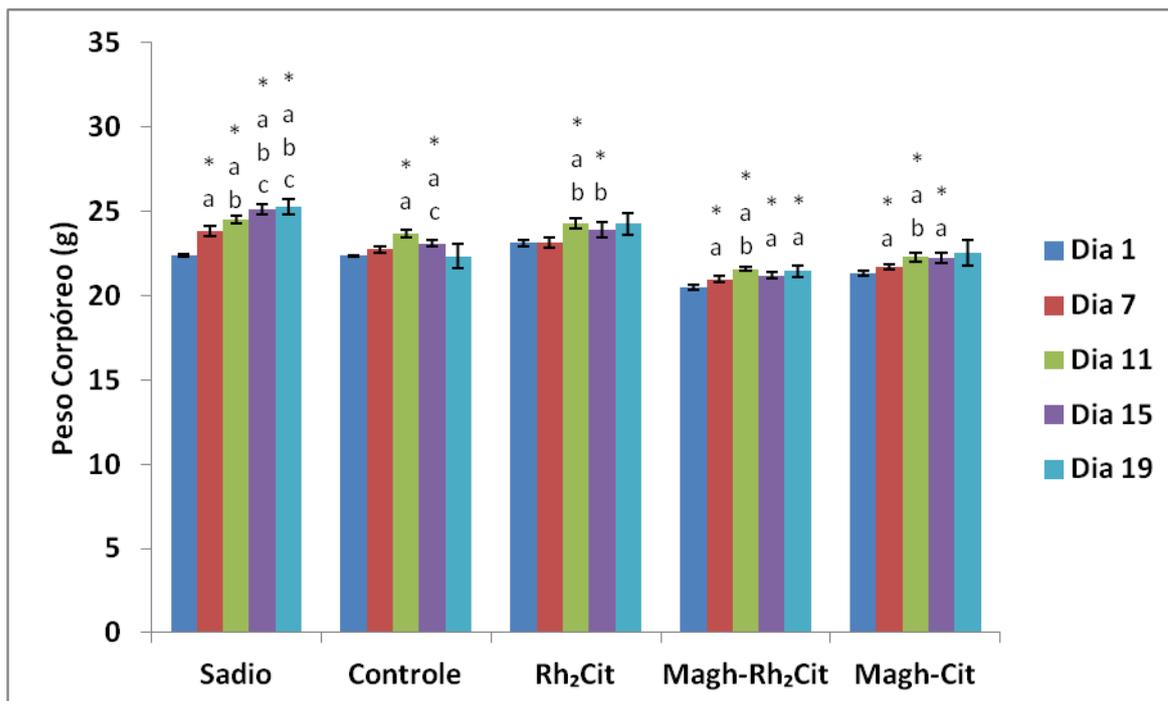
Além disso, observou-se um aumento contínuo da massa dos animais sadios e tratados com Rh<sub>2</sub>Cit, Magh-Rh<sub>2</sub>Cit e Magh-Cit durante o experimento. No grupo controle, entretanto, verificou-se aumento do peso somente até o 11º dia do implante tumoral, havendo, em seguida, uma redução significativa da massa dos animais.



**Figura 8:** Peso corpóreo dos camundongos do Experimento 1. A massa corporal dos animais de um mesmo grupo não apresentou variação significativa após 48 horas do tratamento. Dados correspondem a valores da média  $\pm$  erro padrão e os testes de diferença estatística foram gerados por ANOVA. As letras minúsculas indicam diferenças significativas entre os grupos nas comparações 2-a-2, detectadas pelos testes de Bonferroni, sendo a = significativo comparado ao sadio e b = significativo comparado ao Rh<sub>2</sub>Cit. Os asteriscos indicam diferenças significativas (\* $p < 0,05$ ).



**Figura 9:** Peso corpóreo dos camundongos ao longo do Experimento 2. A massa corporal dos camundongos não apresentou variação significativa durante os tratamentos. Os animais foram pesados antes do implante de células tumorais (dia 1), no decorrer dos tratamentos (dias 7, 11 e 15) e antes da eutanásia (dia 19). Dados correspondem a valores da média  $\pm$  erro padrão e os testes de diferença estatística foram gerados por ANOVA.

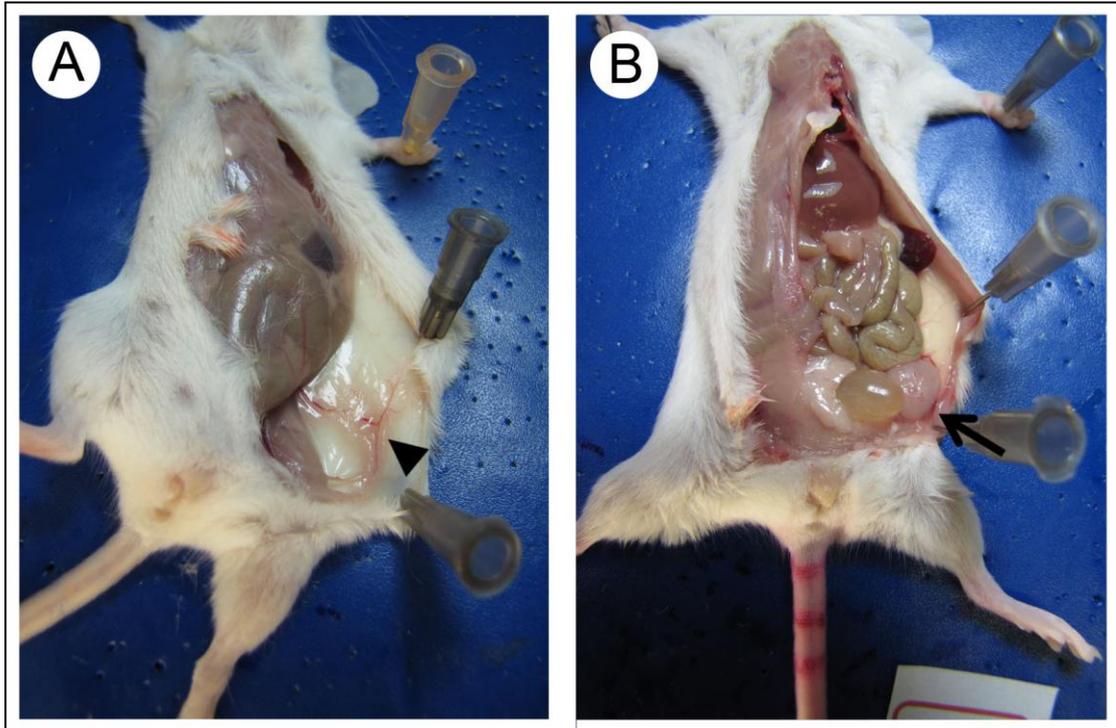


**Figura 10:** Peso corpóreo dos camundongos ao longo do Experimento 3. A massa corporal dos camundongos apresentou variação significativa durante os tratamentos. Os animais foram pesados antes do implante de células tumorais (dia 1), no decorrer dos tratamentos (dias 7, 11 e 15) e antes da eutanásia (dia 19). Dados correspondem a valores da média  $\pm$  erro padrão e os testes de diferença estatística foram gerados por ANOVA. As letras minúsculas indicam diferenças significativas nas comparações 2-a-2 detectadas pelos testes de Bonferroni, sendo a = significativo comparado ao sadio, b = significativo comparado ao controle e c = significativo comparado ao Rh<sub>2</sub>Cit. Os asteriscos indicam diferenças significativas (\* $p < 0,05$ ).

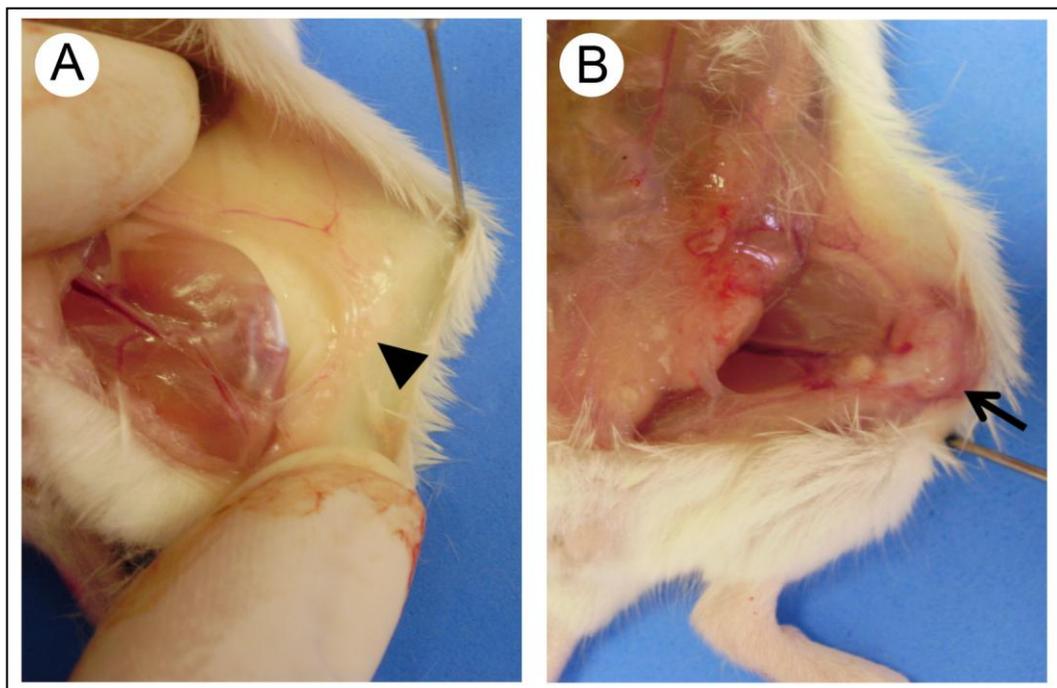
### 5.2.3 Avaliação do crescimento do tumor na mama

Na **Figura 11 A**, observou-se a mama de um camundongo sadio, enquanto na **Figura 11 B** (controle), verificou-se a presença de um tumor bem delimitado na mesma região da glândula mamária, demonstrando o sucesso do implante tumoral no **Experimento 2**.

O implante tumoral no **Experimento 3** também foi realizado com êxito. Na **Figura 12 A**, observou-se a mama de um camundongo sadio enquanto na **Figura 12 B** (controle) verificou-se a presença de um tumor localizado na região da glândula mamária.



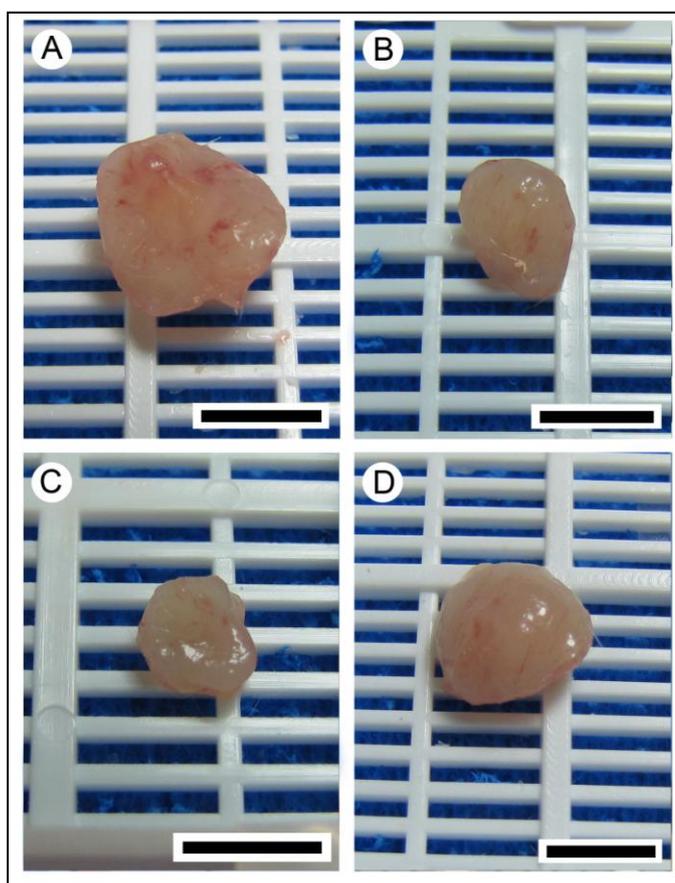
**Figura 11:** Estabelecimento do tumor no Experimento 2. Camundongos fêmeas BALB/c sacrificados 19 dias após o implante de células tumorais na glândula mamária. A) Animal sadio (sem tumor e sem tratamento). B) Animal portador de carcinoma mamário formado pela inoculação de  $2 \times 10^4$  células 4T1 na glândula mamária abdominal esquerda. A cabeça de seta e a seta indicam, respectivamente, a glândula mamária normal e o tumor formado na mama.



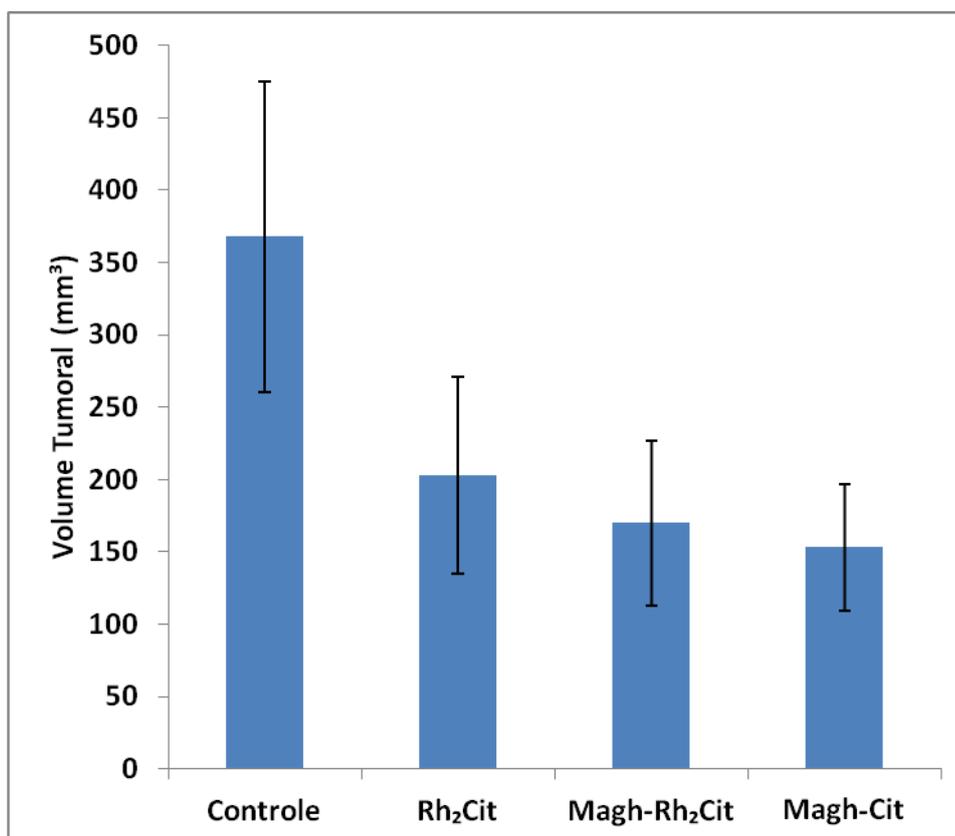
**Figura 12:** Estabelecimento do tumor no Experimento 3. Camundongos fêmeas BALB/c sacrificados 19 dias após o implante de células tumorais na glândula mamária. A) Animal sadio (sem tumor e sem tratamento). B) Animal portador de carcinoma mamário formado pela inoculação de  $2 \times 10^4$  células 4T1 na glândula mamária abdominal esquerda. A cabeça de seta e a seta indicam, respectivamente, a glândula mamária normal e o tumor formado na mama.

#### 5.2.4 Mensuração dos tumores

Os tumores formados durante o **Experimento 2 (Figuras 13 A-D)** apresentaram morfologia esférica bem delimitada e consistência maciça. Foi observada, ainda, uma redução aparente dos tumores dos grupos tratados (**Figura 13 B-D**) comparada ao controle (**Figura 13 A**). Nesse sentido, os tumores foram mensurados com paquímetro e os volumes obtidos foram comparados, resultando em uma redução da média do volume tumoral dos camundongos tratados em relação ao grupo controle, sem, no entanto, apresentar diferença significativa (**Figura 14**).

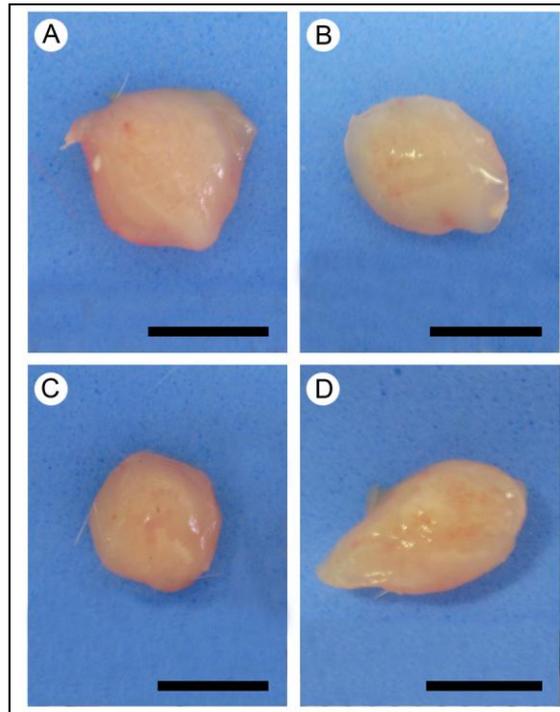


**Figura 13:** Fotografias dos tumores excisados de camundongos BALB/c sacrificados 19 dias após o implante de células tumorais na glândula mamária (Experimento 2). A) Tumor de camundongos controle sem tratamento (água destilada). B) Tratados com Rh<sub>2</sub>Cit. C) Tratados com Magh-Rh<sub>2</sub>Cit. D) Tratados com Magh-Cit. As barras pretas estão em escala e representam 0,5 cm.

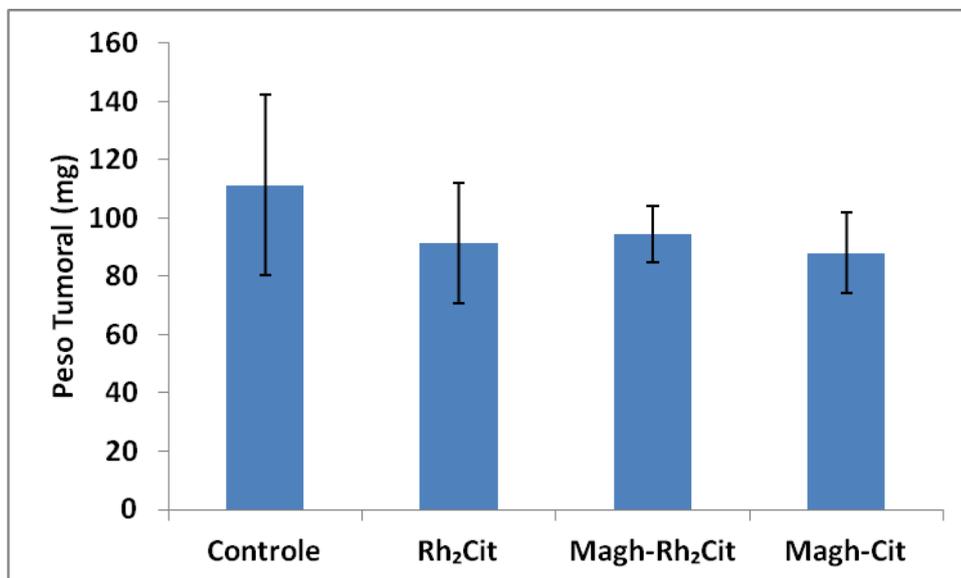


**Figura 14:** Volume tumoral dos camundongos do Experimento 2. Os tratamentos com Rh<sub>2</sub>Cit, Magh-Rh<sub>2</sub>Cit e Magh-Cit causaram uma redução não significativa, em relação ao controle, no volume tumoral de camundongos BALB/c. O volume tumoral foi estimado pela fórmula: comprimento x largura<sup>2</sup> x 0,52. Dados correspondem a valores da média ± erro padrão (n=5).

Os tumores formados no **Experimento 3 (Figuras 15 A-D)** apresentaram morfologia aproximadamente esférica, bem delimitada, e consistência maciça. Observou-se pouca diferença no tamanho tumoral, desse modo, optou-se por analisar o peso de cada tumor. Na **Figura 16**, observa-se uma redução não significativa da média das massas tumorais dos camundongos tratados em relação ao controle.



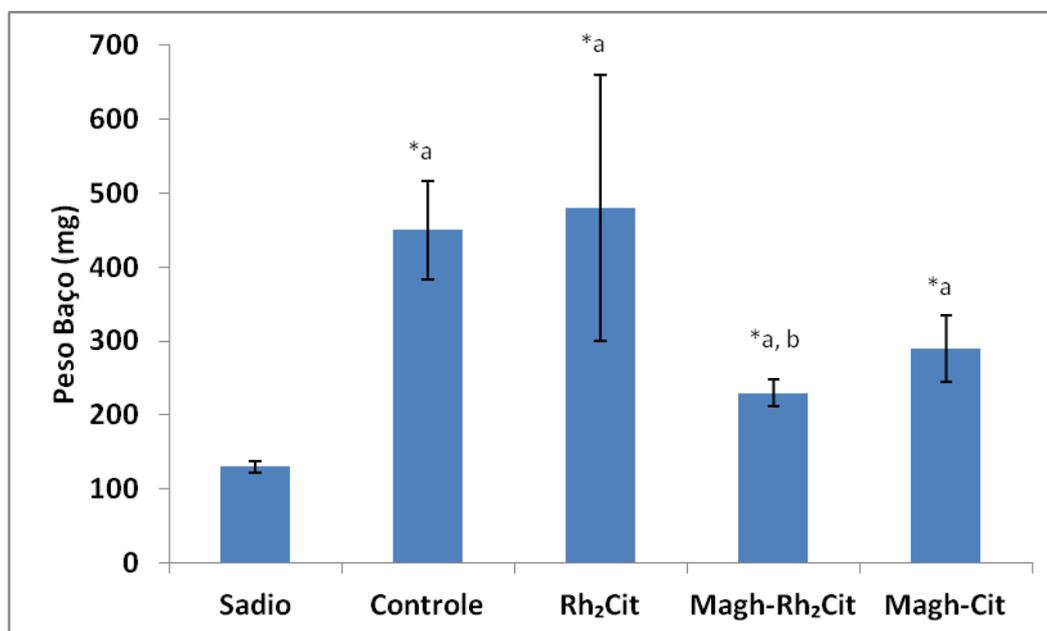
**Figura 15:** Fotografias dos tumores excisados de camundongos BALB/c sacrificados 19 dias após o implante de células tumorais na glândula mamária (Experimento 3). A) Tumor de camundongos controle sem tratamento (solução salina). B) Tratados com Rh<sub>2</sub>Cit. C) Tratados com Magh-Rh<sub>2</sub>Cit. D) Tratados com Magh-Cit. As barras pretas estão em escala e representam 0,5 cm.



**Figura 16:** Peso tumoral dos camundongos do Experimento 3. Os tratamentos com Rh<sub>2</sub>Cit, Magh-Rh<sub>2</sub>Cit e Magh-Cit causaram uma redução não significativa, em relação ao controle, no peso tumoral de camundongos BALB/c. O peso do tumor foi mensurado logo após sua excisão do camundongo. Dados correspondem a valores da média ± erro padrão (n=5).

### 5.2.5 Peso Baço

Os baços coletados de cada camundongo do **Experimento 3** foram pesados para avaliar a sua função na presença do tumor ao longo dos tratamentos. Foi constatado um aumento significativo, em relação ao sadio, da massa dos baços de todos os grupos de camundongos portadores de tumor. Observou-se, entretanto, que os animais tratados com Magh-Rh<sub>2</sub>Cit e Magh-Cit apresentaram baço com peso significativamente menor que o do controle. No grupo Rh<sub>2</sub>Cit, verificou-se uma elevada variação do peso do baço dos camundongos (**Figura 17**).



**Figura 17:** Peso do baço dos camundongos do Experimento 3. A presença do tumor em camundongos BALB/c refletiu em um aumento significativo no peso do baço em relação ao sadio. O peso do baço foi mensurado logo após sua excisão do camundongo. Dados correspondem a valores da média ± erro padrão e os testes de diferença estatística foram gerados por ANOVA (n=5). Os asteriscos indicam diferenças significativas (\*p<0,05) nas comparações 2-a-2 detectadas pelos testes de Bonferroni, sendo a = significativo comparado ao sadio e b = significativo comparado ao controle.

## 5.3 Análises hematológicas e bioquímicas

### 5.3.1 Testes bioquímicos

As médias e o erro padrão dos valores bioquímicos obtidos após 48 horas dos tratamentos realizados no **Experimento 1** estão representados na **Tabela 7**. Os níveis de TGP

apresentaram redução significativa no grupo tratado com Rh<sub>2</sub>Cit em relação aos sadios e aos tratados com Magh-Rh<sub>2</sub>Cit. Não foram observadas alterações significativas nos valores da creatinina em nenhum dos tratamentos. As dosagens de ferro sérico exibiram um aumento significativo nos camundongos tratados com Rh<sub>2</sub>Cit e com Magh-Rh<sub>2</sub>Cit em relação aos sadios.

**Tabela 7** – Níveis bioquímicos de transaminase glutâmico pirúvica (TGP), creatinina e ferro sérico dosados no soro de camundongos BALB/c fêmeas após 48 horas do tratamento via intravenosa com Rh<sub>2</sub>Cit, Magh-Rh<sub>2</sub>Cit e Magh-Cit no Experimento 1.

<b>Tratamento</b>	<b>TGP (U/L)</b>	<b>Creatinina (mg/dL)</b>	<b>Ferro Sérico (µg/dL)</b>
<b>Sadio</b>	42,2±6,26	0,40±0,05	131,4±6,12
<b>Rh<sub>2</sub>Cit</b>	27,4±0,93 <sup>*a</sup>	0,34±0,04	159,8±14,11 <sup>*a</sup>
<b>Magh-Rh<sub>2</sub>Cit</b>	32,5±1,19 <sup>*b</sup>	0,33±0,03	162,0±5,70 <sup>*a</sup>
<b>Magh-Cit</b>	32,3±3,31	0,30±0,03	161,3±26,57
<b>P-valores</b>	0,101	0,383	0,158

Os dados correspondem à média e ao erro padrão da média (EPM). TGP = transaminase glutâmico pirúvica; U/L = unidades por litro; mg/dL = miligramas por decilitro; µg/dL = microgramas por decilitro. Os p-valores de ferro sérico foram gerados por ANOVA, enquanto que os p-valores de TGP e de creatinina foram gerados pelo teste de Kruskal-Wallis. As letras minúsculas indicam diferenças significativas nas comparações 2-a-2 detectadas pelos testes de Bonferroni (ferro sérico) ou Mann-Whitney (creatinina), sendo a = significativo comparado ao grupo sadio; b = significativo comparado ao grupo Rh<sub>2</sub>Cit. Os asteriscos indicam diferenças significativas (\*p<0,05).

As médias e o erro padrão dos valores bioquímicos obtidos no **Experimento 2** estão representados na **Tabela 8**.

Os níveis de TGP dos animais não apresentaram diferença estatística entre as composições utilizadas durante o tratamento e nem comparadas aos grupos controle e sadio.

A concentração de creatinina em todos os grupos portadores de carcinoma mamário apresentou uma redução significativa em relação aos camundongos sadios. Os tratamentos realizados não provocaram alteração significativa nos níveis de creatinina, já que não houve diferença estatística entre os grupos tratados comparados ao controle.

As dosagens de ferro sérico exibiram uma redução não significativa nos camundongos portadores de carcinoma mamário tratados com Magh-Rh<sub>2</sub>Cit e Magh-Cit em relação ao grupo sadio. No entanto, ao se comparar as concentrações de ferro sérico dos animais dos grupos controle e Rh<sub>2</sub>Cit, verifica-se uma redução significativa aos dos animais sem tumor.

Todavia, nos animais tratados com Rh<sub>2</sub>Cit essa redução é menos evidente, sendo maior no grupo controle.

**Tabela 8** – Níveis bioquímicos de transaminase glutâmico pirúvica (TGP), creatinina e ferro sérico dosados no soro de camundongos BALB/c fêmeas portadores de carcinoma mamário tratados via intravenosa com Rh<sub>2</sub>Cit, Magh-Rh<sub>2</sub>Cit e Magh-Cit no Experimento 2.

<b>Tratamento</b>	<b>TGP (U/L)</b>	<b>Creatinina (mg/dL)</b>	<b>Ferro sérico (µg/dL)</b>
<b>Sadio</b>	32,40 ± 3,04	0,40 ± 0,00	180,80 ± 7,37
<b>Controle</b>	24,29 ± 2,88	0,21 ± 0,01 <sup>*a</sup>	130,00 ± 7,21 <sup>*a</sup>
<b>Rh<sub>2</sub>Cit</b>	30,20 ± 3,25	0,22 ± 0,02 <sup>*a</sup>	133,80 ± 13,43 <sup>*a</sup>
<b>Magh-Rh<sub>2</sub>Cit</b>	23,00 ± 0,89	0,20 ± 0,00 <sup>*a</sup>	148,40 ± 12,09
<b>Magh-Cit</b>	31,00 ± 2,71	0,22 ± 0,02 <sup>*a</sup>	161,33 ± 4,59
<b>P-valores</b>	0,087	0,001	0,004

Os dados correspondem à média e ao erro padrão da média (EPM). TGP = transaminase glutâmico pirúvica; U/L = unidades por litro; mg/dL = miligramas por decilitro; µg/dL = microgramas por decilitro. Os p-valores de TGP e de ferro sérico foram gerados por ANOVA, enquanto que os p-valores de creatinina foram gerados pelo teste de Kruskal-Wallis. As letras minúsculas indicam diferenças significativas nas comparações 2-a-2 detectadas pelos testes de Bonferroni (Ferro sérico) ou Mann-Whitney (Creatinina), sendo a = significativo comparado ao grupo sadio. Os asteriscos indicam diferenças significativas (\*p<0,05).

As médias e o erro padrão dos valores bioquímicos obtidos no **Experimento 3** estão representados na **Tabela 9**.

Os tratamentos com Rh<sub>2</sub>Cit, Magh-Rh<sub>2</sub>Cit e Magh-Cit resultaram em redução significativa dos níveis de TGP em relação aos camundongos sadios. O grupo controle apresentou elevado erro padrão, desse modo, não houve diferença significativa em relação ao sadio nem aos tratados. Ainda assim, os níveis de TGP dos animais portadores de tumor sem tratamento foram menores que os dos sadios e maiores que os dos tratados.

Os resultados referentes à concentração de creatinina não estabeleceram diferenças significativas entre os grupos.

Observou-se uma redução não significativa da concentração de ferro sérico do grupo controle em relação ao sadio. Nos animais portadores de tumor tratados com Rh<sub>2</sub>Cit e Magh-Rh<sub>2</sub>Cit, as dosagens de ferro sérico permaneceram próximas às dos sadios. Em contra partida, no grupo Magh-Cit, houve um maior decaimento dos níveis de ferro sérico, embora estes ainda tenham sido maiores que os dos animais portadores de tumor sem tratamento.

**Tabela 9** – Níveis bioquímicos de transaminase glutâmico pirúvica (TGP), creatinina e ferro sérico dosados no soro de camundongos BALB/c fêmeas portadores de carcinoma mamário tratados via intravenosa com Rh<sub>2</sub>Cit, Magh-Rh<sub>2</sub>Cit e Magh-Cit no Experimento 3.

<b>Tratamento</b>	<b>TGP</b> (U/L)	<b>Creatinina</b> (mg/dL)	<b>Ferro sérico</b> (µg/dL)
<b>Sadio</b>	37,80±1,88	0,36±0,05	151,00±36,50
<b>Controle</b>	35,67±9,23	0,33±0,02	103,67±13,98
<b>Rh<sub>2</sub>Cit</b>	28,80±2,78 <sup>*a</sup>	0,34±0,02	152,40±14,14
<b>Magh-Rh<sub>2</sub>Cit</b>	26,40±1,63 <sup>*a</sup>	0,40±0,03	146,20±12,60
<b>Magh-Cit</b>	25,67±1,76 <sup>*a</sup>	0,33±0,03	127,17±9,76
<b>P-valores</b>	0,029	0,559	0,319

Os dados correspondem à média e ao erro padrão da média (EPM). TGP = transaminase glutâmico pirúvica; U/L= unidades por litro; mg/dL = miligramas por decilitro; µg/dL = microgramas por decilitro. Os p-valores de ferro sérico foram gerados por ANOVA, enquanto que os p-valores de TGP e de creatinina foram gerados pelo teste de Kruskal-Wallis. As letras minúsculas indicam diferenças significativas nas comparações 2-a-2 detectadas pelos testes de Bonferroni (ferro sérico) ou Mann-Whitney (creatinina), sendo a = significativo comparado ao grupo sadio. Os asteriscos indicam diferenças significativas (\*p<0,05).

### 5.3.2 Hemograma

Não foram verificadas diferenças significativas, nas avaliações do eritrograma do **Experimento 1**, entre os grupos sadio e tratados com Rh<sub>2</sub>Cit, Magh-Rh<sub>2</sub>Cit e Magh-Cit no período de 48 horas (**Tabela 10**).

Os valores do eritrograma (**Tabela 11**) de camundongos do grupo controle e dos tratados com Rh<sub>2</sub>Cit, Magh-Rh<sub>2</sub>Cit e Magh-Cit permaneceram semelhantes aos dos sadios, ao final do **Experimento 2**. Observou-se, entretanto, uma redução significativa de hemácias nos grupos controle e tratado com Rh<sub>2</sub>Cit. Neste, a concentração de eritrócitos teve uma redução mais evidente, suficiente para causar uma redução significativa do hematócrito (HCT). No grupo Magh-Cit, verificou-se que os valores da hemoglobina corpuscular média (HCM) apresentaram redução significativa em relação ao do grupo controle e Magh-Rh<sub>2</sub>Cit. No entanto, não existiu diferença significativa do HCM de nenhum grupo comparado aos animais sadios.

No eritrograma do **Experimento 3**, descrito na **Tabela 12**, verificou-se uma redução significativa, em relação aos animais sadios, dos valores de hemácias, hemoglobina e hematócrito dos grupos controle e Magh-Cit. Ainda, houve um aumento significativo da concentração hemoglobínica corpuscular média (CHCM) e do coeficiente de variação do tamanho de hemácias (RDW-CV) nos camundongos controle comparados aos sadios. Além disso, a elevação da CHCM no grupo controle resultou em diferença significativa ao Magh-Rh<sub>2</sub>Cit, embora os valores deste grupo tenham permanecido próximos aos do sadio.

**Tabela 10** - Eritrograma de camundongos BALB/c fêmeas após 48 horas do tratamento via intravenosa com Rh<sub>2</sub>Cit, Magh-Rh<sub>2</sub>Cit e Magh-Cit no Experimento 1.

<b>Tratamento</b>	<b>Hemácias</b> (milhões/mm <sup>3</sup> )	<b>HGB</b> (g/dL)	<b>HCT</b> (%)	<b>VCM</b> (fL)	<b>HCM</b> (pg)	<b>CHCM</b> (g/mL)	<b>RDW-CV</b> (%)
<b>Sadio</b>	9,95±0,45	14,18±0,52	34,95±1,48	35,15±0,25	14,25±0,15	40,58±0,30	14,93±0,46
<b>Rh<sub>2</sub>Cit</b>	9,64±0,18	13,82±0,26	33,82±0,47	35,10±0,20	14,32±0,16	40,88±0,38	14,82±0,14
<b>Magh-Rh<sub>2</sub>Cit</b>	9,23±0,58	13,20±0,83	32,46±2,15	35,14±0,30	14,30±0,16	40,70±0,25	14,46±0,15
<b>Magh-Cit</b>	10,03±0,15	14,25±0,19	35,53±0,48	35,45±0,13	14,20±0,07	40,10±0,11	14,58±0,15
<b>P-valores</b>	0,416	0,435	0,348	0,624	0,651	0,194	0,401

Os dados correspondem à média e ao erro padrão da média (EPM). HGB = hemoglobina; HCT = hematócrito; VCM = volume corpuscular médio; HCM = hemoglobina corpuscular média; CHCM = concentração hemoglobínica corpuscular média; RDW-CV = coeficiente de variação do tamanho de hemácias; g/dL = gramas por decilitros; fL = femtolitros; pg = picograma; g/mL = grama por mililitro. Os p-valores de Hemácias, HGB, HCT, CHCM foram gerados por ANOVA, enquanto que os demais p-valores foram gerados pelo teste de Kruskal-Wallis. Não foram observadas alterações significativas (p>0,05).

**Tabela 11** - Eritrograma de camundongos BALB/c fêmeas portadores de carcinoma mamário tratados via intravenosa com Rh<sub>2</sub>Cit, Magh-Rh<sub>2</sub>Cit e Magh-Cit no Experimento 2.

<b>Tratamento</b>	<b>Hemácias</b> (milhões/mm <sup>3</sup> )	<b>HGB</b> (g/dL)	<b>HCT</b> (%)	<b>VCM</b> (fL)	<b>HCM</b> (pg)	<b>CHCM</b> (g/mL)
<b>Sadio</b>	9,61 ± 0,05	14,88 ± 0,54	45,30 ± 0,37	47,15 ± 0,44	15,48 ± 0,49	32,88 ± 1,33
<b>Controle</b>	9,06 ± 0,15 <sup>*a</sup>	14,62 ± 0,10	43,58 ± 0,55	48,17 ± 0,86	16,13 ± 0,25	33,57 ± 0,27
<b>Rh<sub>2</sub>Cit</b>	7,55 ± 1,34 <sup>*a</sup>	12,16 ± 2,31	35,16 ± 6,23 <sup>*a</sup>	46,70 ± 0,34	15,72 ± 0,70	33,68 ± 1,73
<b>Magh-Rh<sub>2</sub>Cit</b>	9,43 ± 0,16	15,12 ± 0,29	44,44 ± 0,73	47,12 ± 0,25	16,04 ± 0,09	34,04 ± 0,18
<b>Magh-Cit</b>	9,47 ± 0,12	14,46 ± 0,19	44,00 ± 0,50	46,50 ± 0,55	15,28 ± 0,14 <sup>*b, d</sup>	32,88 ± 0,27
<b>P-valores</b>	0,046	0,300	0,084	0,281	0,094	0,878

Os dados correspondem à média e ao erro padrão da média (EPM). HGB = hemoglobina; HCT = hematócrito; VCM = volume corpuscular médio; HCM = hemoglobina corpuscular média; CHCM = concentração hemoglobínica corpuscular média. g/dL = gramas por decilitros; fL = femtolitros; pg = picograma; g/mL = grama por mililitro. Os p-valores de VCM e CHCM foram gerados por ANOVA, enquanto que os demais p-valores foram gerados pelo teste de Kruskal-Wallis. As letras minúsculas indicam diferenças significativas nas comparações 2-a-2 detectadas pelo teste de Mann-Whitney, sendo a = significativo comparado ao grupo sadio; b = significativo comparado ao grupo controle; d = significativo comparado ao grupo Magh-Rh<sub>2</sub>Cit. Os asteriscos indicam diferenças significativas (\*p<0,05).

**Tabela 12** - Eritrograma de camundongos BALB/c fêmeas portadores de carcinoma mamário tratados via intravenosa com Rh<sub>2</sub>Cit, Magh-Rh<sub>2</sub>Cit e Magh-Cit no Experimento 3.

<b>Tratamento</b>	<b>Hemácias</b> (milhões/mm <sup>3</sup> )	<b>HGB</b> (g/dL)	<b>HCT</b> (%)	<b>VCM</b> (fL)	<b>HCM</b> (pg)	<b>CHCM</b> (g/mL)	<b>RDW-CV</b> (%)
<b>Sadio</b>	10,04±0,09	14,34±0,22	35,48±0,43	35,34±0,15	14,28±0,12	40,40±0,2	15,02±0,09
<b>Controle</b>	8,80±0,33* <sup>a</sup>	12,88±0,45* <sup>a</sup>	30,97±1,23* <sup>a</sup>	35,2±0,09	14,65±0,08	41,65±0,3* <sup>a</sup>	15,97±0,29* <sup>a</sup>
<b>Rh<sub>2</sub>Cit</b>	9,07±0,43	13,22±0,46	31,96±1,52* <sup>a</sup>	35,24±0,22	14,60±0,25	41,48±0,79	15,70±0,24
<b>Magh-Rh<sub>2</sub>Cit</b>	9,66±0,26	13,74±0,38	33,88±0,97	35,08±0,12	14,24±0,05	40,58±0,19* <sup>b</sup>	15,80±0,07
<b>Magh-Cit</b>	8,98±0,39* <sup>a</sup>	12,8±0,56* <sup>a</sup>	31,32±1,41* <sup>a</sup>	34,88±0,07	14,24±0,05	40,88±0,14	15,74±0,18
<b>P-valores</b>	0,029	0,037	0,026	0,217	0,062	0,069	0,033

Os dados correspondem à média e ao erro padrão da média (EPM). HGB = hemoglobina; HCT = hematócito; VCM = volume corpuscular médio; HCM = hemoglobina corpuscular média; CHCM = concentração hemoglobínica corpuscular média; RDW-CV = coeficiente de variação da distribuição do tamanho de hemácias. g/dL = gramas por decilitros; fL = femtolitros; pg = picograma; g/mL = grama por mililitro. Os p-valores de VCM, HCM e RDW-CV foram gerados por ANOVA, enquanto que os demais p-valores foram gerados pelo teste de Kruskal-Wallis. As letras minúsculas indicam diferenças significativas nas comparações 2-a-2 detectadas pelo teste de Mann-Whitney, sendo a = significativo comparado ao grupo sadio; b = significativo comparado ao grupo controle. Os asteriscos indicam diferenças significativas (\*p<0,05).

A quantidade de plaquetas do **Experimento 1** teve uma redução significativa nos animais tratados com Magh-Rh<sub>2</sub>Cit em relação aos com Rh<sub>2</sub>Cit, no período de 48 horas (**Tabela 13**). No entanto, não houve, em relação aos animais sadios, diferença significativa do número de plaquetas de nenhum grupo tratado.

**Tabela 13** - Plaquetograma de camundongos BALB/c após 48 horas do tratamento via intravenosa com Rh<sub>2</sub>Cit, Magh-Rh<sub>2</sub>Cit e Magh-Cit no Experimento 1.

<b>Tratamento</b>	<b>Plaquetas (mil/mm<sup>3</sup>)</b>
<b>Sadio</b>	843,75±249,86
<b>Rh<sub>2</sub>Cit</b>	1044,00±89,61
<b>Magh-Rh<sub>2</sub>Cit</b>	477,80±145,61* <sup>b</sup>
<b>Magh-Cit</b>	847,17±95,14
<b>P-valores</b>	0,069

Os dados correspondem à média e ao erro padrão da média (EPM). O p-valor de plaquetas foi gerado pelo teste de Kruskal-Wallis. As letras minúsculas indicam diferenças significativas nas comparações 2-a-2 detectadas pelo teste de Mann-Whitney, sendo b = significativo comparado ao grupo Rh<sub>2</sub>Cit. Os asteriscos indicam diferenças significativas (\*p<0,05).

O plaquetograma apresentado na **Tabela 14** não demonstra diferenças significativas da contagem de plaquetas no **Experimento 2**, entre os grupos de camundongos inoculados com tumor, com ou sem tratamento, e o sadio.

No **Experimento 3**, a quantidade de plaquetas contadas no sangue dos camundongos com tumor foi reduzida em relação aos animais sadios. No plaquetograma descrito na **Tabela 15**, verificou-se uma redução significativa, comparada aos animais sadios, do número de plaquetas dos grupos controle e dos tratados com Rh<sub>2</sub>Cit e Magh-Cit.

**Tabela 14** - Plaquetograma de camundongos BALB/c fêmeas portadores de carcinoma mamário tratados via intravenosa com Rh<sub>2</sub>Cit, Magh-Rh<sub>2</sub>Cit e Magh-Cit no Experimento 2.

<b>Tratamento</b>	<b>Plaquetas (mil/mm<sup>3</sup>)</b>
<b>Sadio</b>	503,25 ± 53,63
<b>Controle</b>	484,50 ± 23,75
<b>Rh<sub>2</sub>Cit</b>	393,80 ± 86,04
<b>Magh-Rh<sub>2</sub>Cit</b>	428,20 ± 74,85
<b>Magh-Cit</b>	509,20 ± 43,54
<b>P-valores</b>	0,592

Os dados correspondem à média e ao erro padrão da média (EPM). O p-valor de plaquetas foi gerado por ANOVA. Não foram observadas alterações significativas (p>0,05).

**Tabela 15** - Plaquetograma de camundongos BALB/c fêmeas portadores de carcinoma mamário tratados via intravenosa com Rh<sub>2</sub>Cit, Magh-Rh<sub>2</sub>Cit e Magh-Cit no Experimento 3.

<b>Tratamento</b>	<b>Plaquetas (mil/mm<sup>3</sup>)</b>
<b>Sadio</b>	1083,0±65,44
<b>Controle</b>	828,8±58,98 <sup>*a</sup>
<b>Rh<sub>2</sub>Cit</b>	666,2±120,43 <sup>*a</sup>
<b>Magh-Rh<sub>2</sub>Cit</b>	940,4±66,11
<b>Magh-Cit</b>	710,6±110,34 <sup>*a</sup>
<b>P-valores</b>	0,029

Os dados correspondem à média e ao erro padrão da média (EPM). O p-valor de plaquetas foi gerado pelo teste de Kruskal-Wallis. As letras minúsculas indicam diferenças significativas nas comparações 2-a-2 detectadas pelo teste de Mann-Whitney, sendo a = significativo comparado ao grupo sadio. Os asteriscos indicam diferenças significativas (\*p<0,05).

A partir do leucograma do **Experimento 1**, constatou-se uma redução não significativa, comparada ao grupo sadio, do número de leucócitos no sangue de animais tratados com Rh<sub>2</sub>Cit, Magh-Rh<sub>2</sub>Cit e Magh-Cit. Na **Tabela 16**, verifica-se um aumento significativo na proporção de neutrófilos + monócitos nos grupos Magh-Rh<sub>2</sub>Cit e Magh-Cit, comparado ao Rh<sub>2</sub>Cit. Tal fato demonstra que a quantidade de neutrófilos + monócitos teve uma menor redução, já que a proporção dessas células se mostra maior nesses grupos.

Os valores obtidos para linfócitos e eosinófilos não apresentaram diferença estatística. Assim, essas células mantiveram sua proporção após os tratamentos, embora tenha havido redução não significativa de sua quantidade quando comparada ao grupo sadio.

**Tabela 16** – Leucograma de camundongos BALB/c fêmeas portadores de carcinoma mamário tratados via intravenosa com Rh<sub>2</sub>Cit, Magh-Rh<sub>2</sub>Cit e Magh-Cit no Experimento 1.

<b>Tratamento</b>	<b>Leucócitos totais</b> (/mm <sup>3</sup> )	<b>Linfócitos</b> (%)	<b>Neutrófilos + Monócitos</b> (%)	<b>Eosinófilos</b> (%)
<b>Sadio</b>	6.130±2.400	74,35±5,23	23,38±3,80	2,28±2,01
<b>Rh<sub>2</sub>Cit</b>	3.280±450	76,10±1,85	23,08±1,69	0,82±0,63
<b>Magh-Rh<sub>2</sub>Cit</b>	3.580±540	69,88±2,30	28,58±1,74 <sup>*b</sup>	1,54±0,86
<b>Magh-Cit</b>	4.200±530	66,92±2,04	30,83±1,42 <sup>*b</sup>	2,25±1,14
<b>P-valores</b>	0,314	0,110	0,055	0,740

Os dados correspondem à média e ao erro padrão da média (EPM). Os p-valores de leucócitos totais, linfócitos, neutrófilos + monócitos foram gerados pelo teste de Anova, e o de eosinófilos pelo teste de Kruskal-Wallis. As letras minúsculas indicam diferenças significativas nas comparações 2-a-2 detectadas pelo teste de Mann-Whitney, sendo b = significativo comparado ao grupo Rh<sub>2</sub>Cit. Os asteriscos indicam diferenças significativas (\*p<0,05).

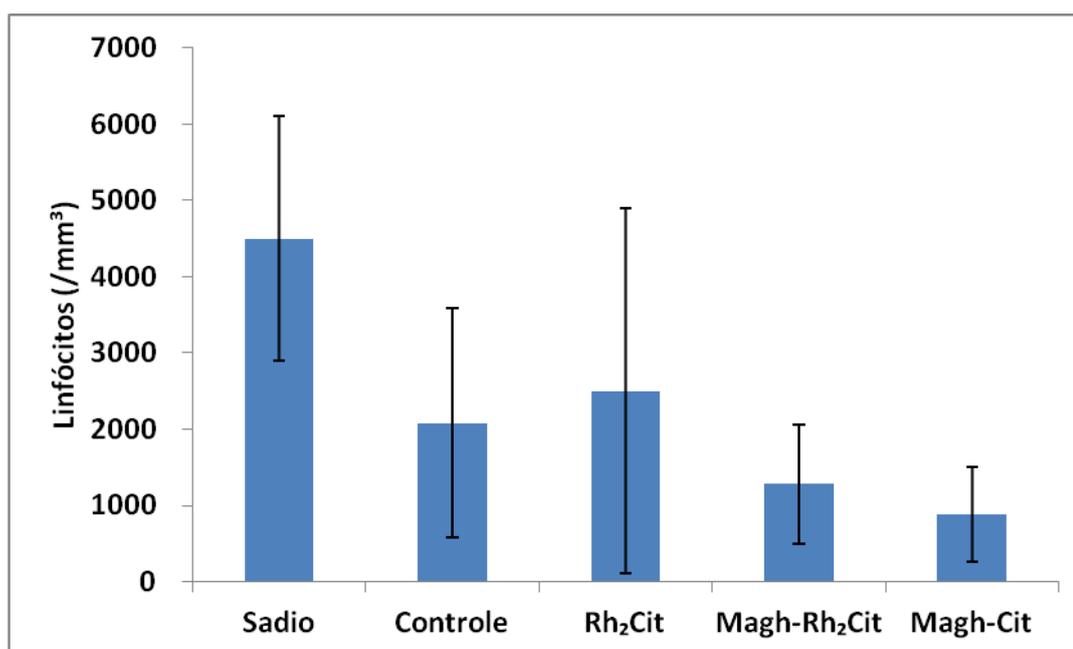
Observou-se, no **Experimento 2**, uma inversão no número de linfócitos e neutrófilos de todos os grupos de animais portadores de tumor em relação aos sadios. Tal fato foi verificado no leucograma descrito na **Tabela 17**, onde houve, respectivamente, uma redução e um aumento significativo na percentagem de linfócitos e neutrófilos dos grupos controle, Rh<sub>2</sub>-Cit, Magh-Rh<sub>2</sub>Cit e Magh-Cit, comparado ao sadio.

Na **Figura 18**, verifica-se que o maior número de leucócitos totais nos grupos portadores de tumor deve-se somente ao aumento na contagem de neutrófilos, já que os linfócitos decaíram em quantidade e não apenas em proporção.

**Tabela 17** – Leucograma de camundongos BALB/c fêmeas portadores de carcinoma mamário tratados via intravenosa com Rh<sub>2</sub>Cit, Magh-Rh<sub>2</sub>Cit e Magh-Cit no Experimento 2.

Tratamento	Leucócitos totais (/mm <sup>3</sup> )	Linfócitos (%)	Neutrófilos (%)	Eosinófilos (%)	Monócitos (%)
Sadio	5.193 ± 1688	84,25 ± 1,93	12,25 ± 1,65	0,75 ± 0,25	2,75 ± 1,18
Controle	15.738 ± 4593	8,17 ± 5,27 <sup>*a</sup>	85,33 ± 4,65 <sup>*a</sup>	0,33 ± 0,21	6,00 ± 1,81
Rh <sub>2</sub> Cit	18.462 ± 13158	6,00 ± 3,27 <sup>*a</sup>	90,40 ± 3,31 <sup>*a</sup>	0,60 ± 0,25	2,40 ± 0,68
Magh-Rh <sub>2</sub> Cit	13.576 ± 2685	13,60 ± 10,09 <sup>*a</sup>	80,40 ± 9,53 <sup>*a</sup>	0,60 ± 0,25	5,20 ± 1,24
Magh-Cit	14.768 ± 3929	4,40 ± 2,68 <sup>*a</sup>	92,40 ± 2,38 <sup>*a</sup>	0,20 ± 0,20	2,80 ± 0,37
<b>P-valores</b>	0,249	0,035	0,014	0,451	0,203

Os dados correspondem à média e ao erro padrão da média (EPM). Os p-valores foram gerados pelo teste de Kruskal-Wallis. As letras minúsculas indicam diferenças significativas nas comparações 2-a-2 detectadas pelo teste de Mann-Whitney, sendo a = significativo comparado ao grupo sadio. Os asteriscos indicam diferenças significativas (\*p<0,05).



**Figura 18:** Valor absoluto de linfócitos de camundongos BALB/c fêmeas portadores de carcinoma mamário tratados via intravenosa com Rh<sub>2</sub>Cit, Magh-Rh<sub>2</sub>Cit e Magh-Cit no Experimento 2.

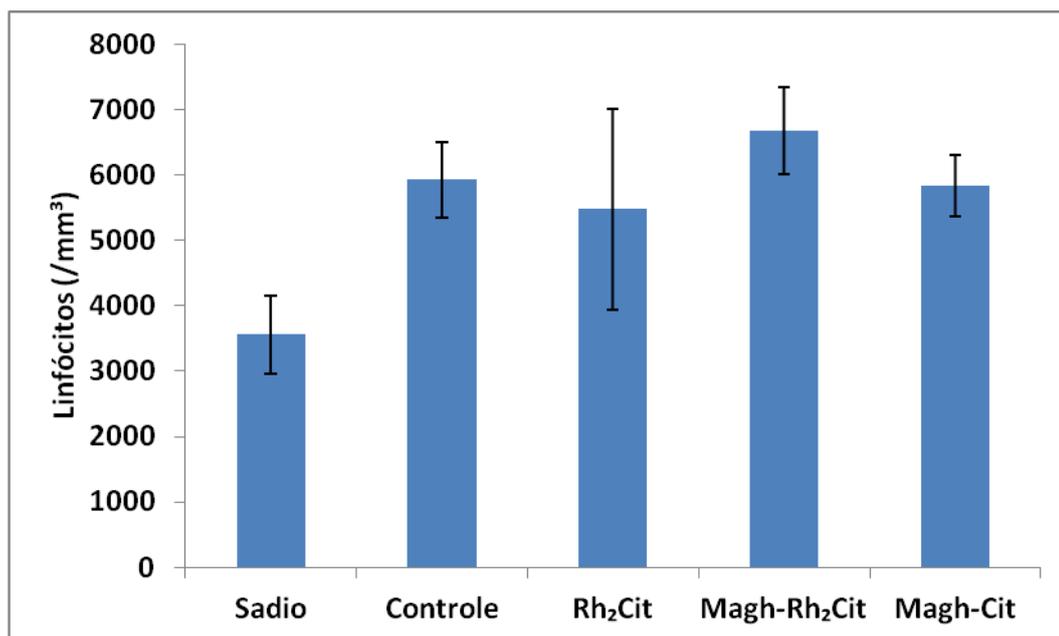
Na **Tabela 18**, observou-se o aumento significativo dos leucócitos totais e a inversão no número de linfócitos e neutrófilos, em todos os grupos de animais portadores de tumor em relação aos sádios. No leucograma do **Experimento 3**, verificou-se, respectivamente, uma redução e um aumento significativo na percentagem de linfócitos e neutrófilos dos grupos controle, Rh<sub>2</sub>Cit, Magh-Rh<sub>2</sub>Cit e Magh-Cit, comparado ao sadio.

O acréscimo na quantidade dos leucócitos totais foi causado não somente pelo aumento de neutrófilos, já que o número de linfócitos também aumentou nos animais com tumor, embora seu valor percentual tenha reduzido. Contudo, pela estatística constatou-se que esse aumento do número de linfócitos não foi significativo (**Figura 19**).

**Tabela 18** – Leucograma de camundongos BALB/c fêmeas portadores de carcinoma mamário tratados via intravenosa com Rh<sub>2</sub>Cit, Magh-Rh<sub>2</sub>Cit e Magh-Cit no Experimento 3.

<b>Tratamento</b>	<b>Leucócitos totais</b> (/mm <sup>3</sup> )	<b>Linfócitos</b> (%)	<b>Neutrófilos + Monócitos</b> (%)	<b>Eosinófilos</b> (%)
<b>Sadio</b>	5.040±900	70,56±1,00	28,64±0,43	0,80±0,70
<b>Controle</b>	66.980±19.150 <sup>*a</sup>	16,65±6,26 <sup>*a</sup>	78,05±4,83 <sup>*a</sup>	5,30±1,62
<b>Rh<sub>2</sub>Cit</b>	80.140±63.570 <sup>*a</sup>	30,28±8,68 <sup>*a</sup>	64,54±5,57 <sup>*a</sup>	5,18±3,92
<b>Magh-Rh<sub>2</sub>Cit</b>	19.900±1.700 <sup>*a</sup>	35,42±5,98 <sup>*a</sup>	62,46±5,41 <sup>*a</sup>	2,12±0,58
<b>Magh-Cit</b>	28.140±9.940 <sup>*a</sup>	27,86±5,55 <sup>*a</sup>	68,28±4,21 <sup>*a</sup>	3,86±1,45 <sup>*a</sup>
<b>P-valores</b>	0,014	0,000	0,004	0,138

Os dados correspondem à média e ao erro padrão da média (EPM). Os p-valores de linfócitos (%) foram gerados pelo teste de Anova e os demais por Kruskal-Wallis. As letras minúsculas indicam diferenças significativas nas comparações 2-a-2 detectadas pelo teste de Mann-Whitney, sendo a = significativo comparado ao grupo sadio. Os asteriscos indicam diferenças significativas (\*p<0,05).



**Figura 19:** Valor absoluto de linfócitos de camundongos BALB/c fêmeas portadores de carcinoma mamário tratados via intravenosa com Rh<sub>2</sub>Cit, Magh-Rh<sub>2</sub>Cit e Magh-Cit no Experimento 3.

#### 5.4 Análise de rotina da urina

Os parâmetros analisados na urina, no **Experimento 1**, referentes à cor, ao aspecto e à quantidade de proteínas, bilirrubinas, hemoglobina, nitritos, urobilinogênio, hemácias, cilindros, bactérias e de muco foram iguais para todos os grupos. A urina apresentou cor amarelo citrino, aspecto límpido, escassez de bactérias, quantidade urobilinogênio normal e ausência de proteínas, bilirrubinas, hemoglobina, nitritos, hemácias, cilindros e muco.

Os valores de glicose se apresentaram normais em quase todos os animais, com exceção de um animal dos grupos sadio (500 mg/dL), Magh-Rh<sub>2</sub>Cit (50 mg/dL) e Magh-Cit (50 mg/dL). Na avaliação de cristais na urina, não houve formação de fosfato triplo nos camundongos sadios, estando presente, entretanto, em dois animais tratados com Rh<sub>2</sub>Cit e com Magh-Rh<sub>2</sub>Cit e em um do grupo Magh-Cit.

Na **Tabela 19**, estão descritos os valores referentes aos dados que foram avaliados estatisticamente. A densidade urinária permaneceu igual a 1010 em todos os grupos. A presença de corpos cetônicos e de leucócitos não apresentou diferença significativa entre os grupos tratados, comparados ao sadio. O valor do pH relativo ao grupo Rh<sub>2</sub>Cit apresentou um aumento significativo em relação aos animais sadios. Houve uma redução significativa do valor das células epiteliais presentes na urina do grupo Magh-Rh<sub>2</sub>Cit em relação aos tratados com Rh<sub>2</sub>Cit e Magh-Cit.

**Tabela 19** – Exame de rotina da urina - EAS de camundongos BALB-c fêmeas após 48 horas do tratamento via intravenosa com Rh<sub>2</sub>Cit, Magh-Rh<sub>2</sub>Cit e Magh-Cit no Experimento 1.

Tratamento	Densidade	pH	Corpos Cetônicos (mg/dL)	Leucócitos (P/C)	Células (P/C)
Sadio	1010±0.00	6.40±0.37	30.00±12.25	2.00±0.32	2.00±0.71
Rh <sub>2</sub> Cit	1010±0.00	7.60±0.40* <sup>a</sup>	25.00±10.49	4.20±2.20	5.00±2.07
Magh-Rh <sub>2</sub> Cit	1010±0.00	6.80±0.12	40.00±10.00	2.20±0.20	0.6±0.25* <sup>b</sup>
Magh-Cit	1010±0.00	6.83±0.11	41.67±8.33	2.17±0.48	1.50±0.22* <sup>c</sup>
<b>P-valores</b>	0.676	0.072	0.612	0.859	0.088

Os dados correspondem à média e ao erro padrão da média (EPM). mg/dL = miligramas por decilitro, P/C = células por campo. Os p-valores foram gerados pelo teste de Kruskal-Wallis. As letras minúsculas indicam diferenças significativas nas comparações 2-a-2 detectadas pelo teste de Mann-Whitney, sendo a = significativo comparado ao grupo sadio; b = significativo comparado ao grupo Rh<sub>2</sub>Cit; c = significativo comparado ao grupo Magh-Rh<sub>2</sub>Cit. Os asteriscos indicam diferenças significativas (\*p<0,05).

## 5.5 Análises histopatológicas

### 5.5.1 Pulmão

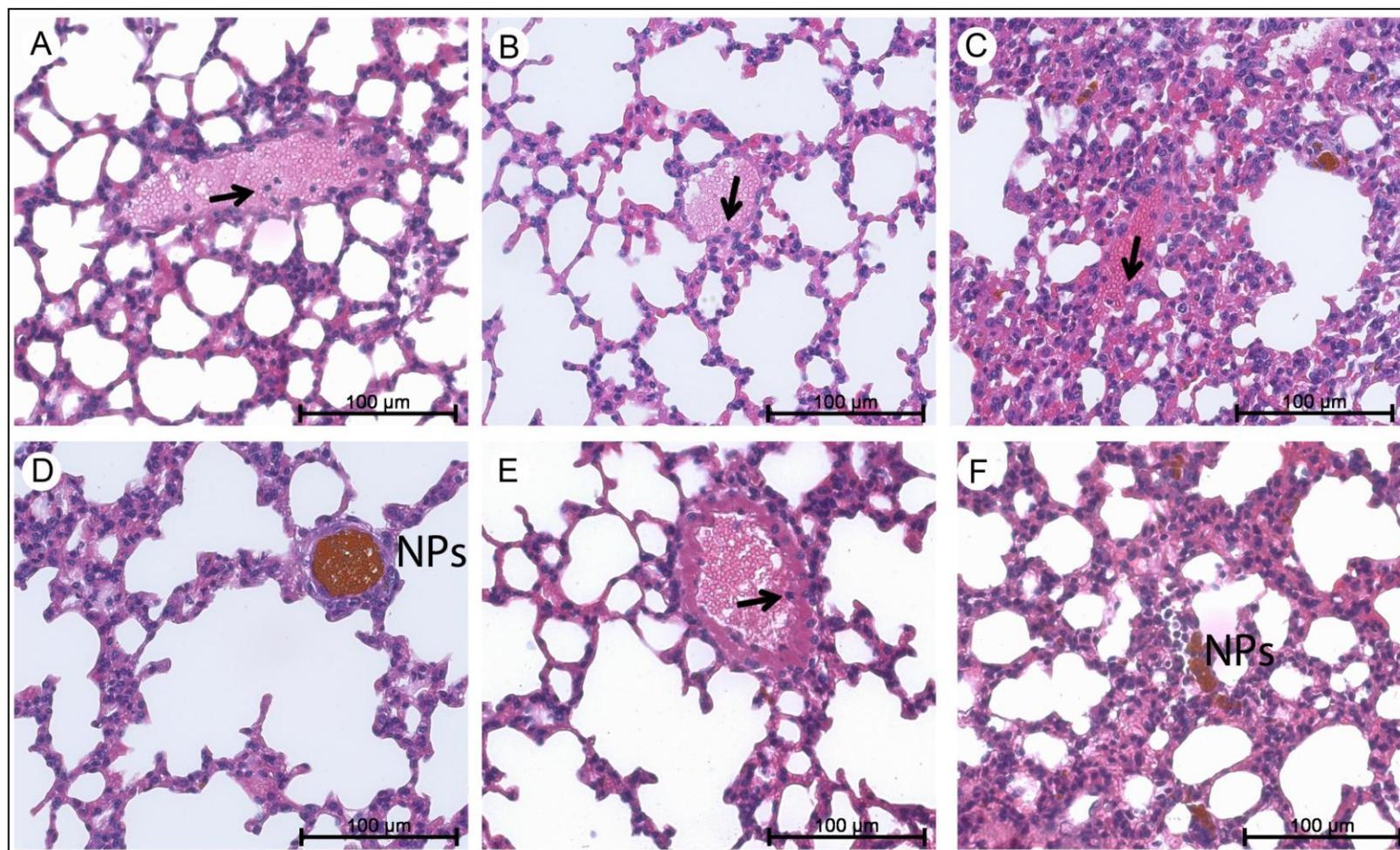
As análises histológicas, no **Experimento 1**, dos pulmões de animais dos grupos sadio e tratados com Rh<sub>2</sub>Cit, Magh-Rh<sub>2</sub>Cit e Magh-Cit não resultaram em diferenças na estrutura dos alvéolos. Verificou-se, em todos os grupos, a presença de linfócitos dentro de vasos situados entre alvéolos pulmonares (**Figuras 20 A, B, C e E**). Na **Figura 20 D**, observou-se um aglomerado de NPs dentro de um vaso envolto por alvéolos de animais tratados com Magh-Rh<sub>2</sub>Cit. A presença de NPs também foi verificada no grupo Magh-Cit, no interior de capilares sanguíneos da parede alveolar (**Figura 20 F**).

Nos **Experimentos 2 e 3**, não foram observadas alterações na estrutura dos alvéolos, nas análises histológicas dos pulmões de todos os grupos.

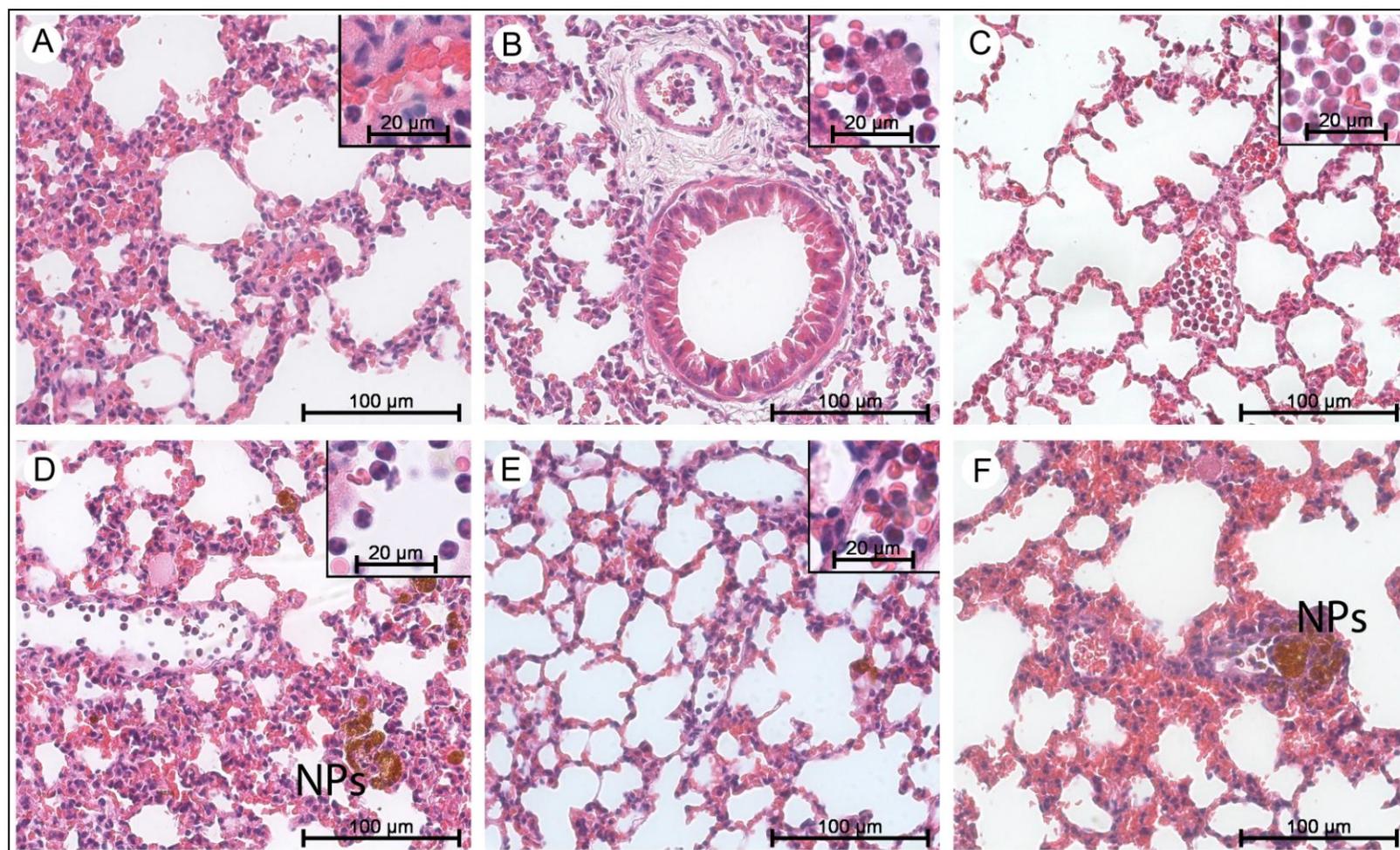
Verificou-se, no grupo sadio do **Experimento 2**, uma baixa concentração leucocitária no interior de vasos sanguíneos (**Figura 21 A**), quando comparada à dos animais tratados. No grupo controle e nos tratados com Rh<sub>2</sub>Cit, Magh-Rh<sub>2</sub>Cit e Magh-Cit, entretanto, foi observado um maior número de leucócitos, principalmente de neutrófilos, no interior desses vasos (**Figuras 21 B-E**). Ainda, o tratamento com Magh-Rh<sub>2</sub>Cit resultou em extravasamento de NPs

para as paredes alveolares (**Figura 21 D**). No grupo Magh-Cit, contudo, observou-se a presença de aglomerados de NPs no interior de vasos do pulmão, havendo um menor extravasamento para os alvéolos (**Figura 21 F**).

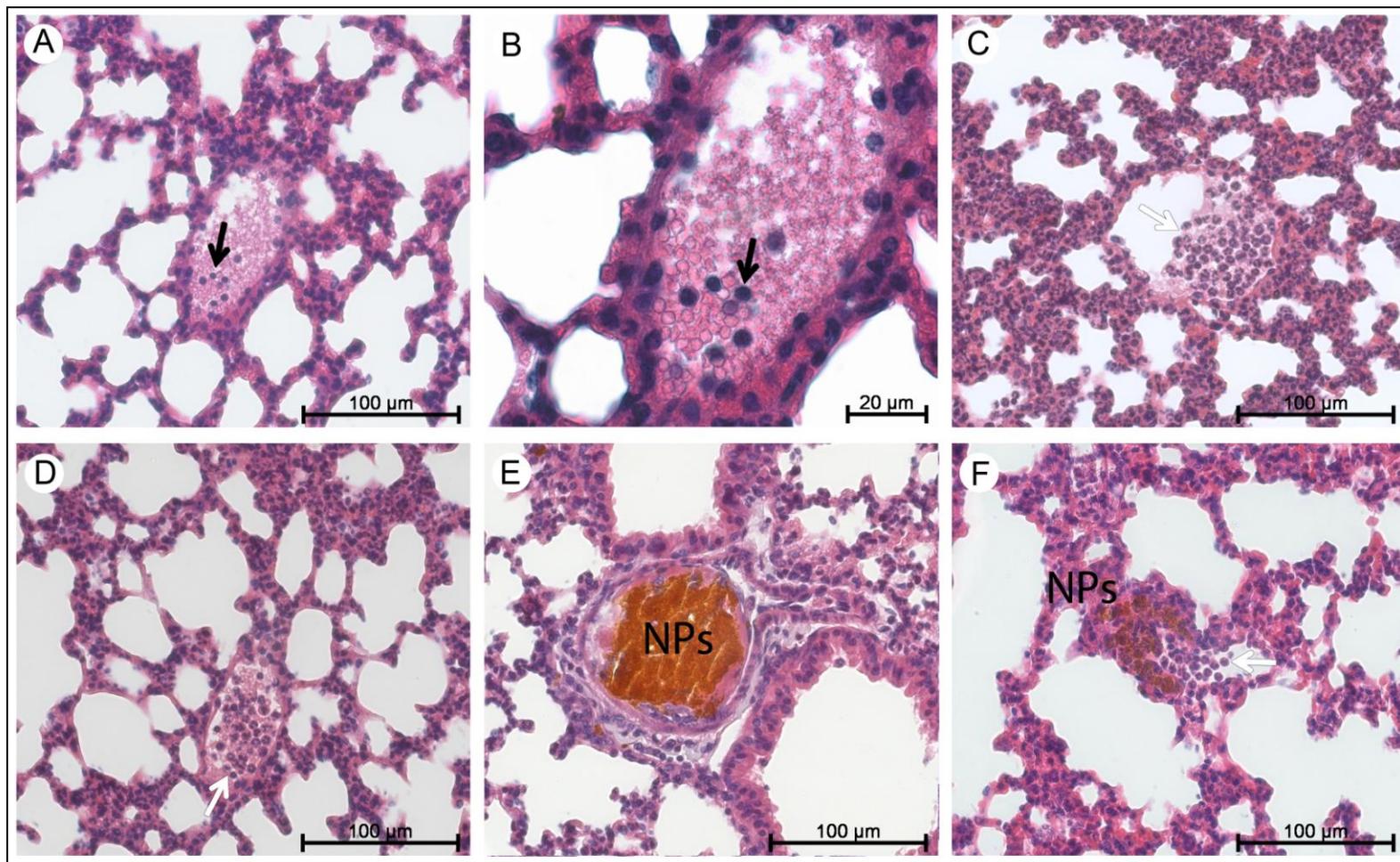
Nas **Figuras 22 A e B**, referentes ao grupo sadio do **Experimento 3**, observou-se a presença de linfócitos dentro de vasos localizados entre alvéolos pulmonares. Nos demais grupos, assim como no **Experimento 2**, a presença de neutrófilos nos vasos sanguíneos foi predominante (**Figuras 22 C, D e F**). Além disso, também foram observados aglomerados de NPs nos tratamentos com Magh-Rh<sub>2</sub>Cit, embora, no **Experimento 3**, essas partículas tenham permanecido no interior dos vasos (**Figuras 22 E**). Animais tratados com Magh-Cit apresentaram NPs próximas aos alvéolos e em menor quantidade que as observadas no grupo Magh-Rh<sub>2</sub>Cit (**Figura 22 F**).



**Figura 20:** Fotomicrografias de pulmão de camundongos fêmeas BALB/c tratados via intravenosa com Rh<sub>2</sub>Cit, Magh-Rh<sub>2</sub>Cit e Magh-Cit no Experimento 1. A) Vaso sanguíneo entre alvéolos pulmonares de camundongo sem tratamento (sadio). B) Vaso sanguíneo entre alvéolos pulmonares de camundongo tratado com Rh<sub>2</sub>Cit. C) Vaso sanguíneo de camundongo tratado com Magh-Rh<sub>2</sub>Cit. D) Aglomerado de NPs no interior de um vaso de animais tratados com Magh-Rh<sub>2</sub>Cit. E) Vaso sanguíneo de camundongo tratado com Magh-Cit. F) Presença de NPs no interior de um capilar sanguíneo de camundongo tratado com Magh-Cit. Setas: linfócitos. Coloração H&E.



**Figura 21:** Fotomicrografias de pulmão de camundongos fêmeas BALB/c portadores de carcinoma mamário tratados via intravenosa com Rh<sub>2</sub>Cit, Magh-Rh<sub>2</sub>Cit e Magh-Cit no Experimento 2. A) Vaso sanguíneo entre alvéolos pulmonares de camundongo sem tratamento (sadio). B) Presença de neutrófilos no interior de um vaso de camundongo do grupo controle. C) Presença de neutrófilos no interior de um vaso de camundongo tratados com Rh<sub>2</sub>Cit. D) Extravasamento de nanopartículas (NPs) para a parede alveolar e presença de neutrófilos no interior de um vaso de camundongo tratado com Magh-Rh<sub>2</sub>Cit. E) Presença de neutrófilos no interior de um vaso de camundongo tratado com Magh-Cit. F) Agregado de nanopartículas (NPs) no interior de um vaso de camundongo tratado com Magh-Cit. Coloração H&E.

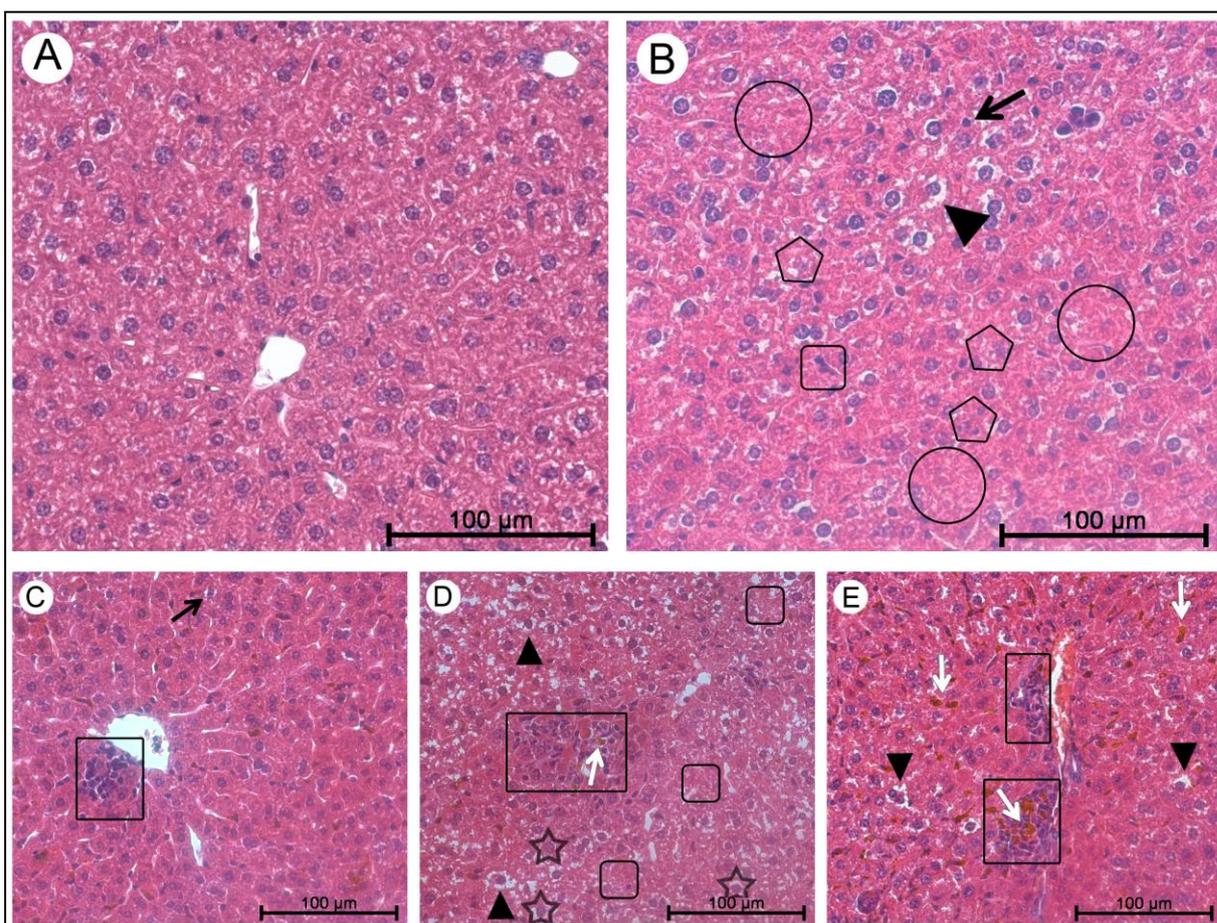


**Figura 22:** Fotomicrografias de pulmão de camundongos fêmeas BALB/c portadores de carcinoma mamário tratados via intravenosa com Rh<sub>2</sub>Cit, Magh-Rh<sub>2</sub>Cit e Magh-Cit no Experimento 3. A) Vaso sanguíneo entre alvéolos pulmonares de camundongo sem tratamento (sadio). B) Presença de linfócitos (seta preta) no vaso de camundongo sadio. C) Presença de neutrófilos (seta branca) no interior de um vaso de camundongo controle. D) Presença de neutrófilos (seta branca) no interior de um vaso de camundongo tratado com Rh<sub>2</sub>Cit. E) Presença de nanopartículas (NPs) no interior de um vaso de camundongo tratado com Magh-Rh<sub>2</sub>Cit. F) Presença de neutrófilos (seta branca) e nanopartículas (NPs) no interior de um vaso de camundongo tratado com Magh-Cit. Coloração H&E.

### 5.5.2 Efeitos Histopatológicos e Histomorfometria do Fígado

Nos **Experimentos 1, 2 e 3**, os camundongos expostos aos tratamentos com Rh<sub>2</sub>Cit, Magh-Rh<sub>2</sub>Cit e Magh-Cit apresentaram alterações patológicas no fígado. Nas lâminas histológicas analisadas, as alterações hepáticas mais frequentes foram hipertrofia, e degeneração celular e nuclear, vacuolização citoplasmática e presença de infiltrado inflamatório e de núcleos picnóticos (**Figura 23**).

Essas alterações foram registradas visualmente para os **Experimentos 1, 2 e 3**, e foram apresentadas nas **Tabelas 20, 21 e 22**, respectivamente. A quantificação dessas alterações resultou em um Índice de Alterações Histológicas (IAH), ilustrado nas **Figuras 24, 25 e 26**, para cada experimento.



**Figura 23:** Fotomicrografia do tecido hepático de camundongos BALB/c expostos ao tratamento com Rh<sub>2</sub>Cit, Magh-Rh<sub>2</sub>Cit, Magh-Cit. **A)** Grupo sadio (sem tumor). **B)** Grupo controle com carcinoma mamário apresentando fibrose (círculos), núcleos picnóticos (seta), vacuolização (cabeça de seta), degeneração dos hepatócitos (quadrado), degeneração do núcleo (pentágono). **C)** Grupo tratado com Rh<sub>2</sub>Cit (com tumor), presença de hipertrofia celular, núcleo picnótico (seta), inflamação no tecido hepático (retângulo). **D)** Grupo tratado com Magh-Rh<sub>2</sub>Cit (com tumor), inflamação (retângulo), degeneração dos hepatócitos (quadrado), vacuolização (cabeça de seta), presença de NPs nos sinusóides (seta branca), hipertrofia nuclear (estrela). **E)** Grupo tratado com Magh-Cit (com tumor), apresentando hipertrofia celular, NPs nos sinusóides (seta branca), inflamação (retângulo), vacuolização (cabeça de seta).

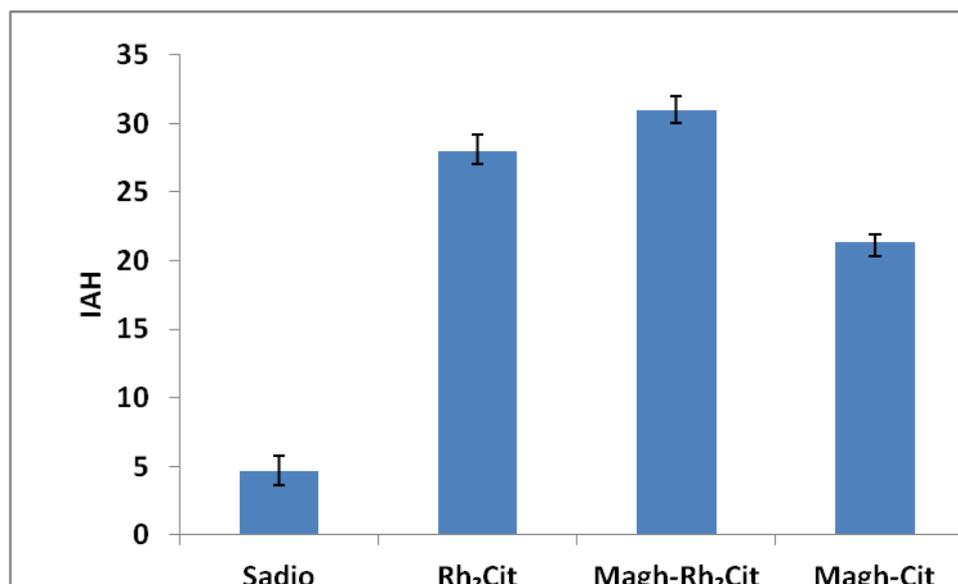
O IAH referente aos tratamentos realizados nos **Experimentos 1, 2 e 3** manteve-se dentro do intervalo 21 a 50, representativo de fígado moderadamente a fortemente danificado (LANGIANO & MARTINEZ, 2008). As maiores alterações foram causadas pelo tratamento com Magh-Rh<sub>2</sub>Cit devido ao seu maior IAH, entre os grupos tratados, nos três experimentos (**Figuras 24, 25 e 26**).

Nos **Experimentos 2 e 3**, com camundongos portadores de carcinoma mamário, observou-se que os animais sem tratamento apresentaram IAH acima de 100 (**Figuras 25 e 26**). Tal fato demonstra que a função do fígado de camundongos do grupo controle foi afetada de forma irreparável devido à presença de fibrose, classificada como estágio III, em que as alterações no tecido hepático impedem o restabelecimento da sua estrutura funcional (POLEKSIĆ & MITROVIĆ-TUTUNDŽIĆ, 1994).

**Tabela 20** - Alterações histopatológicas do fígado de camundongos BALB/c fêmeas sadias e tratados via intravenosa com Rh<sub>2</sub>Cit, Magh-Rh<sub>2</sub>Cit e Magh-Cit, no Experimento 1, com respectivos estágios e frequências das modificações no tecido hepático.

<b>ALTERAÇÕES</b>	<b>ESTÁGIO</b>	<b>Sadio</b>	<b>Rh<sub>2</sub>Cit</b>	<b>Magh-Rh<sub>2</sub>Cit</b>	<b>Magh-Cit</b>
<b>Hipertrofia celular</b>	<b>I</b>	<b>++</b>	<b>+++</b>	<b>++</b>	<b>++</b>
<b>Hipertrofia nuclear</b>	<b>I</b>	<b>++</b>	<b>+++</b>	<b>+++</b>	<b>++</b>
<b>Células irregulares</b>	<b>I</b>	<b>+</b>	<b>++</b>	<b>++</b>	<b>++</b>
<b>Núcleos irregulares</b>	<b>I</b>	<b>+</b>	<b>++</b>	<b>++</b>	<b>+++</b>
<b>Núcleo periférico</b>	<b>I</b>	<b>0</b>	<b>+</b>	<b>++</b>	<b>++</b>
<b>Vacúolo no citoplasma</b>	<b>I</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+++</b>	<b>+++</b>
<b>Degeneração hepatócito</b>	<b>II</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>+++</b>	<b>++</b>
<b>Degeneração núcleo</b>	<b>II</b>	<b>+</b>	<b>0</b>	<b>++</b>	<b>++</b>
<b>Núcleo picnótico</b>	<b>II</b>	<b>+</b>	<b>+++</b>	<b>++</b>	<b>+</b>
<b>Hemorragia</b>	<b>II</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>Inflamação</b>	<b>II</b>	<b>0</b>	<b>++++</b>	<b>++</b>	<b>++</b>
<b>Fibrose</b>	<b>III</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>

**Legenda:** 0 = ausência; + = baixa frequência; ++ = frequente; +++ = muito frequente; ++++ = frequência alta. Estágio I = danos hepáticos reversíveis; estágio II = danos hepáticos reparáveis mais graves, que afetam a função dos tecidos associados; estágio III = danos hepáticos irreparáveis.

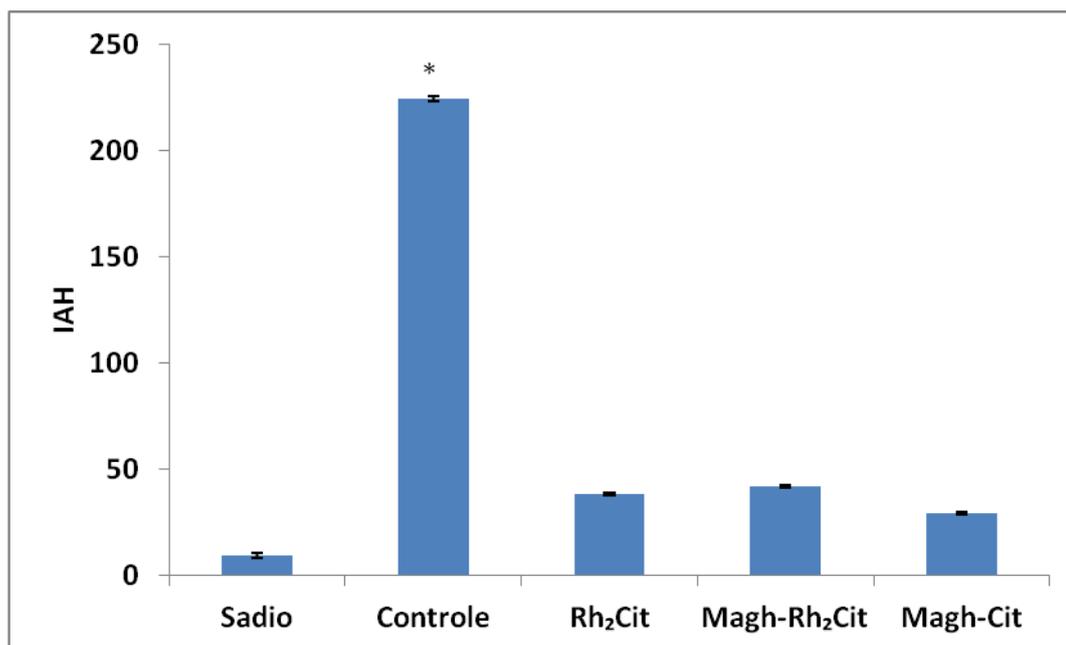


**Figura 24:** Cálculo do Índice de Alterações Histopatológico (IAH) para tecido hepático de camundongos BALB/c fêmeas sadios e tratados via intravenosa com Rh<sub>2</sub>Cit, Magh-Rh<sub>2</sub>Cit e Magh-Cit no Experimento 1.

**Tabela 21 -** Alterações histológicas do fígado de camundongos BALB/c fêmeas dos grupos sadio, controle e tratados via intravenosa com Rh<sub>2</sub>Cit, Magh-Rh<sub>2</sub>Cit e Magh-Cit, no Experimento 2, com respectivos estágios e frequências das modificações no tecido hepático.

ALTERAÇÕES	ESTÁGIO	Sadio	Controle	Rh <sub>2</sub> Cit	Magh- Rh <sub>2</sub> Cit	Magh-Cit
Hipertrofia celular	I	+	++	+++	+++	++
Hipertrofia nuclear	I	+	+	++	+++	++
Células irregulares	I	+	++	+++	+++	++
Núcleos irregulares	I	+	++	++	++	+++
Núcleo periférico	I	0	++	+	+++	++
Vacúolo no citoplasma	I	++	+++	+	++++	+++
Degeneração hepatocito	II	0	+++	0	+++	++
Degeneração núcleo	II	+	+++	0	++	++
Núcleo picnótico	II	+	+++	+++	++	+
Hemorragia	II	0	+	0	0	0
Inflamação	II	0	0	++++	+++	++
Fibrose	III	0	+++	0	0	0

**Legenda:** 0 = ausência; + = baixa frequência; ++ = frequente; +++ = muito frequente; ++++ = frequência alta. Estágio I = danos hepáticos reversíveis; estágio II = danos hepáticos reparáveis mais graves, que afetam a função dos tecidos associados; estágio III = danos hepáticos irreparáveis.

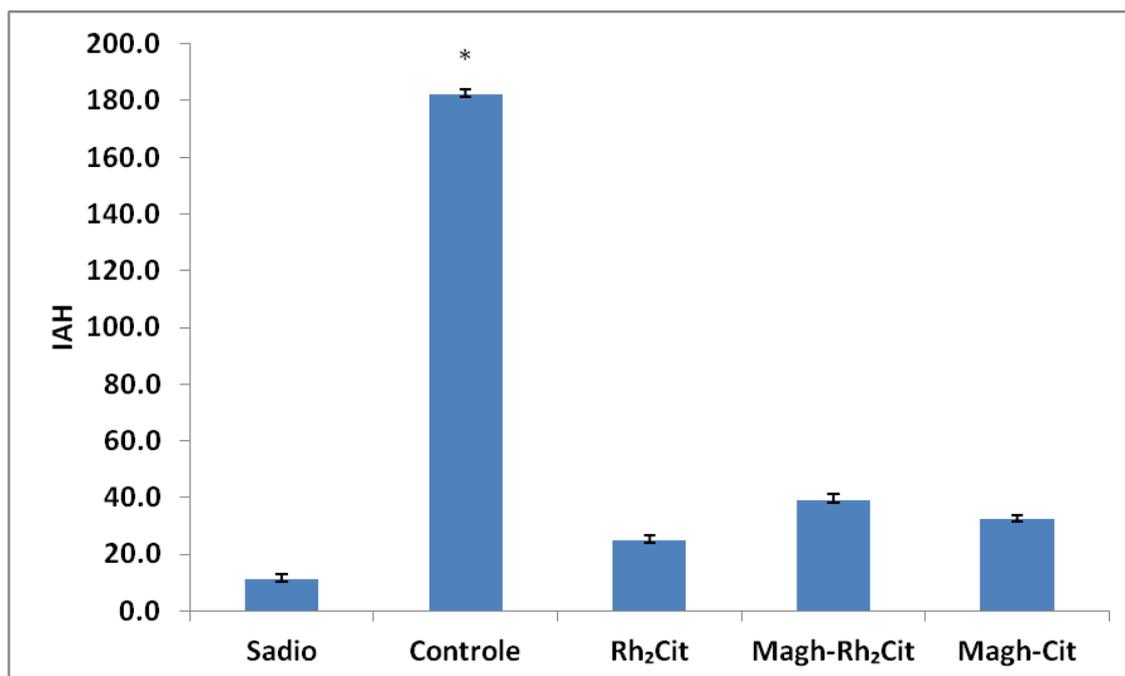


**Figura 25:** Cálculo do Índice de Alterações Histopatológico (IAH) para tecido hepático de camundongos BALB/c fêmeas dos grupos sadio, controle e tratados via intravenosa com Rh<sub>2</sub>Cit, Magh-Rh<sub>2</sub>Cit e Magh-Cit no Experimento 2. \*Diferença estatística quando comparada a todos os grupos (P<0.05).

**Tabela 22 -** Alterações histológicas do fígado de camundongos BALB/c fêmeas sadios e tratados via intravenosa com Rh<sub>2</sub>Cit, Magh-Rh<sub>2</sub>Cit e Magh-Cit, no Experimento 3, com respectivos estágios e frequências das modificações no tecido hepático.

ALTERAÇÕES	ESTÁGIO	Sadio	Controle	Rh <sub>2</sub> Cit	Magh-Rh <sub>2</sub> Cit	Magh-Cit
Hipertrofia celular	I	++	+	+++	++	+++
Hipertrofia nuclear	I	++	++++	+++	++	+++
Células irregulares	I	+	+++	++	++	++
Núcleos irregulares	I	+	+++	++	++	+++
Núcleo periférico	I	0	+++	+	++	++
Vacúolo no citoplasma	I	+	+++	+	+++	+++
Degeneração hepatocito	II	0	++++	+	+++	++
Degeneração núcleo	II	+	++++	0	++	+++
Núcleo picnótico	II	+	+++	+++	++	++
Hemorragia	II	0	+	0	0	0
Inflamação	II	0	0	+++	++	+++
Fibrose	III	0	+++	0	0	0

**Legenda:** 0 = ausência; + = baixa frequência; ++ = frequente; +++ = muito frequente; ++++ = frequência alta. Estágio I = danos hepáticos reversíveis; estágio II = danos hepáticos reparáveis mais graves, que afetam a função dos tecidos associados; estágio III = danos hepáticos irreparáveis.



**Figura 26:** Cálculo do Índice de Alterações Histopatológico (IAH) para tecido hepático de camundongos BALB/c fêmeas dos grupos sadio, controle e tratados via intravenosa com Rh<sub>2</sub>Cit, Magh-Rh<sub>2</sub>Cit e Magh-Cit no Experimento 3. \*Diferença significativa quando comparada a todos os grupos (P<0.05).

Além de uma análise qualitativa, foi realizada, nos **Experimentos 1, 2 e 3**, a histomorfometria dos hepatócitos para comparar com os resultados descritos.

Constatou-se, no **Experimento 1**, que os animais submetidos aos tratamentos com Rh<sub>2</sub>Cit e Magh-Cit apresentaram reduções significativas, em relação aos camundongos sadios, na área, diâmetro e volume celular e citoplasmático dos hepatócitos. A mensuração nuclear revelou uma redução significativa em área, diâmetro e volume para todos os grupos tratados comparados ao sadio. A relação área do citoplasma sobre área do núcleo, contudo, não apresentou diferença significativa (**Tabela 23**).

No **Experimento 2**, os valores do diâmetro do hepatócito de animais tratados com Rh<sub>2</sub>Cit e Magh-Cit apresentaram redução significativa em relação ao grupo sadio e controle. Em relação aos valores da área e do volume obtidos pela mensuração dos núcleos dos hepatócitos, verificou-se aumento significativo desses parâmetros nos animais do grupo controle comparado com todos os demais grupos (**Tabela 24**).

O volume dos hepatócitos, a área e o volume do núcleo de todos os grupos de animais portadores de tumor do **Experimento 3** apresentaram redução significativa em relação ao grupo sadio. Para os valores referentes à área e ao diâmetro dos hepatócitos, assim como à área e ao volume citoplasmático, apenas o grupo Magh-Cit não apresentou diferença significativa em relação aos animais sadios. Ainda, o diâmetro nuclear do grupo controle foi estatisticamente maior que o de todos os outros grupos.

**Tabela 23** - Mensurações realizadas em hepatócitos de camundongos BALB/c fêmeas dos grupos sadio e tratados via intravenosa com Rh<sub>2</sub>Cit, Magh-Rh<sub>2</sub>Cit e Magh-Cit no Experimento 1.

Tratamento	RH								
	AH ( $\mu\text{m}^2$ )	DH ( $\mu\text{m}$ )	VH ( $\mu\text{m}^3$ )	AC ( $\mu\text{m}^2$ )	VC ( $\mu\text{m}^3$ )	AC/An ( $\mu\text{m}^2$ )	An ( $\mu\text{m}^2$ )	Dn ( $\mu\text{m}$ )	Vn ( $\mu\text{m}^3$ )
<b>Sadio</b>	71.7±10.1	10.0±0.7	460.1±96.9	62.1±9.4	371.6±85.2	6.4±1.2	9.5±1.2	3.8±0.3	22.4±4.4
<b>Rh<sub>2</sub>Cit</b>	59.8±5.7 <sup>*a</sup>	9.2±0.5 <sup>*a</sup>	349.6±49.8 <sup>*a</sup>	52.1±5.5 <sup>*a</sup>	284.2±45.2 <sup>*a</sup>	6.7±1.1	7.7±1.1 <sup>*a</sup>	3.4±0.2 <sup>*a</sup>	16.3±3.7 <sup>*a</sup>
<b>Magh-Rh<sub>2</sub>Cit</b>	73.9±5.2 <sup>*b</sup>	10.2±0.4 <sup>*b</sup>	479.6±50.9 <sup>*b</sup>	64.8±4.9 <sup>*b</sup>	393.8±45.2 <sup>*b</sup>	7.1±0.7	9.1±0.7 <sup>*b</sup>	3.7±0.2 <sup>*a</sup>	20.7±2.5 <sup>*a</sup>
<b>Magh-Cit</b>	60.9±5.8 <sup>*a, c</sup>	9.3±0.4 <sup>*a, c</sup>	359.1±51.0 <sup>*a, c</sup>	51.7±5.2 <sup>*a, c</sup>	281.3±42.2 <sup>*a, c</sup>	5.6±0.8	9.1±0.8 <sup>*b</sup>	3.6±0.2 <sup>*a</sup>	20.9±2.9 <sup>*b, c</sup>

Os dados correspondem à média e ao erro padrão da média (EPM). AH = área do hepatócito; DH = diâmetro do hepatócito; VH = volume do hepatócito; AC = área do citoplasma; VC = volume do citoplasma; RH AC/An = razão do hepatócito; An = área do núcleo; Dn = diâmetro do núcleo; Vn = volume do núcleo. As letras minúsculas indicam diferenças significativas nas comparações 2-a-2 detectadas pelo teste de Tukey, sendo a = significativo comparado ao grupo sadio; b = significativo comparado ao grupo controle; c = significativo comparado ao grupo Rh<sub>2</sub>Cit. Os asteriscos indicam diferenças significativas (\*p<0,05).

**Tabela 24** - Mensurações realizadas em hepatócitos de camundongos BALB/c fêmeas dos grupos sadio, controle e tratados via intravenosa com Rh<sub>2</sub>Cit, Magh-Rh<sub>2</sub>Cit e Magh-Cit no Experimento 2.

Tratamento	AH ( $\mu\text{m}^2$ )	DH ( $\mu\text{m}$ )	VH ( $\mu\text{m}^3$ )	AC ( $\mu\text{m}^2$ )	VC ( $\mu\text{m}^3$ )	RH AC/An			
						( $\mu\text{m}^2$ )	An ( $\mu\text{m}^2$ )	Dn ( $\mu\text{m}$ )	Vn ( $\mu\text{m}^3$ )
<b>Sadio</b>	84.7±21.1	10.8±1.0	600.3±234.1	75.6±20.3	508.2±201.4	8.3±1.6	9.0±1.6	3.7±0.2	20.8±5.3
<b>Controle</b>	85.7±7.8	12.1±1.1	599.2±85.8	72.0±7.6	462.0±73.0	5.2±1.7	13.7±1.7 <sup>*a</sup>	4.1±0.4	38.3±7.3 <sup>*a</sup>
<b>Rh<sub>2</sub>Cit</b>	72.3±12.9	10.3±0.8 <sup>*a, b</sup>	468.9±129.0	62.5±11.9	376.9±105.0	6.32±2	9.8±2.0 <sup>*b</sup>	4.0±0.3	23.7±7.6 <sup>*b</sup>
<b>Magh-Rh<sub>2</sub>Cit</b>	83.5±10.4	11.2±0.4 <sup>*c</sup>	577.5±116.5	73.4±9.3	476.3±91.6	7.2±1.8	10.0±1.8 <sup>*b</sup>	4.0±0.3	24.3±6.7 <sup>*b</sup>
<b>Magh-Cit</b>	75.3±12.7	10.5±0.6 <sup>*a, b, d</sup>	497.1±131.0	66.1±12.0	409.9±109.5	7.2±1.1	9.1±1.1 <sup>*b</sup>	3.9±0.3	20.9±3.8 <sup>*b</sup>

Os dados correspondem à média e ao erro padrão da média (EPM). AH = área do hepatócito; DH = diâmetro do hepatócito; VH = volume do hepatócito; AC = área do citoplasma; VC = volume do citoplasma; RH AC/Na = razão do hepatócito; An = área do núcleo; Dn = diâmetro do núcleo; Vn = volume do núcleo. As letras minúsculas indicam diferenças significativas nas comparações 2-a-2 detectadas pelo teste de Tukey, sendo a = significativo comparado ao grupo sadio; b = significativo comparado ao grupo controle; c = significativo comparado ao grupo Rh<sub>2</sub>Cit; d = significativo comparado ao grupo Magh-Rh<sub>2</sub>Cit. Os asteriscos indicam diferenças significativas (\*p<0,05).

**Tabela 25** - Mensurações realizadas em hepatócitos de camundongos BALB/c fêmeas dos grupos sadio, controle e tratados via intravenosa com Rh<sub>2</sub>Cit, Magh-Rh<sub>2</sub>Cit e Magh-Cit no Experimento 3.

Tratamento	AH ( $\mu\text{m}^2$ )	DH ( $\mu\text{m}$ )	VH ( $\mu\text{m}^3$ )	AC ( $\mu\text{m}^2$ )	VC ( $\mu\text{m}^3$ )	RH AC/An ( $\mu\text{m}^2$ )	An ( $\mu\text{m}^2$ )	Dn ( $\mu\text{m}$ )	Vn ( $\mu\text{m}^3$ )
<b>Sadio</b>	77.8±6.3	10.2±0.4	518.3±66.8	66.2±6.7	407.3±61.7	5.7±1.2	11.6±1.2	3.9±0.2	29.8±4.6
<b>Controle</b>	69.6±5.7 <sup>*a</sup>	9.9±0.6 <sup>*a</sup>	438.0±56.6 <sup>*a</sup>	58.5±6.1 <sup>*a</sup>	338.0±52.6 <sup>*a</sup>	5.2±1.1	11.0±1.1 <sup>*a</sup>	4.1±0.2 <sup>*a</sup>	27.8±4.2 <sup>*a</sup>
<b>Rh<sub>2</sub>Cit</b>	63.7±8.1 <sup>*a</sup>	9.4±0.6 <sup>*a</sup>	385.6±78.8 <sup>*a</sup>	53.9±8.3 <sup>*a</sup>	300.8±70.3 <sup>*a</sup>	5.5±1.4	9.7±1.4 <sup>*a</sup>	3.7±0.3 <sup>*b</sup>	23.2±4.8 <sup>*a</sup>
<b>Magh-Rh<sub>2</sub>Cit</b>	60.1±9.2 <sup>*a</sup>	9.1±0.7 <sup>*a</sup>	354.4±86.4 <sup>*a</sup>	50.4±9.1 <sup>*a</sup>	272.3±73.2 <sup>*a</sup>	5.1±0.9	9.7±0.9 <sup>*a</sup>	3.7±0.2 <sup>*b</sup>	23.0±3.5 <sup>*a</sup>
<b>Magh-Cit</b>	73.9±6.7 <sup>*b, c, d</sup>	10.1±0.5 <sup>*b, c, d</sup>	479.9±69.7 <sup>*a</sup>	62.6±6.3 <sup>*b, c, d</sup>	374.6±57.4 <sup>*b, c, d</sup>	5.5±1.7	11.2±1.7 <sup>*a</sup>	3.8±0.3 <sup>*b</sup>	28.6±6.7 <sup>*a</sup>

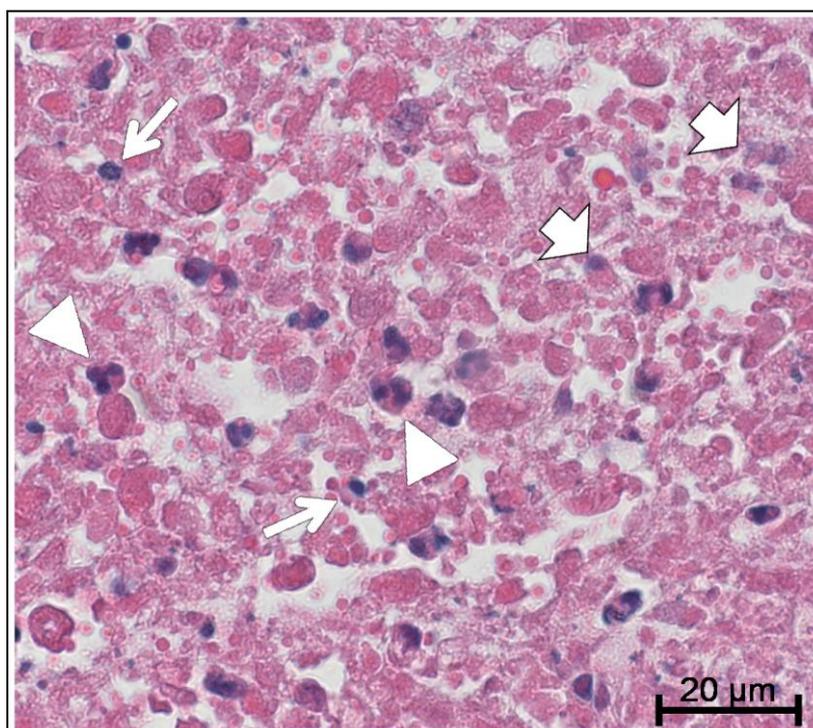
Os dados correspondem à média e ao erro padrão da média (EPM). AH = área do hepatócito; DH = diâmetro do hepatócito; VH = volume do hepatócito; AC = área do citoplasma; VC = volume do citoplasma; RH AC/Na = razão do hepatócito; An = área do núcleo; Dn = diâmetro do núcleo; Vn = volume do núcleo. As letras minúsculas indicam diferenças significativas nas comparações 2-a-2 detectadas pelo teste de Tukey, sendo a = significativo comparado ao grupo sadio; b = significativo comparado ao grupo controle; c = significativo comparado ao grupo Rh<sub>2</sub>Cit; d = significativo comparado ao grupo Magh-Rh<sub>2</sub>Cit. Os asteriscos indicam diferenças significativas (\*p<0,05).

### 5.5.3 Análises histopatológicas dos tumores

Os tumores obtidos de cinco camundongos dos grupos controle e tratados com Rh<sub>2</sub>Cit, Magh-Rh<sub>2</sub>Cit e Magh-Cit foram avaliados por morfometria, para verificar a área de necrose. Nesse sentido, foram analisadas, em cada tumor, três secções com 10 a 20 µm de distância entre si, a fim de mensurar a sua área total e a percentagem de necrose. As regiões necrosadas utilizadas para a avaliação morfométrica descrita foram do tipo necrose por coagulação. Na **Figura 27**, pode-se observar que as células apresentam alterações nucleares típicas desse tipo de necrose, tais como:

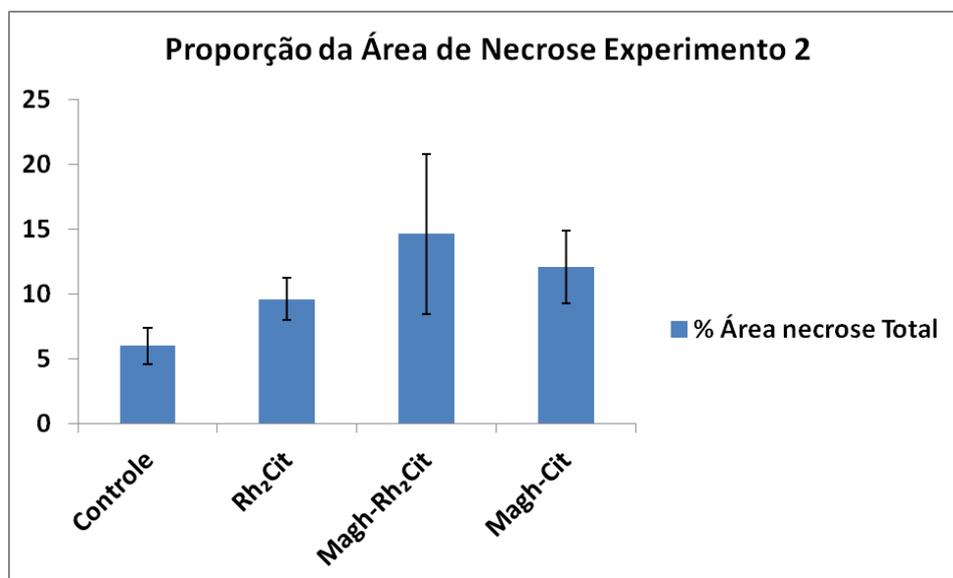
- Picnose, que consiste na condensação da cromatina e conseqüente redução do tamanho nuclear e aumento da sua basofilia;
- Cariorrex, definida pela fragmentação do núcleo em segmentos que se dispersam pelo citoplasma;
- Cariólise, que surge da digestão da cromatina, resultando em núcleos pouco pigmentados.

Além disso, o citoplasma celular apresentou-se acidófilo e granuloso, com aspecto de substância coagulada, formando uma massa homogênea. Tal fato deve-se ao rompimento das membranas, que tornam os limites celulares imprecisos.

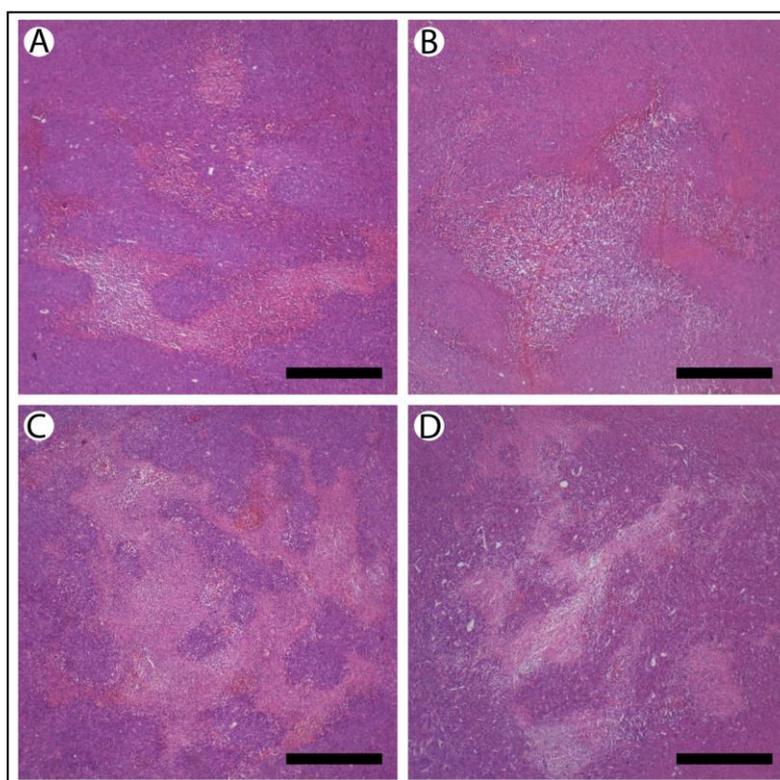


**Figura 27:** Necrose por coagulação utilizada na análise morfométrica dos tumores 4T1, implantados em camundongos fêmeas BALB/c. Presença de células com núcleos em picnose, (seta), em cariorrexe (cabeça de seta) e em cariólise (seta curta). Coloração H&E.

Pela **Figura 28**, pode-se observar que todos os tratamentos do **Experimento 2** resultaram em aumento não significativo da porcentagem da área de necrose. A **Figura 29** ilustra a presença de necrose tumoral em todos os grupos, sendo que nos tratados com Magh-Rh<sub>2</sub>Cit visualiza-se a maior área de necrose.

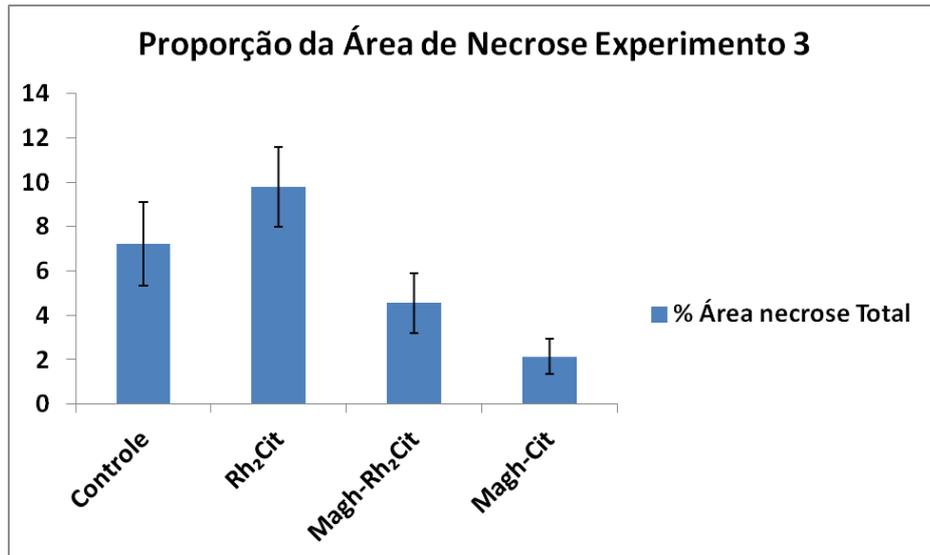


**Figura 28:** Percentagem de necrose nos tumores dos animais controle e tratados com Rh<sub>2</sub>Cit, Magh-Rh<sub>2</sub>Cit e Magh-Cit do Experimento 2.

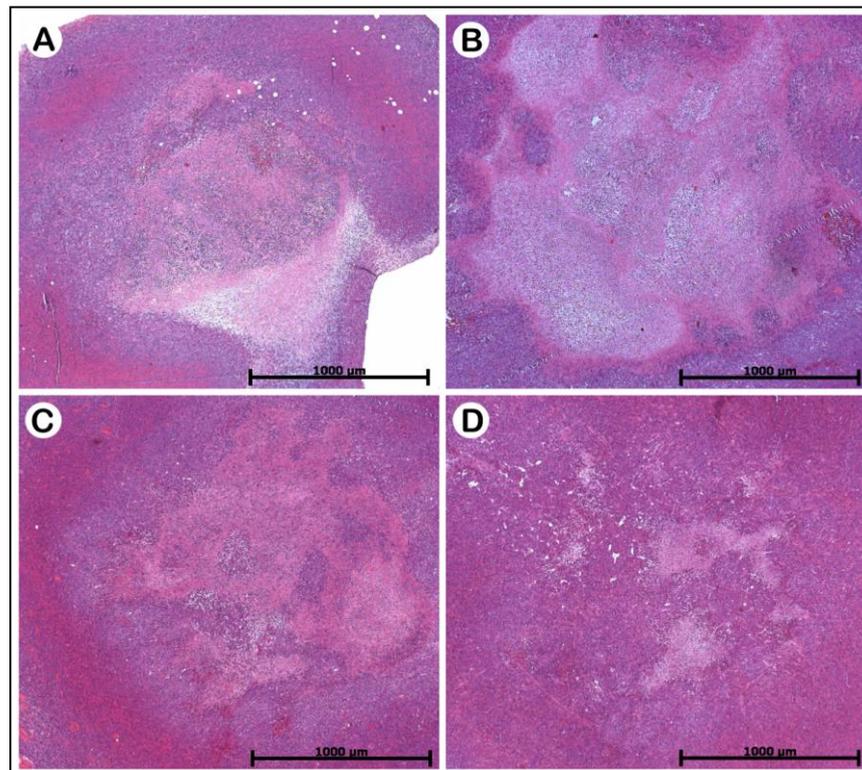


**Figura 29:** Regiões de necrose dos tumores 4T1 implantados em camundongos fêmeas BALB/c do Experimento 2. A) Controle com administração de solução salina. B) Rh<sub>2</sub>Cit. C) Magh-Rh<sub>2</sub>Cit. D) Magh-Cit. Coloração H&E. Barras = 0,5 mm.

Pela **Figura 30**, pode-se observar que no **Experimento 3** os tumores dos animais tratados com Rh<sub>2</sub>Cit apresentaram aumento não significativo na porcentagem de necrose em relação aos camundongos do grupo controle. Nos demais tratamentos, foi verificada uma menor proporção de área de necrose, principalmente nos tumores de animais tratados com NPs sem citrato de ródio. A **Figura 31** ilustra a presença de necrose tumoral em todos os grupos, sendo que nos tratados com Rh<sub>2</sub>Cit visualiza-se a maior área de necrose.



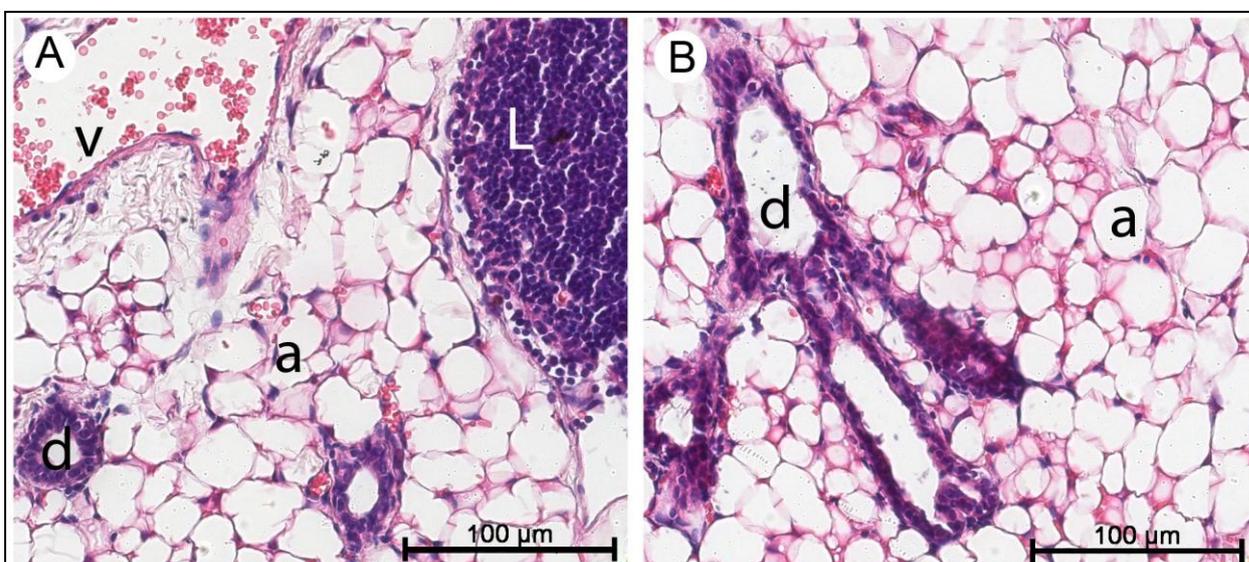
**Figura 30:** Percentagem de necrose nos tumores dos animais controle e tratados com Rh<sub>2</sub>Cit, Magh-Rh<sub>2</sub>Cit e Magh-Cit do Experimento 3.



**Figura 31:** Regiões de necrose dos tumores 4T1 implantados em camundongos fêmeas BALB/c do Experimento 3. A) Controle com administração de solução salina. B) Rh<sub>2</sub>Cit. C) Magh-Rh<sub>2</sub>Cit. D) Magh-Cit. Coloração H&E.

A glândula mamária dos camundongos sadios (sem implante de células tumorais) foi analisada para comparar com a histologia dos tumores implantados na mama dos animais controle e tratados com Rh<sub>2</sub>Cit, Magh-Rh<sub>2</sub>Cit e Magh-Cit.

O tecido mamário apresentou parênquima e estroma característicos. Na **Figura 32 A**, observou-se um linfonodo próximo a um vaso sanguíneo e a dois ductos circundados por tecido adiposo. Verificou-se a presença de um lóbulo ramificado de um ducto envolvido pelo estroma mamário, composto por tecido adiposo e conjuntivo. Os ductos são compostos por uma camada interna de células epiteliais cúbicas e por uma camada externa de células mioepiteliais, circundadas por adipócitos (**Figura 32 B**).



**Figura 32:** Fotomicrografias de tecido mamário de camundongos fêmeas BALB/c. A) Parênquima e estroma do tecido mamário normal. B) Lóbulo mamário circundado por tecido adiposo. Legenda: a: tecido adiposo; d: ducto; v: vaso; L: linfonodo. Coloração H&E.

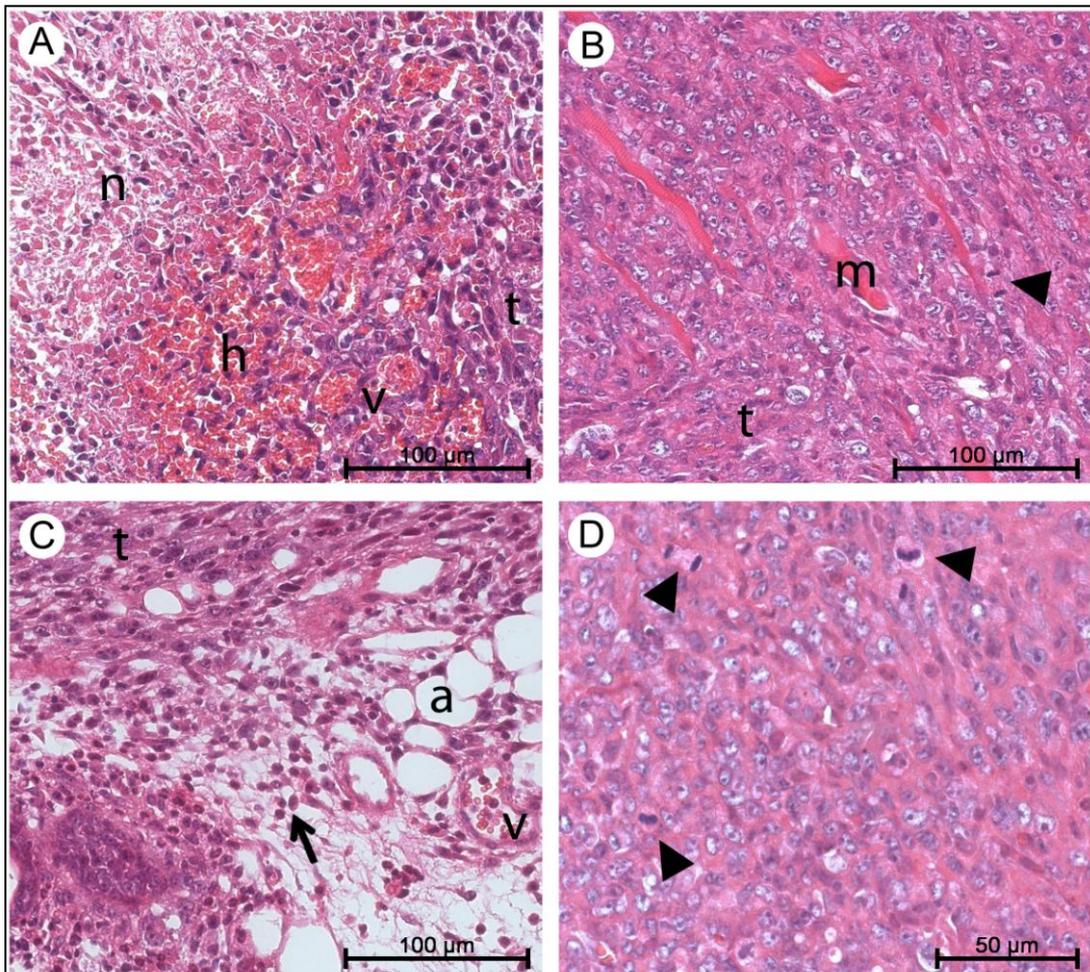
As avaliações gerais das secções histológicas dos tumores 4T1 foram similares nos **Experimentos 2 e 3**, e estão ilustradas nas **Figuras 33 a 36**.

O padrão histopatológico observado foi semelhante para todos os tumores implantados no tecido mamário de camundongos do grupo controle e tratados com Rh<sub>2</sub>Cit, Magh-Rh<sub>2</sub>Cit e Magh-Cit. Os tumores observados apresentaram pouca diferenciação, com aspecto primitivo, característica de tumores malignos anaplásicos, em que as células são pouco especializadas e distintas do parênquima originário do tumor. Tal fato está ligado à alta malignidade das células 4T1, as quais se apresentam muito invasivas.

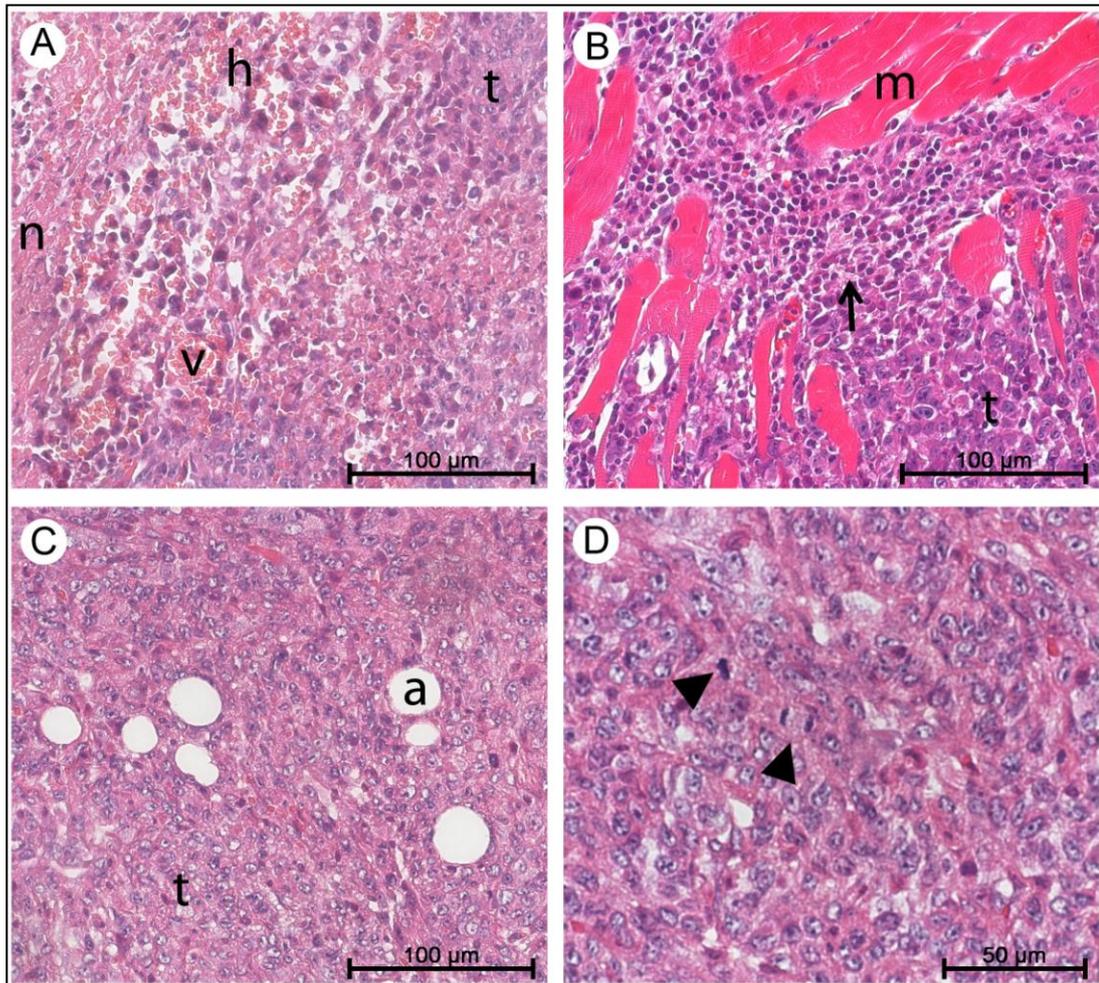
Nas **Figuras 33 A, 34 A, 35 A e 36 A**, estão destacadas regiões hemorrágicas junto às células tumorais em processo de necrose. Estas apresentaram restos celulares desorganizados com limites imprecisos e padrão eosinofílico, formando uma massa homogênea amorfa.

A progressão tumoral resultou em uma invasão na musculatura, provocando lesões nas fibras musculares, que acabam por perder seus núcleos (**Figuras 33 B, 34 B, 35 B e 36 B**). Além disso, a alta proliferação de células neoplásicas é evidenciada pela sua sobreposição ao tecido adiposo (**Figuras 33 C, 34 C, 35 B e 36 C**). O tecido invadido pelo tumor apresentou, ainda, indícios de inflamação no estroma, observada nas **Figuras 33 C, 34 B, 35 B e 36 B**.

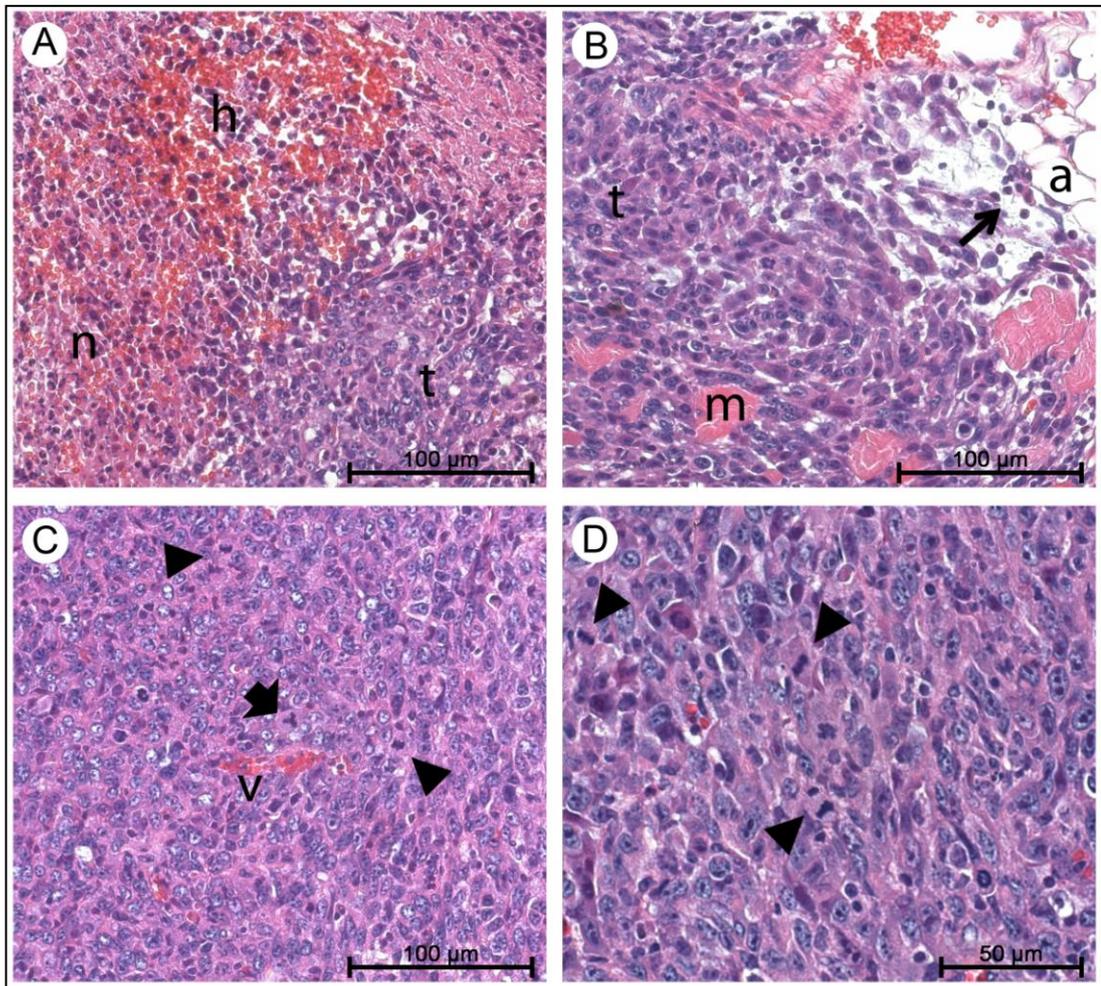
O crescimento desordenado das células neoplásicas sobre o parênquima e o estroma do tecido mamário gerou uma perda de polaridade. Isso está relacionado ao grande número de mitoses (**Figuras 33 D, 34 D, 35 D e 36 D**), próprio de tumores anaplásicos, apresentando células pleomórficas (tamanhos e formas variadas) e mitoses atípicas com fuso tripolar (**Figura 35 C**).



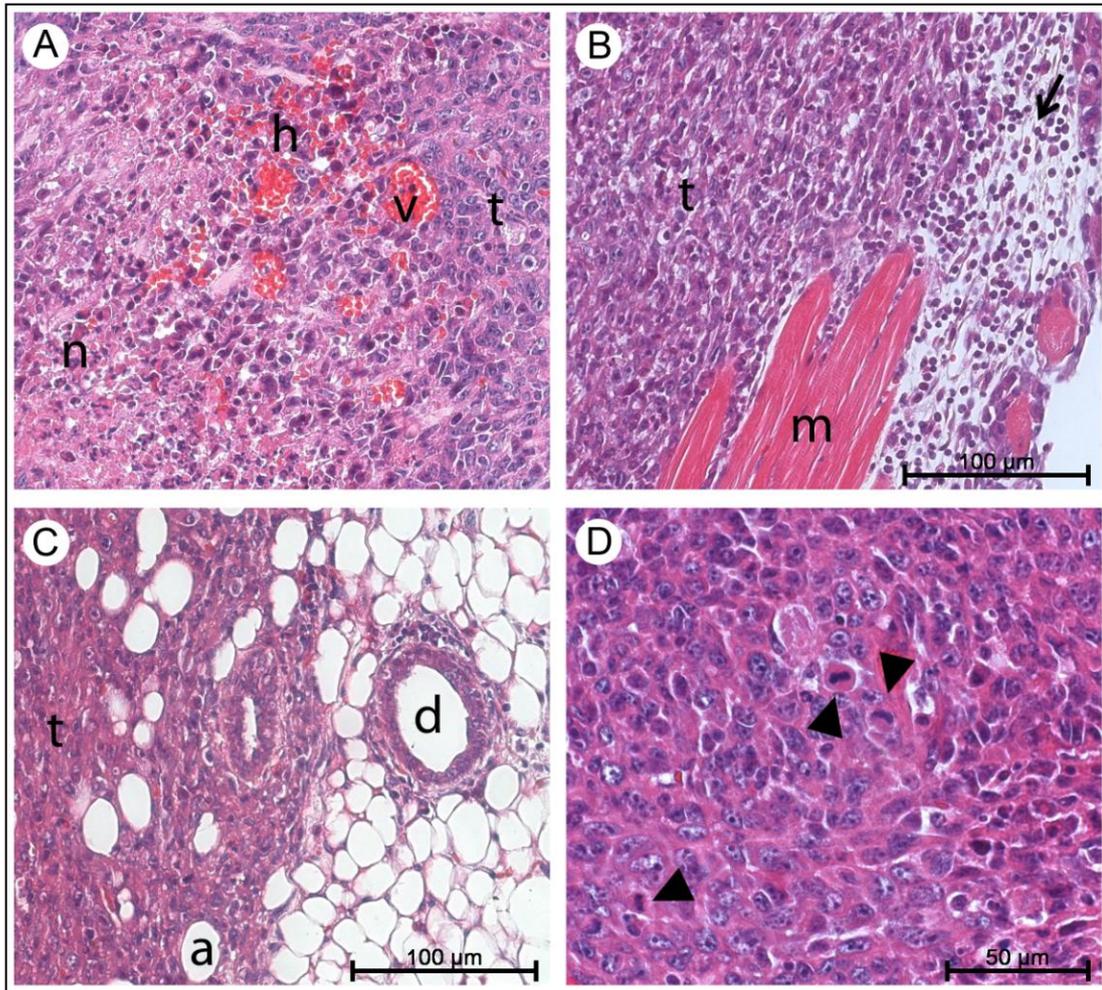
**Figura 33:** Fotomicrografias de carcinoma mamário (linhagem 4T1) de camundongos fêmeas BALB/c sem tratamento (controle). A) Tecido tumoral (t) com regiões hemorrágicas (h) e de necrose (n) próximas a vasos sanguíneos (v). B) Presença de fibras musculares (m) invadidas pelo tumor com células mitóticas (cabeça de seta). C) Invasão tumoral do estroma com tecido adiposo (a) e vaso sanguíneo (v) e presença de infiltrado inflamatório (seta). D) Alta proliferação de células tumorais com várias figuras mitóticas (cabeça de seta). Coloração H&E.



**Figura 34:** Fotomicrografias de carcinoma mamário (linhagem 4T1) de camundongos fêmeas BALB/c tratados com Rh<sub>2</sub>Cit. A) Aspecto geral do tumor (t) com regiões necrosadas (n) e hemorrágicas (h). B) Invasão tumoral nas fibras musculares (m) e presença de infiltrado inflamatório (seta). C) Presença de células tumorais invadindo o tecido adiposo (a). D) Alta proliferação de células tumorais com várias figuras mitóticas (cabeça de seta). Coloração H&E.



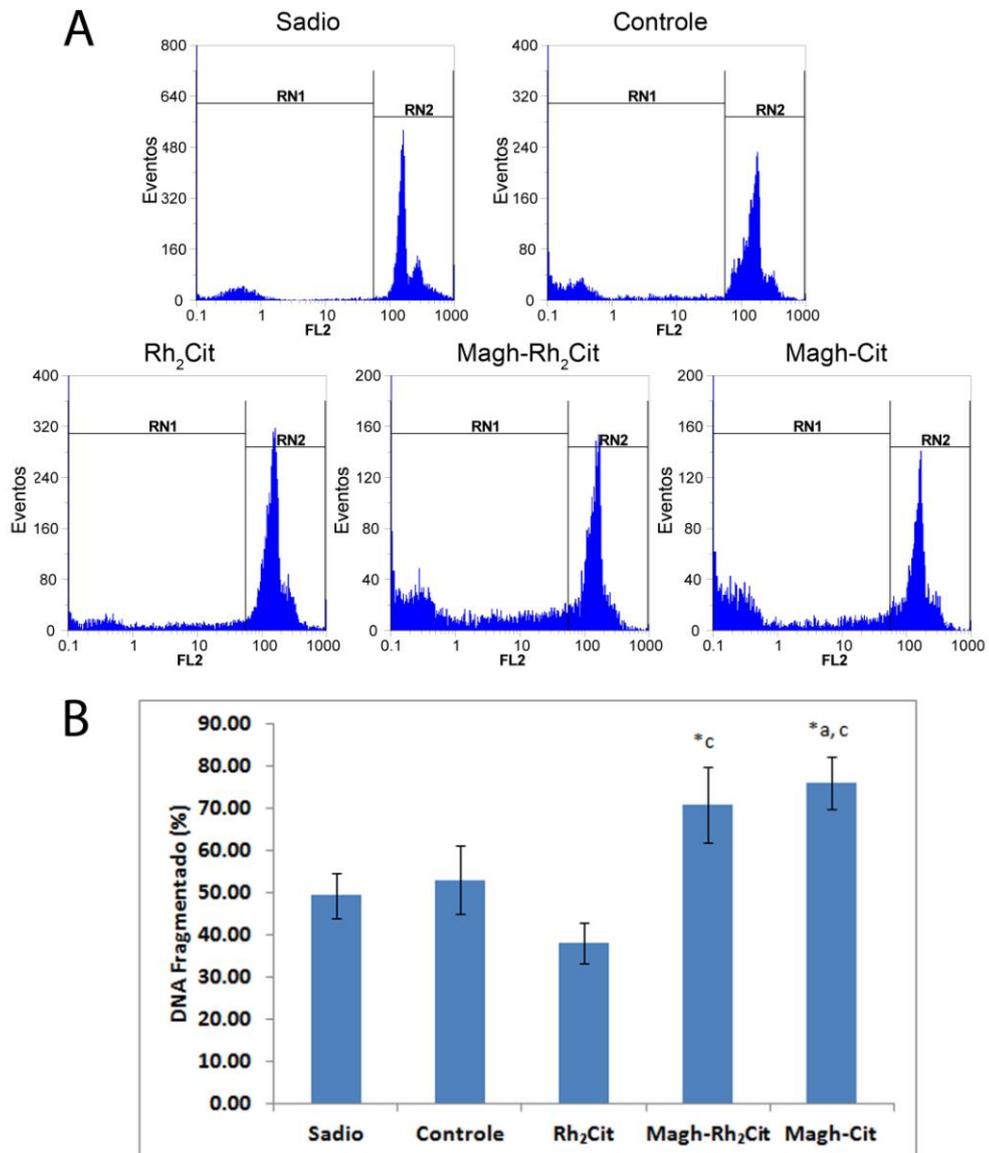
**Figura 35:** Fotomicrografias de carcinoma mamário (linhagem 4T1) de camundongos fêmeas BALB/c tratados com Magh-Rh<sub>2</sub>Cit. A) Regiões hemorrágicas (h) e de necrose (n) no tumor (t). B) Invasão tumoral nas fibras musculares (m) junto ao tecido adiposo (a) e infiltração de linfócitos (seta). C) Crescimento tumoral com células em mitose (cabeça de seta); vaso sanguíneo (v), além da presença de uma célula com fuso tripolar (seta curta). D) Alta proliferação de células tumorais com várias figuras mitóticas (cabeça de seta). Coloração H&E.



**Figura 36:** Fotomicrografias de carcinoma mamário (linhagem 4T1) de camundongos fêmeas BALB/c tratados com Magh-Cit. A) Aspecto geral do tumor (t) com regiões hemorrágicas (h) e de necrose (n). B) Invasão tumoral nas fibras musculares (m) e presença de infiltrado inflamatório (seta) próximo ao tumor. C) Estroma e parênquima invadidos pelo tumor, apresentando adipócitos (a) e ductos (d). D) Alta proliferação de células tumorais com várias figuras mitóticas (cabeça de seta). Coloração H&E.

## 5.6 Análises de fragmentação de DNA de células da medula óssea

Verificou-se, no **Experimento 3**, aumento significativo na percentagem de fragmentação de DNA na medula óssea de animais tratados com Magh-Cit em relação aos sádios. Para o grupo Rh<sub>2</sub>Cit, observou-se o menor valor de fragmentação do DNA. Embora essa redução não tenha sido significativa em relação ao grupo sadio, esse valor resultou em aumento significativo dos animais tratados com Magh-Rh<sub>2</sub>Cit e Magh-Cit em relação ao Rh<sub>2</sub>Cit (**Figura 37**).



**Figura 37:** Fragmentação de DNA em células da medula óssea dos animais dos grupos sadio, controle e tratados com Rh<sub>2</sub>Cit, Magh-Rh<sub>2</sub>Cit e Magh-Cit do Experimento 3. **A)** Quantificação de fragmentos de DNA marcados com iodeto de propídio usando citometria de fluxo. RN1 = DNA fragmentado, RN2 = DNA íntegro, FL2 = detector de fluorescência. **B)** Percentagem do DNA fragmentado. Dados correspondem a valores da média  $\pm$  erro padrão. As letras minúsculas indicam diferenças significativas nas comparações 2-a-2 detectadas pelo teste de Mann-Whitney, sendo a = significativo comparado ao grupo sadio; c = significativo comparado ao grupo Rh<sub>2</sub>Cit. Os asteriscos indicam diferenças significativas (\* $p < 0,05$ ).

## 6 DISCUSSÃO

### 6.1 Considerações sobre toxicidade

O uso de camundongos em pesquisa biomédica contribuiu muito para o entendimento da hematologia de mamíferos, demonstrando muita similaridade com humanos. Assim, ao se avaliar um determinado tratamento em camundongos, os valores hematológicos devem ser considerados, sendo essencial a existência de um grupo controle, com animais saudáveis, utilizado na comparação primária dos dados, além dos valores de referência que também ajudam na interpretação dos resultados (EVERDS, 2007).

Na avaliação de toxicidade aguda do **Experimento 1**, em que foram administradas as doses mais elevadas dos três experimentos, os tratamentos com Rh<sub>2</sub>Cit, Magh-Rh<sub>2</sub>Cit e Magh-Cit em camundongos sem carcinoma mamário não resultaram em alteração do eritrograma em relação ao grupo sadio, no período de 48 horas (**Tabela 10**). A concentração de Rh<sub>2</sub>Cit aplicada foi de 14,1 mg/kg, quase dez vezes maior do que a total utilizada ao longo do **Experimento 2** (1,5 mg/kg divididos em três aplicações de 0,5 mg/kg).

Com base nesses dados, pode-se supor que, em relação ao grupo sadio, foi a presença do tumor, e não os tratamentos, a responsável pela redução significativa na concentração de hemácias de animais tratados com Rh<sub>2</sub>Cit (**Experimento 2**) e com Magh-Cit (**Experimento 3**) (**Tabelas 11 e 12**). Essa alteração não foi suficiente, contudo, para ocasionar anemia já que os valores da concentração de hemácias ainda se mantiveram nos padrões dos valores de referência descritos na literatura ( $7,3-10,5 \times 10^6$ ) (VIANA, 2007). No **Experimento 3**, os camundongos portadores de tumor do grupo controle e tratados com Magh-Cit apresentaram diminuição significativa na concentração de hemoglobina, embora este valor também não tenha sido suficiente para causar anemia, já que está de acordo com o descrito por VIANA (2007) (12-15 g/dL). Entretanto, os hematócritos do grupo controle e dos tratados com Rh<sub>2</sub>Cit e Magh-Cit apresentaram redução significativa em relação aos dos animais saudáveis, estando abaixo do intervalo descrito para os valores de referência (35-50%) (VIANA, 2007). Tal fato pode estar relacionado ao desenvolvimento do câncer, já que o crescimento do tumor ocasiona hemorragias, alterando o volume dos glóbulos vermelhos no sangue (GOLDSHTEIN *et al*, 2010). Nas seções histopatológicas dos tumores essas regiões hemorrágicas estão próximas a áreas de necrose, possivelmente em virtude de hipóxia (**Figuras 33 A, 34 A, 35 A e 36 A**).

Assim como a redução do número de eritrócitos pode ocasionar anemia, a deficiência de ferro também pode levar a esta condição. O ferro, principal constituinte da hemoglobina, é

transportado associado à transferrina na forma de ferro sérico (EVERDS, 2007; WANG *et al*, 2010). Este foi dosado para avaliar se houve alguma alteração de sua concentração no organismo devido à presença do tumor ou aos tratamentos com NPs de maghemita. A menor concentração de ferro sérico observada no sangue dos animais dos grupos controle e Rh<sub>2</sub>Cit (**Experimento 2**) (**Tabela 8**) e controle e Magh-Cit (**Experimento 3**) (**Tabela 9**) deve-se, provavelmente, à redução significativa do número de eritrócitos dos respectivos grupos (**Tabelas 11 e 12**). No **Experimento 1**, entretanto, houve aumento dos valores de ferro sérico dos animais tratados em relação ao do grupo sadio. Ainda assim, a concentração de ferro obtida dos animais tratados permaneceu próxima a 160 µg/dL, valor já observado anteriormente para camundongos BALB/c (MENCACCI *et al*, 1997).

A avaliação de parâmetros bioquímicos do soro é fundamental para identificar a possível ocorrência de toxicidade, induzida por uma nova droga, e deve ser correlacionada com testes histopatológicos (RAMAIAH, 2007). Injúrias hepáticas compõem mais de 50% das manifestações de toxicidade causadas por agentes químicos (SCHEARS, 2003), representando o maior obstáculo para o desenvolvimento de novas drogas (CULLEN & MILLER, 2006). A transaminase glutâmica pirúvica (TGP), também chamada glutamato-piruvato transaminase ou alanina aminotransferase (ALT), é detectada no soro sanguíneo e pode ser utilizada no diagnóstico de lesões hepáticas provocadas por drogas tóxicas ou por infecções (NELSON & COX, 2006). Nesse sentido, níveis de TGP aumentados indicam toxicidade ao fígado (hepatotoxicidade), relacionada à necrose de hepatócitos e à inflamação (CENTER, 2007). Observou-se no **Experimento 1**, sem implante tumoral, e nos **Experimentos 2 e 3**, com animais portadores de carcinoma mamário, que não houve aumento dos níveis de TGP. Frente a esse parâmetro hematológico, pode-se sugerir ausência de hepatotoxicidade.

Contudo, pela avaliação histopatológica do fígado verificou-se que as médias do IAH (índice de alteração histopatológica) de todos os grupos tratados nos **Experimentos 1, 2 e 3** apresentaram aumento em relação aos animais sadios, estando dentro do intervalo 21-50. Segundo Langiano e Martinez (2008) valores de IAH neste intervalo estão relacionados à presença de alterações hepáticas que variam de moderadas a fortes. Nesse sentido, os tratamentos realizados nos três experimentos podem ter induzido alterações no fígado dos camundongos, principalmente no grupo tratado com Magh-Rh<sub>2</sub>Cit, em que se obteve o maior IAH. O aumento no valor de IAH no fígado de animais tratados pode estar relacionado com a presença de infiltrado inflamatório, observado próximo aos vasos sanguíneos, principalmente junto a NPs (ABDELHALIM & JARRAR, 2012).

Nos **Experimentos 2 e 3**, com animais portadores de carcinoma mamário, o alto IAH (superior a 100) do grupo controle demonstrou que a presença do tumor provocou alterações histopatológicas irreversíveis. Isso foi corroborado pela análise morfométrica, em que houve aumento significativo do volume e da área nuclear de animais do grupo controle em relação ao sadio, no **Experimento 2 (Tabela 24)**, e do diâmetro nuclear, no **Experimento 3 (Tabela 25)**. Desse modo, pelas análises morfométricas, verificou-se que a hipertrofia hepática foi devido à presença do tumor e não aos tratamentos. Embora a avaliação qualitativa do IAH tenha demonstrado danos, de moderados a fortes, causados pelos tratamentos, as análises morfométricas e bioquímicas do TGP sugerem baixa hepatotoxicidade. Além disso, apesar de algumas regiões do fígado terem sido lesadas, o órgão como um todo, possivelmente, não perdeu sua função, devido à multiplicação de células saudáveis.

A depuração de substâncias exógenas administradas ao organismo é realizada nos rins, o que torna a função renal um indicativo de toxicidade. Devido à velocidade constante de excreção de creatinina, a sua concentração no sangue é um excelente parâmetro para determinar a taxa de filtração glomerular e, deste modo, relacionar com a possível nefrotoxicidade causada pelos tratamentos realizados. Quando um determinado composto causa toxicidade renal há uma redução na velocidade de filtração glomerular e consequente decaimento da excreção urinária de creatinina, resultando em aumento do seu nível no sangue. Assim, valores crescentes de creatinina sérica indicam nefrotoxicidade (MOTTA, 2003).

Pela avaliação da toxicidade aguda, realizada no **Experimento 1**, e pelas análises toxicológicas dos **Experimentos 2 e 3**, com implante tumoral, não se observou aumento significativo de creatinina no sangue de nenhum animal tratado em relação aos sadios (**Tabelas 7, 8 e 9**). Com base nesse parâmetro bioquímico, as amostras utilizadas durante os tratamentos não promoveram toxicidade renal, já que a deficiência da filtração glomerular deve-se ao aumento da concentração de creatinina no sangue. Segundo Motta (2003), teores diminuídos de creatinina não apresentam significado clínico. Isto sugere que a redução significativa nos níveis de creatinina de animais portadores de tumor do **Experimento 2** não possui relevância biológica.

A coleta de urina de animais para fins científicos é muito comum para avaliar determinados parâmetros fisiológicos. Camundongos e ratos são os mamíferos mais utilizados em testes de toxicidade aguda e crônica e em avaliações pré-clínicas de drogas e agentes químicos. Nesse sentido, avaliações da urina são importantes para investigar a função renal, a excreção de xenobióticos e de seus metabólitos e a existência de anormalidades endócrinas ou

metabólicas (KURIEN *et al*, 2004). A importância em se avaliar a cor e o aspecto da urina deve-se a possíveis alterações causadas pelos tratamentos, sendo o padrão normal amarelo citrino com aspecto límpido. A densidade é utilizada para identificar a capacidade do animal em concentrar a urina. Assim, a liberação normal do hormônio antidiurético (ADH) e a presença de população suficiente de néfrons e de túbulos funcionais que respondam ao ADH são fatores responsáveis por manter uma determinada concentração de solutos na medula renal que resulte em uma densidade próxima a 1010. Além do funcionamento renal, a densidade reflete o uso de medicamentos, intoxicações e infecções (BICALHO & CARNEIRO, 2012).

O exame da urina obtida dos camundongos do **Experimento 1** (sem implante tumoral) contribuiu com a análise de creatinina sérica, corroborando o bom funcionamento renal, já que a densidade urinária de todos os grupos foi de 1010. Os resultados da urina de animais tratados com Rh<sub>2</sub>Cit, Magh-Rh<sub>2</sub>Cit e Magh-Cit foram bastante semelhantes aos do grupo sadio, havendo divergência apenas no valor do pH de animais tratados com 14,1 mg/kg de Rh<sub>2</sub>Cit. Neste grupo, observou-se pH com valor aumentado em relação ao do grupo sadio, havendo, ainda, a formação de precipitados de fosfatos em dois animais, comum em urina alcalina. Também foi verificada a formação de fosfato triplo nos camundongos dos grupos Magh-Rh<sub>2</sub>Cit e Magh-Cit, embora os valores de pH por eles apresentados não tenham divergido estatisticamente ao dos animais sadios. Em relação à taxa de glicose na urina, observou-se que apenas um animal do grupo sadio apresentou alta concentração (500 mg/dL). Tal fato pode estar associado à alimentação, uma vez que os animais não foram submetidos a jejum antes da coleta da urina. Os demais camundongos apresentaram níveis de glicose compatíveis com os valores de referência (50 a 190 mg/dL) (VIANA, 2007), o que sustenta a proposta de ausência de toxicidade renal pelos tratamentos. A reabsorção da glicose para o sangue depende do correto funcionamento dos túbulos renais, o que não permite o excesso de glicose na urina. Verificou-se, ainda, diminuição significativa de células epiteliais do grupo Magh-Rh<sub>2</sub>Cit em relação aos grupos Rh<sub>2</sub>Cit e Magh-Cit sem, contudo, apresentar diferença em relação aos animais sadios, indicando descamação normal das células do trato urinário.

A contagem de plaquetas no sangue consiste em exame de rotina laboratorial, incluído no hemograma automatizado, sendo que aumentos e diminuições do volume plaquetário podem estar relacionados a determinadas patologias. A plaquetopenia ou trombocitopenia é a redução do número de plaquetas no sangue e pode estar relacionada com tratamentos químicos. A padronização do valor de referência para o volume plaquetário não apresenta consenso na literatura, o que cria a necessidade de um grupo sem tratamento para comparar os

resultados (NEMZEK *et al*, 2001; GREISENEGGER *et al*, 2004; SANTOS *et al*, 2008; NAMDEV *et al*, 2009). Assim, ao comparar a concentração plaquetária do sangue de camundongos do grupo sadio, verificou-se redução significativa apenas no **Experimento 3**, nos animais portadores de carcinoma mamário dos grupos controle, Rh<sub>2</sub>Cit e Magh-Cit (**Tabela 15**). Possivelmente, essa redução do número de plaquetas está relacionada à presença do tumor, e não aos tratamentos, levando-se em consideração que o grupo controle, sem tratamento, também apresentou menor quantidade.

O leucograma consiste na avaliação dos leucócitos, também denominados glóbulos brancos, incluindo o total de células e a quantificação relativa de cada tipo de leucócito. Dentre estes, o mais abundante no sangue periférico dos camundongos é o linfócito, correspondendo a  $\frac{3}{4}$  do total, sendo o neutrófilo o segundo tipo mais comum. Os dados de percentagem relativa de linfócitos constituem significado limitado, sendo importante a contagem absoluta dessas células. A quantificação de leucócitos em camundongos varia muito entre laboratórios, de 2000 a 10000/mm<sup>3</sup> de sangue (EVERDS, 2007).

Na avaliação de toxicidade aguda realizada no **Experimento 1**, não se observou diferença estatística dos valores do leucograma de camundongos tratados em relação aos sadios. Em contrapartida, houve aumento na percentagem de Neutrófilos + Monócitos dos grupos Magh-Rh<sub>2</sub>Cit e Mag-Cit em relação ao Rh<sub>2</sub>Cit (**Tabela 16**). Tal fato não deve possuir relevância biológica, pois a quantidade dessas células não ultrapassou os valores de referência (30%, VIANA, 2007).

A presença de carcinoma mamário nos camundongos dos **Experimentos 2 e 3** refletiu em diminuição e aumento significativos da percentagem de linfócitos e neutrófilos, respectivamente (**Tabelas 17 e 18**). Isto pode estar relacionado com a resposta do sistema imune às células tumorais, provocando maior produção leucocitária e consequente aumento do baço (esplenomegalia) (**Figura 17**), já que esse órgão tem função secundária na produção de leucócitos. Os neutrófilos tiveram produção muito aumentada em ambos os experimentos com implantação tumoral, ultrapassando em mais de 20 vezes a concentração obtida dos animais sadios (**Tabelas 17 e 18**), estando elevada, também, em relação ao valor de referência descrito por Nemzek *et al*, (2001) (5700/mm<sup>3</sup>±0,4). Em relação à concentração absoluta de linfócitos, não se observou diferença significativa de seus valores em relação ao grupo sadio em nenhum dos dois experimentos, embora tenha havido um acréscimo dessas células em animais portadores de tumor no **Experimento 3** (**Figura 19**). Os valores das demais células descritas no leucograma (eosinófilos e monócitos) não apresentaram diferenças estatísticas em relação ao grupo sadio no **Experimento 2**. Já para o **Experimento 3**, o valor de eosinófilos de

animais tratados com Magh-Cit foi aumentado, embora ainda esteja dentro do intervalo de referência (1 a 3%, VIANA, 2007), sugerindo que os tratamentos utilizados pouco interferiram no metabolismo desses glóbulos brancos.

A histopatologia do pulmão contribuiu com as análises do leucograma em virtude do que foi verificado nos vasos entre alvéolos pulmonares. No **Experimento 1**, sem implante de células tumorais, observou-se baixa concentração leucocitária no interior dos vasos de todos os grupos, não demonstrando processo inflamatório em virtude dos tratamentos. Além disso, a presença de linfócitos nos vasos, em detrimento de neutrófilos, foi passível de identificação (**Figura 20**) corroborando os dados do leucograma do **Experimento 1** (**Tabela 16**). Todavia, nos **Experimentos 2 e 3**, assim como nos respectivos leucogramas, foi observado um aumento na concentração leucocitária nos vasos da parede alveolar de animais portadores de carcinoma mamário. A presença de linfócitos foi destacada nos grupos sadios dos dois experimentos em relação à quantidade existente nos grupos com tumor. Nestes, houve aumento perceptível no número de neutrófilos em relação ao de linfócitos (**Figuras 21 e 22**). Além disso, a morfologia pulmonar mostrou-se sem alteração em todos os grupos dos **Experimentos 1, 2 e 3**, com espaços alveolares não colabados e sem espessamento dos septos interalveolares. Ainda, o tecido pulmonar de animais tratados com Magh-Rh<sub>2</sub>Cit e Magh-Cit apresentou NPs no parênquima perivascular e, em grande quantidade, no interior de pequenos vasos sanguíneos, sendo que, nos três experimentos, houve um maior acúmulo de Magh-Rh<sub>2</sub>Cit do que de Magh-Cit (**Figuras 20-22**).

A medula óssea é um dos tecidos mais sensíveis a agentes citotóxicos devido a sua rápida taxa de renovação celular. Estudos com animais de laboratório mostraram que é possível identificar toxicidade na medula óssea em níveis de exposição que não causariam outros sinais de toxicidade (NIH, 1993; MALERBA *et al*, 2002). Assim, na avaliação biológica de um composto químico, a mielotoxicidade deve ser considerada, já que as células da medula óssea apresentam alto índice mitótico, sendo suscetíveis a compostos capazes de realizar ligações com o DNA, como os carboxilatos de ródio (II) (NIH, 1993; MALERBA *et al*, 2002, ANGELES-BOZA *et al*, 2006; CARNEIRO, 2011). Nesse sentido as células da medula óssea de camundongos tratados com Rh<sub>2</sub>Cit, Magh-Rh<sub>2</sub>Cit e Magh-Cit foram avaliadas para verificar os possíveis danos dessas composições ao DNA.

Na avaliação da medula óssea de camundongos portadores de carcinoma mamário do **Experimento 3**, apenas os tratados com Magh-Cit apresentaram aumento percentual significativo de fragmentação de DNA em relação aos grupos sadio e controle. Nos animais tratados com Rh<sub>2</sub>Cit e Magh-Rh<sub>2</sub>Cit, verificou-se, respectivamente, redução e aumento não

significativo de fragmentação de DNA comparado aos camundongos sem tratamento (**Figura 37**). Os resultados referentes aos tratamentos com Magh-Rh<sub>2</sub>Cit e Magh-Cit foram semelhantes aos descritos por Carneiro (2011), em que essas composições foram administradas localmente no tumor. Entretanto, nos tratamentos com Rh<sub>2</sub>Cit, o aumento da porcentagem de fragmentação de DNA verificada por Carneiro (2011) divergiu do que foi verificado com aplicação via intravenosa. Desta forma, sugere-se que os tratamentos com as formulações nanoparticuladas possam induzir genotoxicidade às células da medula óssea, enquanto que para o Rh<sub>2</sub>Cit faz-se necessária a realização de outros experimentos que possam corroborar os já realizados.

## 6.2 Considerações sobre efeito antitumoral

Os modelos animais representam um meio alternativo para investigação de tratamentos de câncer. Camundongos de laboratório (*Mus musculus*) estão entre os melhores modelos para estudar neoplasias devido a vários fatores como: o seu pequeno tamanho, a capacidade de procriação em cativeiro, o período de vida de três anos, a grande similaridade fisiológica e molecular com humanos e o genoma totalmente seqüenciado (FRESE & TUVESON, 2007). Além disso, o crescimento tumoral se desenvolve mais uniformemente e rapidamente em camundongos, o que é vantajoso para testes com drogas. Ainda, o fácil acesso aos tecidos tumorais em todos os estágios da doença facilita os estudos de farmacocinética e farmacodinâmica, gerando informações adequadas sobre a efetividade da droga no tecido alvo (ABATE-SHEN, 2006).

Camundongos da linhagem BALB/c são muito usados em pesquisa científica devido à sua similaridade genotípica, que reflete em grande semelhança entre os animais em estudo e aumenta a reprodutibilidade das conclusões. A utilização desses camundongos como modelo de estudo de patologias humanas também é favorecida pela facilidade na administração de fármacos, inclusive pela via intravenosa, e na coleta de sangue (CHORILLI *et al*, 2007). Nesse sentido, para estudos de câncer de mama utilizando-se desses animais isogênicos a linhagem celular de carcinoma mamário 4T1 representa uma boa alternativa já que foi isolada de camundongos BALB/c. As células 4T1 são facilmente manipuladas *in vitro* ou *in vivo*, podendo ser implantadas ortopicamente na glândula mamária. Por serem muito invasivas, formam metástases espontâneas a partir do tumor primário, espalhando-se para sítios

distantes, de modo análogo ao que ocorre em humanos (PULASKI & OSTRAND-ROSENBERG, 2000).

O implante tumoral realizado nos **Experimentos 2 e 3** seguiu o padrão descrito por Carneiro (2011), que utilizou  $2 \times 10^4$  células 4T1 no estabelecimento de um tumor ortópico. Embora os dois experimentos tenham seguido os mesmos procedimentos (mesmo número de células cultivadas sob as mesmas condições nutricionais e tempo de 19 dias para coleta do tumor), o tamanho tumoral apresentou-se menor no **Experimento 3** comparando-se ao **2**. Isso, contudo, não refletiu em prejuízo aos resultados, pois em ambas as análises, o tumor se desenvolveu adequadamente na glândula mamária (**Figuras 11 e 12**). Além disso, como em cada experimento o implante tumoral foi realizado aleatoriamente nos camundongos, a atividade antitumoral das composições utilizadas pôde ser comparada com o respectivo grupo controle.

Desse modo, no **Experimento 2**, o volume obtido dos tumores após os tratamentos apresentaram uma redução não significativa em relação ao grupo controle. Considerando as médias do volume tumoral de cada grupo, os tratamentos com Rh<sub>2</sub>Cit, Magh-Rh<sub>2</sub>Cit e Magh-Cit inibiram o tumor em 44,9%, 53,8% e 58,4%, respectivamente. Assim, embora tenha havido variações das respostas aos tratamentos entre os diferentes animais de cada grupo, aumentando o erro padrão, é possível que a redução na média do volume tumoral tenha relevância biológica, sugerindo que as formulações utilizadas apresentaram atividade antitumoral em camundongos BALB/c.

No **Experimento 2**, os tratamentos com Rh<sub>2</sub>Cit, dose total de 1,5 mg/kg (três aplicações de 0,5 mg/kg), provocaram menor redução tumoral comparada à sua associação com NPs. Tal fato pode estar relacionado à alta hidrofília do citrato de ródio (II) (ZYNGIER *et al*, 1989) que aumenta a sua dispersão pelo organismo, principalmente por se tratar de tratamentos realizados por via intravenosa. Nos experimentos *in vivo* conduzidos por Carneiro (2011), os camundongos BALB/c, sob as mesmas condições experimentais descritas na presente dissertação, foram tratados via subcutânea, com injeção aplicada próxima ao tumor. Os animais também foram submetidos a tratamentos com Rh<sub>2</sub>Cit e Magh-Rh<sub>2</sub>Cit, concentração final de 2,0 mg/kg (sete aplicações de 0,28 mg/kg). Nesse estudo foi observada uma redução tumoral de 74,5% e 52,2%, respectiva aos tratamentos com Rh<sub>2</sub>Cit e Magh-Rh<sub>2</sub>Cit em relação ao seu grupo controle. Tais resultados demonstraram que em uma aplicação local, o citrato de ródio (II) livre tem maior efeito antitumoral do que associado a NPs. Isso reforça o argumento de que, no **Experimento 2**, com tratamento sistêmico, o Rh<sub>2</sub>Cit tenha sofrido maior dispersão pelo organismo e, desse modo, tenha provocado uma

menor redução tumoral em relação ao Magh-Rh<sub>2</sub>Cit. Possivelmente a associação das NPs com o Rh<sub>2</sub>Cit possa ter ajudado no direcionamento passivo do Magh-Rh<sub>2</sub>Cit para o tumor, já que este possui uma vasculatura frouxa que permite a passagem dessas partículas, aumentando sua permeabilidade. Além disso, a drenagem linfática existente ao redor do tumor é pobre o que provoca uma maior retenção de NPs nesse tecido (SARFATI *et al.*, 2011).

Uma análise comparativa foi realizada para descobrir se uma maior concentração de Rh<sub>2</sub>Cit em relação ao Magh-Rh<sub>2</sub>Cit poderia aumentar o efeito antitumoral do citrato de ródio (II). Desse modo, foi utilizada uma concentração cinco vezes maior de Rh<sub>2</sub>Cit (2,4 mg/kg) no **Experimento 3** em relação ao **Experimento 2**, sendo que para o tratamento com Magh-Rh<sub>2</sub>Cit, a concentração foi mantida em 0,5 mg/kg. Logo, verificou-se, no **Experimento 3**, que as médias da massa tumoral dos tratamentos com Rh<sub>2</sub>Cit, Magh-Rh<sub>2</sub>Cit e Magh-Cit resultaram em inibição de 18,0%, 15,2% e 21,0%, respectivamente, quando comparadas ao grupo controle. Portanto o acréscimo na concentração de Rh<sub>2</sub>Cit causou um aumento sutil no efeito antitumoral em relação ao Magh-Rh<sub>2</sub>Cit. Embora o cálculo do volume tumoral seja comum em estudos de câncer (KUKOWSKA-LATALLO *et al.* 2005), acredita-se que a metodologia de pesagem, usada no **Experimento 3**, seja mais apropriada do que as mensurações realizadas no **Experimento 2**. Segundo Machado e Melo-Junior (2009), o peso dos tumores é um parâmetro ponderal importante para monitorar efeitos anti-neoplásicos. De modo semelhante, o peso dos animais também contribuiu para avaliar o efeito antitumoral no **Experimento 3**, havendo, ao longo dos 19 dias de tratamento, aumento na massa corporal dos animais dos grupos sadio e tratados, enquanto que no grupo controle o peso dos animais começou a decair a partir do 11º dia (**Figura 10**). Isso pode estar relacionado à maior debilidade do organismo dos camundongos não tratados, em que houve um maior crescimento tumoral.

Foi constatada uma menor inibição tumoral por Rh<sub>2</sub>Cit, Magh-Rh<sub>2</sub>Cit e Magh-Cit no **Experimento 3** em relação ao **2**. Tal fato deve-se, possivelmente, à redução na concentração de ferro das NPs do **Lote 2**, utilizadas no **Experimento 3** (**Tabelas 1 e 2**), de modo que uma menor quantidade de NPs tenham sido direcionadas ao tumor, resultando em um efeito anti-neoplásico menos efetivo. Por outro lado, essa menor inibição tumoral pode estar relacionada ao menor crescimento das células 4T1 observado em todos os grupos do **Experimento 3**.

O efeito anti-neoplásico, descrito para os **Experimentos 2 e 3**, foi realçado pela morfometria das áreas de necrose dos tumores. Essa metodologia já foi descrita em carcinoma mamário sólido de Ehrlich para verificar ação antitumoral (MIRANDA-VILELA *et al.*, 2011). Portanto, o maior percentual de área de necrose mensurada a partir das fotomicrografias dos

tumores de camundongos tratados com Magh-Rh<sub>2</sub>Cit no **Experimento 2 (Figura 28 e 29)**, e dos tratados com Rh<sub>2</sub>Cit no **Experimento 3 (Figura 30 e 31)** estão de acordo com a maior redução tumoral observada nesses experimentos.

Nos tratamentos com Magh-Cit, em que não houve associação de NPs com ródio (II), foi constatada, nos **Experimentos 2 e 3**, uma sutil redução do volume e do peso, respectivamente, dos tumores em relação aos outros grupos (**Figuras 14 e 16**). Tal fato deve-se, possivelmente, à sua associação com o citrato, o qual é descrito na literatura como um bom agente antioxidante (HRAS *et al*, 2000). Em contrapartida, essa composição apresentou um menor percentual de área de necrose tumoral nos **Experimentos 2 e 3**, quando comparado aos tratamentos com Magh-Rh<sub>2</sub>Cit e Rh<sub>2</sub>Cit, respectivos a esses experimentos (**Figuras 28 e 30**). Nesse sentido, a utilização de carboxilato de ródio (II) ligado às NPs funcionalizadas por citrato pode ter provocado um maior efeito antitumoral nos camundongos. Além disso, o reduzido tamanho das nanopartículas pode ter influenciado no direcionamento do citrato de ródio (II) ao tumor.

A microvasculatura tumoral possui natureza descontínua e frouxa com poros variando de 100 a 1000 nm de diâmetro diferente da vasculatura de tecidos saudáveis em que há junções celulares estreitas com menos de 10 nm (HUGHES, 2005). Levando-se em consideração o tamanho hidrodinâmico das NPs dos **Experimentos 2 e 3**, 60 e 158 nm respectivamente, a informação acima demonstra a possibilidade de haver uma maior permeabilidade e retenção das NPs no tumor em relação a outros tecidos. Por microscopia eletrônica de transmissão verificou-se, após mensuração de mais de 300 NPs, um diâmetro modal de 7,85 e 8,91 nm, respectivos aos **Experimentos 2 e 3**. Tal fato, juntamente com as análises por microscopia eletrônica de varredura (**Figura 6 A**), sugere que o aumento do tamanho hidrodinâmico deve-se à formação de agregados de NPs. Possivelmente a associação das NPs com o Rh<sub>2</sub>Cit possa ter ajudado no direcionamento do Magh-Rh<sub>2</sub>Cit para o tumor, já que este requer maior quantidade de ferro para divisão celular (KWOK & RICHARDSON, 2002).

## 7 CONCLUSÃO

- O implante ortópico de  $2 \times 10^4$  células do carcinoma mamário da linhagem 4T1 em camundongos BALB/c foi adequado para o estabelecimento tumoral na glândula mamária, possibilitando a realização de testes *in vivo* para identificar a ação anti-neoplásica de novos compostos.
- Rh<sub>2</sub>Cit aplicado sistemicamente induziu efeito antitumoral, constatado pela redução do tumor e do aumento da sua área de necrose. Contudo, a associação com NPs de maghemita tornou a ação deste composto ainda mais eficaz, pois no experimento com iguais concentrações de Rh<sub>2</sub>Cit e de Magh-Rh<sub>2</sub>Cit verificou-se, neste último tratamento, a maior percentagem de área de necrose.
- Os tratamentos realizados em animais sem carcinoma mamário não resultaram em distúrbios hematológicos, bioquímicos e de parâmetros da urina, sugerindo baixa toxicidade das composições utilizadas no presente trabalho. Isto indica que as alterações hematológicas e bioquímicas verificadas nos animais implantados com células neoplásicas dos grupos tratados estão relacionadas com a presença do tumor.
- As análises genotóxicas da medula óssea e histopatológicas do fígado constituíram indicativo de toxicidade causado principalmente pelas NPs. Estas foram visualizadas no interior de vasos do pulmão, sem, contudo, resultar em danos visíveis neste órgão.

## 8 PERSPECTIVAS

Considerando o promissor efeito antitumoral de Magh-Rh<sub>2</sub>Cit em camundongos portadores de carcinoma mamário, estudos de toxicidade envolvendo testes de sobrevivência já estão sendo realizados em nosso laboratório a fim de dar continuidade a esta pesquisa. Além disso, o fato desta composição ter apresentado elevada estabilidade e potencial magnético abre perspectivas para investigar o seu efeito antitumoral na presença de campo magnético, que, por sua vez, poderia representar uma melhor eficácia terapêutica para o câncer de mama.

## 9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABATE-SHEN, C. A New Generation of Mouse Models of Cancer for Translational Research. **Clinical Cancer Research**, v. 18, n. 12, p. 5274-5276, 2006.

ABDELHALIM, M. A. K.; JARRAR, B. M. Histological alterations in the liver of rats induced by different gold nanoparticle sizes, doses and exposure duration. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 10, n. 5, p. 1-9, 2012.

ALEXIOU, C.; JURGONSA, R.; SCHMIDA, R.; HILPERTB, A.; BERGEMANN, C.; PARAKD, F.; IROA, H. *In vitro* and *in vivo* investigations of targeted chemotherapy with magnetic nanoparticles. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 293, p. 389-393, 2005.

ALLÉMANN, E.; LEROUX, J. C.; GURNY, R.; DOELKER, E. *In vitro* extended-release properties of drug-loaded poly(DL-lactic acid) nanoparticles produced by a salting-out procedure. **Pharmaceutical Research**, v. 10, p. 1732-1737, 1993.

ALMEIDA, V. L.; LEITÃO, A.; REINA, L. C. B.; MONTANARI, C. A.; DONNICI, C. L. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o dna: uma introdução. **Química Nova**, v. 28, n. 1, p. 118-129, 2005.

AL-SHAMMAA, H. A. H.; YONEMURA, Y. L. Y. Current status and future strategies of cytoreductive surgery plus intraperitoneal hyperthermic chemotherapy for peritoneal carcinomatosis. **World Journal of Gastroenterology**, v. 8, n. 14, p. 1159-1166, 2008.

American Cancer Society. Global Cancer Facts & Figures 2<sup>nd</sup> Edition. Atlanta: American Cancer Society. 2011.

ANGELES-BOZA, A. M.; CHIFOTIDES, H. T.; AGUIRRE, J. D.; CHOUAI, A.; FU, P. K. L., DUNBAR, K. R., TURRO, C. Dirhodium (II,II) complexes: molecular characteristics that affect *in vitro* activity. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 49, n. 23, 2006.

ARRUEBO, M.; PACHECO, R. F.; IBARRA, M. R.; SANTAMARÍA, J. Magnetic nanoparticles for drug delivery. **NanoToday**, v. 2, n. 3, p. 22-32, 2007.

BARROS, A. C. S. D.; BARBOSA, E. M.; GEBRIM, L. H. Diagnóstico e Tratamento do Câncer de Mama. **Projeto Diretrizes Associação Médica Brasileira e Conselho Federal de Medicina**, p. 1-15, 2001.

BERGMANN, A.; Mattos, I. E.; Koifman, R. J.; Koifman, S. Morbidade após o tratamento para câncer de mama. **Fisioterapia Brasil**, v.1, n. 2, p. 101-108, 2000.

BERRY, C. C.; CURTIS, A. S. G. Functionalisation of magnetic nanoparticles for applications in biomedicine. **Journal of Physics D: Applied Physics**, v. 36, p. 198-206, 2003.

BICALHO, A. P. C. V.; CARNEIRO, R. A. **Apostila de Patologia Clínica**, p. 85. <http://pt.scribd.com/doc/59378076/Patologia-Clinica-Apostila-de-Adriane-Pimenta-da-Costa-Val-Bicalho-Rubens-Antonio-Carneiro>, acessado em 04/03/2012.

BOYLE, P.; LEVIN, B. **World Cancer Report 2008**. Lyon, France: World Health Organization. International Agency for Research on Cancer; 2008.

BRUGIN, A. **Avaliação da biocompatibilidade/ toxicidade de fluido magnético composto de nanopartículas de maghemita recobertas com citrato em camundongos fêmeas Swiss**. 86f. (Mestrado), Universidade de Brasília, Brasília, 2007.

CARNEIRO, M. L. B. **Efeitos biológicos de citrato de ródio (II) livre e associado a nanopartículas magnéticas e a magnetolipossomas em células de carcinoma mamário: estudos in vitro e in vivo**. 130 f. (Doutorado), Universidade de Brasília, Brasília, 2011.

CARNEIRO, M. L. B.; JOANITTI, G. A.; LONGO, J. P. F.; PEIXOTO, R. C. A.; BÁO, S. N. Microscopy features of mice cancer models induced by tumor cell transplantation and chemical agents. **Microscopy: Science, Technology, Applications and Education**, n. 4, p. 946-952, 2010.

CARNEIRO, M. L. B.; LACAVA, Z. G. M.; MORAIS, P. C.; TEDESCO, A. C.; SIMIONI, A. R.; SOUZA, A. R.; NUNES, E. S.; BAO, S. N. Composições Antitumorais a Base de Ródio (II) e Fluidos Magnéticos, Composto Antitumoral, seu Processo de Obtenção e suas Aplicações na Preparação de Medicamentos para o Tratamento de Neoplasias. **Patente**, depositada em 11/01/2011a, sob o nº PII100733-8 no INPI.

CARNEIRO, M. L. B.; NUNES, E. S.; PEIXOTO, R. C. A.; OLIVEIRA, R. G. S.; LOURENÇO, L. H. M.; SILVA, I. C. R.; SIMIONI, A. R.; TEDESCO, A. C.; SOUZA, A. R.; LACAVA, Z. G. M.; BÁO, S. N. Free Rhodium (II) citrate and rhodium (II) citrate magnetic carriers as potential strategies for breast cancer therapy. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 9, n. 11, p. 1-17, 2011b.

CENTER, S. A. Interpretation of liver enzymes. **Veterinary Clinics Small Animal Practice**, v. 37, p. 297-333, 2007.

CHORILLI, M.; MICHELIN, D. C.; SALGADO, H. R. N. Animais de laboratório: o camundongo. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 28, n. 1, p. 11-23, 2007.

COUVREUR, P.; VAUTHIER, C. Nanotechnology: intelligent design to treat complex disease. **Pharmaceutical Research**, v. 23, n. 7, p. 1417-1450, 2006.

CULLEN, J. M.; MILLER, R. T. The role of pathology in the identification of drug-induced hepatic toxicity. **Expert Opin Drug Metab Toxicol**, v. 2, n. 2, p. 241-247, 2006.

DOUZIECH-EYROLLES, L.; MARCHAIS, H.; HERVÉ, K.; MUNNIER, E.; SOUCÉ, M.; LINASSIER, C.; DUBOIS, P.; CHOURPA, I. Nanovectors for anticancer agents based on superparamagnetic iron oxide nanoparticles. **International Journal of Nanomedicine**, v. 4, n. 2, p. 541-550, 2007.

DUNHAM, S. U.; CHIFOTIDES, H. T.; MIKULSKI, S.; BURR, A. E.; DUNBAR, K. R. Covalent Binding and Interstrand Cross-Linking of Duplex DNA by Dirhodium (II,II) Carboxylate Compounds. **Biochemistry**, v. 44, p. 996-1003, 2005.

EVERDS, N. E. Hematology of the laboratory mouse. **The Mouse in Biomedical Research**, 2<sup>a</sup> ed., Elsevier, capítulo 5, p. 133-170, 2007.

FAHMY, T. M.; FONG, P. M.; GOYAL, A.; SALTZMAN, W. M. Targeted for drug delivery. **NanoToday**, v. 1, p. 18-26, 2005.

FRESE, K. K.; TUVESON, D. A. Maximizing mouse cancer models. **Nature Publishing Group**, v. 7, p. 645-658, 2007.

GARBER, K. Realistic Rodents? Debate Grows Over New Mouse Models of Cancer. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 98, p. 1176-1178, 2006.

GIL, E. S.; KUBOTA, L. T.; NAJJAR, R. Potencialidades da utilização de compostos de ródio na confecção de sensores eletroquímicos: uma breve revisão. **Química Nova**, v. 6, n. 21, 1998.

GOLALIPOUR, M. J.; GHAFARI, S.; FARSI, M. M. Effect of urtica dioica l extract on quantitative morphometric alterations of liver parenchymal cells in stz diabetic rats. **Int. J. Morphol.**, v. 4, n. 27, p. 1339-1344, 2009.

GOLDSHTEIN, I.; NEEMAN, U.; CHODICK, G.; SHALEV, V. Variations in hemoglobin before colorectal cancer diagnosis. **Eur J Cancer Prev**, v. 5, n. 19, p. 342-344, 2010.

GREISENEGGER, S.; ENDLER, G.; HSIEH, K.; TENTSCHERT, S.; MANNHALTER, C.; LALOUSCHEK, W. Is elevated mean platelet volume associated with a worse outcome in patients with acute ischemic cerebrovascular events? **Stroke**, v. 35, p. 1688-1691, 2004.

HALEY, B.; FRENKEL, E. Nanoparticles for drug delivery in cancer treatment. **Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations**, v. 26, p. 57-64, 2008.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The hallmarks of cancer. **Cell**, v. 100, p. 57-70, 2000.

HEINDRYCKX, F.; COLLE, I.; VLIERBERGHE, H. V. Experimental mouse models for hepatocellular carcinoma research. **International Journal of Experimental Pathology**, v. 90, p. 367-386, 2009.

HENNIGHAUSEN, L.; ROBINSON, G. W. Information networks in the mammary gland. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 6, p. 715-725, 2005.

HILGER, I.; HERGT, R.; KAISER, W. A. Use of magnetic nanoparticle heating in the treatment of breast cancer. **IEE Proc.-Nanobiotechnol**, v. 152, n. 1, p. 33-39, 2005.

HRAS, A. R.; HADOLIN, M.; KNEZ, Z.; BAUMAN, D. Comparison of antioxidative and synergistic effects of rosemary extract with  $\alpha$ -tocopherol, ascorbyl palmitate and citric acid in sunflower oil. **Food Chemistry**, v. 71, p. 229-233, 2000.

HUGHES, G. A. Nanostructure-mediated drug delivery. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 1, p. 22-30, 2005.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (INCA). **A Situação do Câncer no Brasil**. Rio de Janeiro, 2006. 119 p.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (INCA), MINISTÉRIO DA SAÚDE. Incidência de câncer no Brasil. São Paulo (Brasil): **INCA**- <http://www.inca.gov.br>, acessado em 02/02/2012.

KATSAROS, N.; ANAGNOSTOPOULOU, A. Rhodium and its compounds as potential agents in cancer treatment. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v.42, p 297–308, 2002.

KE, W. M.; XIE, S. B.; YU, L. N.; LIU, T.; LAI, J.; HE, D. Q.; LI, X. H.; GAO, Z. L.; KE, Y.; CHEN, P. J. Decline of serum HBV DNA and no change apportioned by the same hepatic parenchyma cell volume from hepatic fibrosis stage 1 to stage 4 during the natural history of chronic hepatitis B. **Intervirolgy**, v.51, p. 235-240, 2008.

KERBEL, R. S. Human tumor xenografts as predictive preclinical models for anticancer drug activity in humans: better than commonly perceived-but they can be improved. **Cancer Biology and Therapy**, v. 2, p. 134-139, 2003.

KIM, G. J.; NIE, S. Targeted cancer nanotherapy. **Nanotoday**, v. 1, p. 28-33, 2005.

KUKOWSKA-LATALLO, J. F., CANDIDO, K. A., CAO, Z., NIGAVEKAR, S. S., MAJOROS, I. J., THOMAS, T. P., BALOGH, L. P., KHAN, M. K., BAKER, J. R. Nanoparticle targeting of anticancer drug improves therapeutic response in animal model of human epithelial cancer. **Cancer Research**, v.65, n.12, p. 5317-5324, 2005.

KURIEN, B. T.; EVERDS, N. E. SCOFIELD, R. H. Experimental animal urine collection: a review. **Laboratory Animals Ltd. Laboratory Animals**, v 38, p. 333-361, 2004.

KURIEN', B. T.; SCOFIELD, R. H. Mouse urine collection using clear plastic wrap. **Laboratory Animals Ltd**, v. 33, p. 83-86, 1999.

KWOK, J. C.; RICHARDSON, D. R.; The iron metabolism of neoplastic cells: alterations that facilitate proliferation? **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 42, p. 65-78, 2002.

LACAVA, L. M.; LACAVA, Z. G. M.; Da SILVA, M. F.; SILVA, O.; CHAVES, S. B.; AZEVEDO, R. B.; PELEGRINI, F.; GANSAU, C.; BUSKE, N.; SABOLOVIC, D.; MORAIS, P. C. Magnetic Resonance of a Dextran-Coated Magnetic Fluid Intravenously Administered in Mice. **Biophysical Journal**, v. 80, p. 2483-2486, 2001.

LACAVA, Z. G. M.; AZEVEDO, R. B.; MARTINS, E. V.; LACAVA, L. M.; FREITAS, M. L. L.; GARCIA, V. A. P.; RÉBULA, C. A.; LEMOS, A. P. C.; SOUSA, M. H.; TOURINHO, F. A.; Da SILVA, M. F.; MORAIS, P. C. Biological effects of magnetic fluids: toxicity studies. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 201, p. 431-434, 1999.

LANGIANO, V. C.; MARTINEZ, C. B. R. Toxicity and effects of a glyphosate-based herbicide on the Neotropical fish *Prochilodus lineatus*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 147, p. 222-231, 2008.

LÜBBE, A. S.; BERGEMANN, C.; HWHNT, W.; FRICKE, T.; RIESS, H.; BROCK, J. W.; HUHN, D. Preclinical experiences with magnetic drug targeting: tolerance and efficacy. **Cancer Research**, v. 56, p. 4694-4701, 1996.

MACHADO, M. C. F. P.; MELO-JUNIOR, M. R. Avaliação do efeito antitumoral da kalanchoe brasiliensis sobre o sarcoma 180 em camundongos. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 1, n. 6, p. 1-6, 2009.

MALERBA, I.; CASTOLDI, A. F.; PARENT-MASSIN, D.; GRIBALDO, L. In vitro myelotoxicity of propanil and 3,4-dichloroaniline on murine and human CFU-E/BFU-E progenitors. **Toxicological Sciences**, v. 69, p. 433-438, 2002.

MENCACCI, A.; CENCI, E.; BOELAERT, J. R.; BUCCI, P.; MOSCI, P.; D'OSTIANI, C. F.; BISTONI, F.; ROMANI, L. Iron overload alters innate and t helper cell responses to *candida albicans* in mice. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 175, p. 1467-1476, 1997.

MIRANDA-VILELA, A. L.; PORTILHO, F. A.; DE-ARAÚJO, V. G. B.; ESTEVANATO, L. L. C.; MEZZOMO, B. P.; DE-ALMEIDA-SANTOS, M. De F. M.; LACAVAL, Z. G. M. The protective effects of nutritional antioxidant therapy on Ehrlich solid tumor-bearing mice depend on the type of antioxidant therapy chosen: histology, genotoxicity and hematology evaluations. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 22, p. 1091-1098, 2011.

MOTTA, V. T. Creatinina. In: R. Editorial (Ed.). **Bioquímica Clínica: Princípios e Interpretações**. Porto Alegre: Editora Médica Missau, Creatinina, p.232-246, 2003.

MORAIS, P. C. De. Ferrofluidos biocompatíveis e magnetolipossomas. **III Escola Brasileira de Magnetismo Jorge André Swieca**, p. 1-14, 2001.

NAMDEV, R.; DUTTA, S. R.; SINGH, H. Acute immune thrombocytopenic purpura triggered by insect bite. **Journal of Indian Society of Pedodontics and Preventive Dentistry**, v. 27, n. 1, p. 58-61, 2009.

National Institutes of Health (NIH). A chemical mixture of 25 groundwater contaminants. **National Toxicology Program**, n. 35, 1993.

NEMZEK, J. A.; BOLGOS, G. L.; WILLIAMS, B. A.; REMICK, D. G. Differences in normal values for murine white blood cell counts and other hematological parameters based on sampling site. **Inflammation Research**, v. 50, p. 523-527, 2001.

NIE, S.; XING, Y.; KIM, G. J.; SIMONS, J. W. Nanotechnology applications in cancer. **Annu. Rev. Biomed. Eng.**, v. 9, p. 257-288, 2007.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger Princípios de Bioquímica**. 4ª. Sarvier, 2006, 1202.

NUNES, E. S.; SOUZA, A. R.; CARNEIRO, M. L. B.; PEIXOTO, R. C. A.; LACAVAL, Z. M. G.; BÁO, S. N.; MORAIS, P. C. Colloid preparation of maghemite nanoparticles

functionalized with dirhodium (II) citrate. **8th International Conference on the Scientific and Clinical Applications of Magnetic Carriers**, p. 143, 2010.

PERES, C. M. R. C. Como cultivar células: **Guanabara Koogan** (Grupo GEN), v.1, 2005.

POLEKSIĆ, V.; MITROVIĆ-TUTUNDŽIĆ, V. Fish gills as a monitor of sublethal and chronic effects of pollution. IN: MÜLLER, R.; LLOYD, R. Sublethal and chronic effects of pollutants on freshwater fish. **Oxford: Fishing News Books**, cap. 30, p. 339-352, 1994.

PONCE, E. C. L.; GUZMÁN, V. T.; RUIZ, P. A.; ROMIEU, I.; CARRILLO, L. L. Cáncer de Mama. Un Hilo Conductor Histórico, Presente y Futuro. **Salud Publica Mex**, México, v. 38, n. 2, p. 139-152, 1996.

PULASKI, B. A.; OSTRAND-ROSENBERG, S. Mouse 4T1 Breast Tumor Model. In: JOHN WILEY & SON, I. (Ed.). **Current Protocols in Immunology**, 2000. cap. 20.2.

RAMAIAH, S. K. A toxicologist guide to the diagnostic interpretation of hepatic biochemical parameters. **Food and Chemical Toxicology**, v. 45, p. 1551-1557, 2007.

RANGARAJAN, A.; WEINBERG, R. A. Comparative biology of mouse versus human cells: modelling human cancer in mice. **Nature Reviews Cancer**, v. 3, p. 952-959, 2003.

RAWAT, M.; SINGH, D.; SARAF, S.; SARAF, S. Nanocarriers: promising vehicle for bioactive drugs. **Pharmaceutical Society of Japan**, v. 29, n. 9, p. 1790-1798, 2006.

REIBSCHEID, E. M.; ZYNGIER, S.; MARIA, D. A.; MISTRONE, R. J.; SINISTERRA, R. D.; COUTO, L. G.; NAJJAR, R. Antitumor effects of rhodium (II) complexes on mice bearing Ehrlich tumors. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 27, n. 1, p. 91-94, 1994.

RIBEIRO L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. (Org). **Mutagênese ambiental**. Canoas: Ulbra, 2003.

ROBBINS, S. L.; COTRAN, R. S. **Patologia – Bases Patológicas das Doenças**. 7ª. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005, 1592.

SAHOO, S. K.; PARVEEN, S.; PANDA, J. J. The present and future of nanotechnology in human health care. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 3, p. 20-31, 2007.

SANTOS, M. E.; GALVÃO, T.; OLIVEIRA, A. L. M. Tamanho de plaquetas e doença vascular. **NewsLab**, ed. 87, p. 70-76, 2008.

SARFATI, G.; DVIR, T.; ELKABETS, M.; APTE, R. N.; COHEN, S. Targeting of polymeric nanoparticles to lung metastases by surface-attachment of YIGSR peptide from laminin. **Biomaterials**, v. 32, n. 1, p. 152-161, 2011.

SCHEARS, R. M. Acute liver failure in the United States. **Annals of Internal Medicine**, v. 139, n. 12, p. 217-226, 2003.

SHARMA, S. V.; HABER, D. A.; SETTLEMAN, J. Cell line-based platforms to evaluate the therapeutic efficacy of candidate anticancer agents. **Nature Reviews**, v. 10, p. 241-253, 2010.

SOUZA, A. R.; COELHO, E. P.; ZYNGIER, S. B.; Comparison of anti-neoplastic effects of dirhodium (II) tetrapropionate anions in mice bearing Ehrlich tumors. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 41, p. 1214-1216, 2006.

SOUZA, A. R.; NAJJAR, R.; GLIKMANAS, S.; ZYNGIER, S. B. Water-Soluble Rhodium (II) Carboxylate Adducts: Cytotoxicity of the New Compounds. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 64, p. 1-5, 1996.

TARTAJ, P.; MORALES, M. P.; CARREÑO, T. G.; VERDAGUER, S. V.; SERNA, C. J. Advances in magnetic nanoparticles for biotechnology applications. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 290–291, p. 28–34, 2005.

VERTEMATI, M.; VIZZOTTO, L.; MOSCHENI, C.; DHILLON, A.; DHILLON, A.; QUAGLIA, A. Morphometric model to minimize subjectivity in the histological assessment of hepatocellular carcinoma and its precursors in cirrhosis. **Micr. Res. and Tech.**, v. 71, n. 8, p. 606-613, 2008.

VIANA, F. A. B. **Guia terapêutico veterinário**. Minas Gerais: Gráfica Editora Cem, 2 ed., p. 464, 2007.

VISVADER, J. E. Keeping abreast of the mammary epithelial hierarchy and breast tumorigenesis. **Genes & Development**, v. 23, p. 2563-2577, 2009.

WANG, W.; KNOVICH, M. A.; COFFMAN, L. G.; TORTI, F. M.; TORTI, S. V. Serum ferritin: past, present and future. **Biochim Biophys Acta**, v. 8, n. 1800, p. 760-769, 2010.

WEINBERG, R. A. **A Biologia Do Câncer**. Porto Alegre: Artmed, 2008, 844.

WING, R. M.; PJURA, P.; DREW, H. R.; DICKERSON, R. E. The primary mode of binding of cisplatin to a B-DNA dodecamer: C-G-C-G-A-A-T-T-C-G-C-G. **The EMBO Journal**, v. 3, n. 5, p. 1201-1206, 1984.

YIH, T. C.; AL-FANDI, M. Engineered nanoparticles as precise drug delivery systems. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 97, p. 1184-1190, 2006.

ZHANG, C. X.; LIPPARD, S. J. New metal complexes as potential therapeutics. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 7, p. 481-489, 2003.

ZYNGIER, S.; KIMURA, E.; NAJJAR, R. Antitumor effects of rhodium (II) citrate in mice bearing Ehrlich tumors. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 22, p. 397-401, 1989.

## ANEXO 1

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

Brasília, 03 de novembro de 2011.

**DECLARAÇÃO**

Declaramos que o projeto intitulado **“COMPARAÇÃO DOS EFEITOS BIOLÓGICOS DE CITRATO DE RÓDIO E DESTE ASSOCIADO A NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS EM ADENOCARCINOMA MAMÁRIO: ESTUDOS IN VITRO E IN VIVO”**, UnBDOC n.º 109434/2008, sob responsabilidade da Profa. Sônia Nair Bão consta um sub-projeto intitulado **“AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE E DA ATIVIDADE ANTITUMORAL DO TRATAMENTO SISTÊMICO COM CITRATO DE RÓDIO (II) ASSOCIADO A NANOPARTÍCULAS DE MAGHEMITA EM CÂNCER DE MAMA”**, foram avaliados e aprovados pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília.



Profa. Aline Pic-Taylor  
Coordenadora do CEUA