



Universidade de Brasília
Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular

LUCIANA LANDIM CARNEIRO ESTEVANATO

**Nanocápsulas magnéticas de Selol para tratamento do câncer
de mama experimental: avaliação *in vitro* e *in vivo***

Brasília, junho de 2012

Universidade de Brasília
Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular

LUCIANA LANDIM CARNEIRO ESTEVANATO

**Nanocápsulas magnéticas de Selol para tratamento do câncer
de mama experimental: avaliação *in vitro* e *in vivo***

Tese de doutorado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular, da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília, como requisito parcial para obtenção do Título de Doutor em Patologia Molecular.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Zulmira Guerrero Marques Lacava

Brasília, junho de 2012

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade de
Brasília. Acervo 1000805.

E79n Estevanato, Luciana Landim Carneiro.
Nanocápsulas magnéticas de Selol para tratamento do
câncer de mama experimental : avaliação in vitro e
in vivo / Lucinana Landin Carneiro Estevanato. -- 2012.
134 f. : il. ; 30 cm.

Tese (doutorado) - Universidade de Brasília, Faculdade
de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Patologia
Molecular, 2012.
Inclui bibliografia.
Orientação: Zulmira Guerrero Marques Lacava.

1. Mamas - Câncer. 2. Selênio. 3. Toxicidade - Testes.
4. Nanotecnologia. I. Lacava, Zulmira Guerrero Marques.
II. Título.

CDU 618.19-006.6

LUCIANA LANDIM CARNEIRO ESTEVANATO

**Nanocápsulas magnéticas de Selol para tratamento do câncer
de mama experimental: avaliação *in vitro* e *in vivo***

COMISSÃO EXAMINADORA

Profa. Dra. Zulmira Guerrero Marques Lacava (IB,UnB)
(Orientadora)

Profa. Dra. Nereide Stela Santos Magalhães (UFPE)
(Membro titular)

Prof. Dr. Cláudio Eduardo de Oliveira Cavalcante (UFAL/UnB)
(Membro titular)

Profa. Dra. Silene de Paulino Lozzi (IB, UnB)
(Membro titular)

Prof. Dr. Marcelo Henrique Sousa (IQ, UnB)
(Membro titular)

Brasília, 22 de junho de 2012

*Aos meus pais, que sempre me incentivaram
a conquistar mais esta vitória.*

*Ao meu querido esposo e à minha amada
filha, meus eternos motivadores.*

AGRADECIMENTOS

A Deus e a Santo Inácio de Loyola, por sempre iluminarem o meu caminho.

À professora Zulmira Lacava, por ter me dado mais esta oportunidade. Muito obrigada pela sua compreensão, confiança e, especialmente, pelo carinho.

Ao grupo de pesquisa dos departamentos de Análise de Drogas e de Química Farmacêutica, da Universidade de Medicina da Varsóvia, Polônia, pela doação do Selol utilizado na síntese das amostras estudadas neste trabalho.

Ao professor Paulo César de Moraes pela doação do fluido iônico utilizado na síntese das amostras magnéticas e pela disponibilidade em sempre nos ajudar, principalmente esclarecendo algumas dúvidas.

Ao professor Antônio Cláudio Tedesco e ao seu orientando André Miotello Falqueiro, pela síntese das amostras utilizadas neste trabalho.

À professora Sônia Nair Bão pela autorização para uso dos microscópios eletrônicos e, especialmente, ao seu orientando, Raphael Peixoto, pela ajuda na aquisição das imagens.

Ao professor César Grisólia e seus alunos, pela amizade, carinho e apoio. Agradeço principalmente à Bélin, pela ajuda na aquisição das imagens durante os experimentos *in vivo*.

Ao professor Ricardo Bentes de Azevedo e seus alunos, pelo apoio. Agradeço especialmente à Jaqueline Rodrigues, pela ajuda fundamental nos testes *in vitro* realizados no citômetro de fluxo.

Às minhas queridas colegas de laboratório, Flávia, Ana Luísa, Mariana, Lívia, Mary-Ann, Lane e Adriana, pelo apoio e ajuda nos momentos necessários. Muito obrigada por tudo! Espero tê-las sempre por perto!

Agradeço, especialmente, à Marcella Carneiro e ao César Romero, pela ajuda com as análises histológicas. O apoio de vocês foi fundamental para conclusão deste trabalho.

À D. Zélia Madeira, pelo apoio e por ter sido sempre prestativa quando precisei.

Ao Djalma Santos, pelo auxílio na confecção e coloração das lâminas histológicas.

Ao laboratório Sabin pela parceria na realização dos testes bioquímicos.

À CAPES e ao CNPq pela bolsa, CNANO e ao INCT–Nanotecnologia, pelo auxílio financeiro para realização desta pesquisa.

Ao meu amado esposo, pelo seu apoio, paciência e compreensão, principalmente durante a redação desta tese.

À minha querida filha, que entendia, na medida do possível, que a mamãe precisava trabalhar e que naquele momento ela teria que esperar um pouquinho. Você foi o melhor resultado que obtive durante os últimos quatro anos!!!

Aos meus pais, que sempre me incentivaram durante toda a vida acadêmica. O que sou hoje devo aos ensinamentos e apoio de vocês.

E, finalmente, a todos, que direta ou indiretamente, ajudaram no desenvolvimento deste estudo e contribuíram para o meu crescimento pessoal e profissional.

“Não há realmente nenhum segredo sobre a nossa abordagem. Nós continuamos a avançar, abrindo novas portas e fazendo coisas novas, porque somos curiosos. E a curiosidade continua nos conduzindo por caminhos novos. Nós estamos sempre explorando e experimentando. Siga em frente!”

Walt Disney

RESUMO

Este trabalho visou investigar um novo sistema nanoestruturado para tratamento do câncer de mama, baseado em nanocápsulas de ácido poli(láctico-co-glicólico) (PLGA), que são biocompatíveis, e co-encapsularam nanopartículas magnéticas (NPM) e Selol. NPM possuem inúmeros papéis no tratamento do câncer, inclusive destruição seletiva de células tumorais por magnetohipertermia; enquanto que o Selol, uma mistura hidrofóbica contendo selênio, aumenta a eficácia terapêutica de quimioterápicos. A amostra de nanocápsulas magnéticas de Selol (NCMagh-SE) foi caracterizada, e a sua toxicidade e efeito antitumoral foram avaliados por meio de estudos *in vitro* e *in vivo*. Na caracterização por microscopia eletrônica, zetasizer e espalhamento de luz dinâmica, as nanocápsulas de NCMagh-SE apresentaram-se monodispersas e com carga de superfície positiva. A toxicidade *in vitro* de (NCMagh-SE) foi avaliada em células de adenocarcinoma mamário murino (4T1) e humano (MCF-7) e em células normais de mama (MCF-10A). A citotoxicidade, avaliada pelo método do MTT, foi dependente da dose, do tempo e da linhagem celular. Em doses de 25 µg/mL de Selol + $1,25 \times 10^9$ partículas/mL e 50 µg/mL de Selol + $2,5 \times 10^9$ partículas/mL, NCMagh-SE reduziu em 38%, em média, a viabilidade das células tumorais, porém sem efeito nas células normais. Análises por microscopia de luz, revelaram maior captação de NCMagh-SE pelas células tumorais. NCMagh-SE induziu morte celular por apoptose e fragmentação do DNA, conforme análises por citometria de fluxo. Interessantemente, após 4 horas de tratamento com NCMagh-SE, não foi observada citotoxicidade em células 4T1. Entretanto, a exposição ao campo magnético alternado (CMA), após tratamento com NCMagh-SE, reduziu a viabilidade celular significativamente. Ainda, em células MCF-7, NCMagh-SE reduziu a viabilidade celular independentemente da exposição ao CMA, porém a toxicidade aumentou significativamente após exposição ao CMA. Sob ação do CMA e com 100 µg/mL de Selol + 5×10^9 partículas/mL, a viabilidade celular foi significativamente diminuída para 48,22%, enquanto que sem o CMA era de 62,20%. Os estudos *in vivo* em camundongos BALB/C, portadores de tumor ortotópico autólogo mamário induzido por células 4T1, não mostraram toxicidade relevante após o tratamento com NCMagh-SE, por meio de análises hematológicas, bioquímicas, genotóxicas e histológicas dos órgãos. Entretanto, foi verificado aumento da necrose tumoral nos camundongos induzida pelo tratamento com NCMagh-SE. Quando o tratamento era associado à administração do quimioterápico Paclitaxel, a necrose tumoral era ainda mais evidente. A exposição ao CMA, posterior ao tratamento combinado de NCMagh-SE e Paclitaxel via intratumoral, aumentou ainda mais o efeito antitumoral do tratamento, diminuindo em aproximadamente 70% o volume do tumor em comparação aos camundongos do grupo controle tratado com solução salina. Neste contexto, nossos resultados mostram o potencial de NCMagh-SE para tratamento do câncer de mama, incluindo a sua capacidade de potencializar o efeito quimioterápico do Paclitaxel, além de induzir magnetohipertermia.

Palavras-chave: selênio, magnetohipertermia, nanopartículas magnéticas, nanocápsulas, câncer de mama

ABSTRACT

The aim of this study was to investigate a new nanostructured system for treatment of breast cancer, based on nanocapsules of poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA), which are biocompatibles, and entrapped both magnetic nanoparticles (MNP) and Selol. MNP have many roles in cancer treatment, including the selective destruction of tumor cells by magnetohyperthermia; while Selol, a hydrophobic mixture containing selenium increases the efficacy of chemotherapeutic agents. The sample of magnetic nanocapsules of Selol (NCMagh-SE) was characterized, and their toxicity and antitumor effect were evaluated by in vitro and in vivo assays. The characterization by electron microscopy, zetasizer, and dynamic light scattering, showed NCMagh-SE with monodisperse feature and positive charge. In vitro toxicity of (NCMagh-SE) was evaluated in murine (4T1) and human (MCF-7) breast adenocarcinoma cells, plus in normal breast cell line (MCF-10A). Cytotoxicity, measured by MTT assay, was dose, time and cell line dependent. At doses of 25 µg/mL of Selol + 1.25×10^9 particles/mL and 50 µg/mL of Selol + 2.5×10^9 particles/mL, NCMagh-SE reduced the neoplastic cells viability by 38%, with no effect on normal cells. Analysis by light microscopy, showed higher uptake of NCMagh-SE by tumor cells. NCMagh-SE induced cell death by apoptosis and DNA fragmentation in analyzes performed by flow cytometry. Interestingly, NCMagh-SE was not cytotoxic to 4T1 cells after 4 hours of treatment with NCMagh-SE. However, exposure to the alternating magnetic field (AMF), subsequently to treatment with NCMagh-SE, decreased significantly the cell viability. Also, NCMagh-SE reduced the MCF-7 cells viability regardless of exposure to AMF, but the cytotoxicity increased significantly after exposure to the AMF. Under the action of AMF and NCMagh-SE (100 µg/mL of Selol + 5×10^9 particles/mL), the cell viability was significantly reduced to 48.22%, whereas without AMF was 62.20%. In vivo studies in BALB/c mice, bearing orthotopic breast adenocarcinoma induced by 4T1 cells, showed no significant toxicity after treatment with NCMagh-SE in hematological, biochemical, histological and genotoxic analysis. Nonetheless, NCMagh-SE increased the tumor necrosis in mice. When this treatment was associated with intravenous administration of Paclitaxel, tumor necrosis was more evident. Exposure to AMF, after the combined intratumoral treatment of NCMagh-SE and Paclitaxel, increased the antitumor effect of the treatment, decreasing approximately 70% of the tumor volume in relation to control group treated with saline. Thus, the results show the potential of NCMagh-SE for breast cancer treatment, including their ability to enhance the chemotherapeutic effect of Paclitaxel and to induce magnetohyperthermia.

Keywords: selenium, magnetohyperthermia, magnetic nanoparticles, nanocapsules, breast cancer.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação esquemática de nanocápsulas e nanoesferas poliméricas.....	26
Figura 2: Representação estrutural do PLGA, com os subprodutos do seu metabolismo (ácido lático e ácido glicólico.....	28
Figura 3: Estrutura esquemática do Selol.....	31
Figura 4: Diagrama representativo da estratégia experimental utilizada no desenvolvimento desta tese.....	40
Figura 5: Camundongos BALB/c fêmeas.....	48
Figura 6: Local do transplante ortotópico de células 4T1.....	49
Figura 7: Grupos de tratamento (n=6) testados na Etapa 1 dos experimentos <i>in vivo</i>	50
Figura 8: Cronograma de transplante de células, tratamentos e eutanásia dos camundongos utilizados na Etapa 1.....	51
Figura 9: Grupos de tratamento (n=3) testados na Etapa 2 dos experimentos <i>in vivo</i>	52
..	
Figura 10: Cronograma de transplante de células, tratamentos e eutanásia dos camundongos utilizados na Etapa 2.....	53
Figura 11: Caracterização morfológica e mensuração de NCMagh-SE.....	57

Figura 12: Caracterização das nanopartículas de maghemita dispersas na amostra NCMagh-SE.....	58
Figura 13: Fotomicrografias eletrônicas de transmissão da amostra NCMagh...	58
Figura 14: Análise da viabilidade celular da linhagem 4T1, após 24 e 48 horas de exposição a diferentes tratamentos.....	61
Figura 15: Análise da viabilidade celular da linhagem MCF-7, após 24 e 48 horas de exposição a diferentes tratamentos.....	62
Figura 16: Análise da viabilidade celular da linhagem MCF-10A, após 24 e 48 horas de exposição a diferentes tratamentos.	63
Figura 17: Comparação da viabilidade celular das linhagens 4T1, MCF-7 e MCF-10A, após 24 horas (esquerda) e 48 horas (direita) de exposição a diferentes tratamentos.....	65
Figura 18: Morfologia das células MCF-7 após 48 horas de exposição a diferentes tratamentos.....	67
Figura 19: Coloração, pelo método de Perls, das células 4T1 (A e B), MCF-7 (C e D) e MCF-10A (E e F) após 48 horas do tratamento com NCMagh-SE.....	68
Figura 20: Análise do percentual de células, 4T1 e MCF-7, em apoptose, após 48 horas dos diferentes tratamentos.....	70
Figura 21: Análise do percentual de fragmentação do DNA em células das linhagens 4T1 e MCF-7, após 48 horas dos diferentes tratamentos.....	71
Figura 22: Efeito do tratamento com nanocápsulas magnéticas de Selol (NCMagh-SE), associado ou não à exposição subsequente ao campo	

magnético alternado, na viabilidade de células tumorais das linhagens celulares 4T1 (A) e MCF-7 (B).....	73
Figura 23: Média do peso corporal de camundongos ao longo de todo o período de tratamento.....	75
Figura 24: Avaliação do volume (mm ³) dos tumores coletados dos camundongos, após 22 dias da inoculação das células tumorais.....	79
Figura 25: Avaliação do peso (mg) dos tumores coletados dos camundongos, após 22 dias da inoculação das células tumorais.....	80
Figura 26: Fotografias de adenocarcinomas mamários, após 22 dias da inoculação do tumor, em animais submetidos a diferentes tratamentos.....	81
Figura 27: Fotografias de adenocarcinomas mamários, coletados após 22 dias da inoculação do tumor, em animais submetidos a diferentes tratamentos.....	82
Figura 28: Fotomicrografias de adenocarcinoma mamário, transplantado na mama de camundongos BALB/c, do grupo controle tratado com solução salina.	83
Figura 29: Fotomicrografias de adenocarcinoma mamário, transplantado na mama de camundongos BALB/c, do grupo tratado somente com Paclitaxel.....	84
Figura 30: Fotomicrografias de adenocarcinoma mamário, transplantado na mama de camundongos BALB/c, dos grupos tratados com 50 µL (A-C) e 100 µL (D-I) de NCMagh-SE.....	85
Figura 31: Fotomicrografias de adenocarcinoma mamário, transplantado na mama de camundongos BALB/c, dos grupos tratados com 50 µL (A-C) e 100 µL (D-I) de NCMagh-SE via intratumoral, associado ao tratamento endovenoso com Paclitaxel.....	87

Figura 32: Fotomicrografias de adenocarcinoma mamário, transplantado na mama de camundongos BALB/c submetidos a diferentes tratamentos. Coloração pelo método de Perls.....	88
Figura 33: Fotomicrografias dos órgãos dos animais tratados com 100 µL de NCMagh-SE.....	90
Figura 34: Média do peso corporal de camundongos ao longo de todo o período experimental.....	92
Figura 35: Efeito de diferentes tratamentos sobre a fragmentação do DNA, em células da medula óssea de camundongos portadores de adenocarcinoma mamário.....	96
Figura 36: Avaliação do volume (mm ³) dos tumores coletados dos camundongos, após 22 dias da inoculação das células tumorais.....	97
Figura 37: Avaliação do peso (mg) dos tumores coletados dos camundongos, após 22 dias da inoculação das células tumorais.....	97
Figura 38: Fotografias de adenocarcinomas mamários, coletados após 22 dias da inoculação do tumor, em animais submetidos a diferentes tratamentos.....	98

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Concentrações de amostras de nanocápsulas utilizadas nos experimentos <i>in vitro</i>	41
Tabela 2: Caracterização das nanocápsulas por DLS e Zetasizer.....	59
Tabela 3: Distribuição dos valores de IC ₅₀ e seus respectivos intervalos de confiança (95%) em células 4T1, MCF-7 e MCF-10A, após o tratamento com nanocápsulas magnéticas de Selol (NCMagh-SE).....	64
Tabela 4: Resultados do leucograma de camundongos BALB/c portadores de tumor, tratados com NCMagh-SE e/ou Paclitaxel.....	76
Tabela 5: Resultados dos exames hematológicos de camundongos BALB/c portadores de tumor, tratados com NCMagh-SE e/ou Paclitaxel.....	77
Tabela 6: Resultados das dosagens bioquímicas no soro de camundongos BALB/c portadores de tumor, tratados com NCMagh-SE e/ou Paclitaxel.....	78
Tabela 7: Resultados do leucograma de camundongos BALB/c portadores de tumor, tratados com NCMagh-SE, Paclitaxel e campo magnético alternado.....	93
Tabela 8: Resultados dos exames hematológicos de camundongos BALB/c portadores de tumor, tratados com NCMagh-SE, Paclitaxel e campo magnético alternado.....	94
Tabela 9: Resultados das dosagens bioquímicas no soro de camundongos BALB/c portadores de tumor, tratados com NCMagh-SE, Paclitaxel e campo magnético alternado.....	95

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

4T1 – Linhagem de células de adenocarcinoma mamário murino

ALT – Alanina transaminases

Anexina V-FITC – Anexina conjugada a fluoresceína-5-isotiocianato

AST – Asparto transaminases

CEUA – Comitê de Ética no Uso Animal

CHCM – Concentração de hemoglobina corpuscular média

CMA – Campo magnético de frequência alternada

CS – Grupo controle tratado somente com solução salina

DLS – Espalhamento de luz dinâmica

DMEM – Dulbecos's modified Eagle's medium

DMSO – Dimetilsulfóxido

DNA – Ácido desoxirribonucleico

EDTA – Ácido etilenodiaminotetracético bipotássico

EPM – Erro padrão da média

EPR – Efeito de permeabilidade e retenção

FDA – Food and Drug Administration

GGT – Gama-glutamil transferase

HCM – Hemoglobina corpuscular média

HE – Hematoxilina-eosina

HER-2 – Receptor-2 do fator de crescimento epidérmico humano

INCA – Instituto Nacional do Câncer

MCF-10A – Linhagem de células epiteliais da mama humana

MCF-7 – Linhagem de células de adenocarcinoma mamário humano

MET – Microscopia eletrônica de transmissão

MEV – Microscopia eletrônica de varredura

MTT – Brometo de 3(4,5 dimetiltiazol-2il)-2,5-difenil-tetrazólio)

NCMagh - Nanocápsulas magnéticas

NCMagh-SE – Nanocápsulas magnéticas de Selol

NCSE – Nanocápsulas de Selol

NPM – Nanopartículas magnéticas

OMS – Organização Mundial da Saúde

PBS – Tampão fosfato-salino

PDI – Índice de polidispersividade

PI – Iodeto de propídio

PLGA – Ácido poli(láctico-co-glicólico)

PTX – Paclitaxel

RDW – Amplitude da distribuição do tamanho dos eritrócitos

ROS – Espécies reativas de oxigênio

Se – Selênio

SFB – Soro fetal bovino

SISMAMA – Sistema de Informação do Câncer de Mama

UICC – União Internacional Contra o Câncer

VCM – Volume corpuscular médio

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	19
1.1. NANOBIOTECNOLOGIA E CÂNCER.....	22
1.1.1. Nanopartículas magnéticas e seu uso na magnetohipertermia	24
1.1.2. Nanopartículas poliméricas e seu uso como sistemas de entrega de drogas.....	26
1.2. COMPOSTOS DE SELÊNIO NO TRATAMENTO E PREVENÇÃO DO CÂNCER.....	29
1.2.1. Selol.....	31
1.3. NANOCÁPSULAS MAGNÉTICAS DE SELOL.....	32
2. JUSTIFICATIVA	34
3. OBJETIVOS	35
3.1. OBJETIVO GERAL.....	35
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	35
4. MATERIAIS E MÉTODOS	37
4.1. AMOSTRA.....	37
4.2. CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS.....	38
4.3. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	38
4.4. EXPERIMENTOS <i>IN VITRO</i>	41
4.4.1. Linhagens celulares	41
4.4.2. Avaliação da citotoxicidade induzida por NCMagh-SE e seus controles (NCMagh e NCSE).....	42
4.4.3. Análises morfológicas de células tratadas com NCMagh-SE e seus controles (NCMagh e NCSE).....	43
4.4.4. Avaliação do tipo de morte celular induzido por NCMagh-SE e seus controles (NCMagh e NCSE).....	44
4.4.5. Análise da fragmentação do DNA induzida por NCMagh-SE e seus controles (NCMagh e NCSE).....	45

4.4.6. Avaliação da citotoxicidade induzida pelo tratamento com NCMagh-SE, associado à exposição ao campo magnético alternado.....	46
4.5. EXPERIMENTOS <i>IN VIVO</i>	48
4.5.1. Animais.....	48
4.5.2. Transplante das células tumorais.....	48
4.5.3. Grupos de tratamento.....	49
4.5.3.1. <i>Etapa 1 – Avaliação da toxicidade e do efeito antitumoral do tratamento com NCMagh-SE associado ou não à administração de quimioterápico Paclitaxel</i>	50
4.5.3.2. <i>Etapa 2 – Avaliação da toxicidade e do efeito antitumoral do tratamento concomitante com NCMagh-SE e com quimioterápico Paclitaxel, associado à exposição ao campo magnético alternado</i>	52
4.5.4. Avaliação clínica dos animais.....	53
4.5.5. Análises hematológicas e bioquímicas.....	54
4.5.6. Análise genotóxica.....	55
4.5.7. Análises histológicas dos órgãos e do tumor.....	55
4.6. ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	56
5. RESULTADOS	57
5.1. CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS.....	57
5.1.1. Caracterização por Microscopia Eletrônica de Transmissão e Varredura.....	57
5.1.2. Caracterização por Espalhamento de Luz Dinâmica (DLS) e Zeta-sizer.....	59
5.2. EXPERIMENTOS <i>IN VITRO</i>	60
5.2.1. Avaliação da citotoxicidade induzida pelo tratamento com NCMagh-SE e seus controles (NCMagh e NCSE).....	60
5.2.2. Avaliação da morfologia celular após tratamento com NCMagh-SE e seus controles (NCMagh e NCSE).....	66
5.2.3. Análise do tipo de morte celular induzida por NCMagh-SE e seus controles, NCMagh e NCSE, em células de adenocarcinoma	

mamário (4T1 e MCF-7).....	69
5.2.4. Análise de fragmentação do DNA induzida por NCMagh-SE e seus controles, NCMagh e NCSE, em células de adenocarcinoma mamário (4T1 e MCF-7)	70
5.2.5. Avaliação da citotoxicidade, em células 4T1 e MCF-7, induzida pelo tratamento com NCMagh-SE, associado à exposição ao campo magnético alternado.....	72
5.3. EXPERIMENTOS <i>IN VIVO</i>	74
5.3.1. Etapa 1 – Avaliação da toxicidade e do efeito antitumoral do tratamento com nanocápsulas magnéticas de Selol (NCMagh-SE) associado ou não à administração do quimioterápico Paclitaxel.....	74
5.3.1.1. Avaliação clínica dos animais.....	74
5.3.1.2. Peso dos animais.....	74
5.3.1.3. Análises hematológicas.....	75
5.3.1.4. Análises bioquímicas.....	78
5.3.1.5. Volume e peso dos tumores.....	79
5.3.1.6. Análises macroscópicas dos tumores.....	80
5.3.1.7. Análise histopatológica dos tumores.....	82
5.3.1.8. Análise histológica dos órgãos.....	89
5.3.2. Etapa 2 – Avaliação da toxicidade e do efeito antitumoral do tratamento concomitante com nanocápsulas magnéticas de Selol (NCMagh-SE) e com o quimioterápico Paclitaxel, associado à exposição ao campo magnético alternado.....	91
5.3.2.1. Avaliação clínica dos animais.....	91
5.3.2.2. Peso dos animais.....	91
5.3.2.3. Análises hematológicas.....	92
5.3.2.4. Análises bioquímicas.....	95
5.3.2.5. Análise genotóxica.....	96
5.3.2.6. Volume e peso dos tumores.....	96
5.3.2.7. Análises macroscópicas dos tumores.....	98
6. DISCUSSÃO	99
6.1. CONSIDERAÇÕES SOBRE A AMOSTRA NCMagh-SE E SEUS	

CONTROLES (NCMagh e NCSE).....	99
6.2. CONSIDERAÇÕES SOBRE OS TESTES <i>IN VITRO</i>	102
6.3. CONSIDERAÇÕES SOBRE OS TESTES <i>IN VIVO</i>	106
6.3.1. Considerações sobre os resultados encontrados na Etapa 1..	108
6.3.2. Considerações sobre os resultados encontrados na Etapa 2..	114
7. CONCLUSÕES	118
8. PERSPECTIVAS	120
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	121

1. INTRODUÇÃO

Câncer é o nome conferido ao conjunto de doenças caracterizadas pela interrupção dos mecanismos que regulam o crescimento e a divisão celular e pela habilidade das células cancerosas de invadirem outros tecidos. O câncer é um problema de saúde pública mundial e de acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), estima-se que em 2030 haja 27 milhões de casos incidentes de câncer, 17 milhões de mortes por câncer e 75 milhões de pessoas vivas portadoras de algum tipo de neoplasia maligna. No Brasil, as estimativas para o ano de 2012 e 2013 apontam para a ocorrência de 518.510 novos casos de tumores malignos, para cada ano (BRASIL, 2011).

Estima-se que o câncer de pele do tipo não melanoma (134 mil novos casos) será o mais incidente na população brasileira, seguido pelos tumores de próstata (60 mil), mama feminina (53 mil), cólon e reto (30 mil), pulmão (27 mil), estômago (20 mil) e colo do útero (18 mil) (BRASIL, 2011).

Em todo o mundo, o câncer de mama é o tipo de neoplasia maligna que mais acomete as mulheres. O principal fator de risco para o câncer de mama é o envelhecimento, porém há outros fatores de risco bem estabelecidos, como os relacionados à vida reprodutiva da mulher (menarca precoce, primeira gestação após os 30 anos de idade, uso de anticoncepcionais orais, menopausa tardia e reposição hormonal) e ao histórico familiar de câncer de mama, em que frequentemente são observadas alterações em genes relacionados à regulação, ao metabolismo hormonal e ao reparo de DNA (BRASIL, 2011, 2012; STUCKEY, 2011; ABDULKAREEM; ZURMI, 2012).

A União Internacional Contra o Câncer (UICC) classifica os tumores de mama em cinco estágios baseando-se nas dimensões do tumor, na análise dos linfonodos e na ocorrência de metástases (TANAKA *et al.*, 2009; BRASIL, 2012). O Estágio 0 (zero) é chamado de carcinoma *in situ*, em que as células tumorais não invadiram o tecido circundante. No Estágio I, o tumor tem menos que 2 cm de diâmetro, porém já atingiu os tecidos próximos à mama. No Estágio II, o tumor pode atingir até 5 cm, sendo observada ou não a presença de células tumorais nos linfonodos. No Estágio III, o tumor pode ser maior que 5 cm, podendo ou não ter se espalhado para os

linfonodos. E por fim, no Estágio IV, já é observada a ocorrência de metástase, mais comumente para os ossos, pulmões, fígado e cérebro (BRASIL, 2004).

Apesar de apresentar bom prognóstico quando diagnosticado em fase inicial, o câncer de mama é o tipo de neoplasia que mais leva ao óbito na população feminina brasileira. A elevada taxa de mortalidade é devido, principalmente, ao diagnóstico tardio da doença (BRASIL, 2012; LEE *et al.*, 2012). Uma pesquisa realizada no ano de 2006, em um hospital público do Rio de Janeiro, mostrou que o tempo mediano entre a realização da mamografia e da biópsia era de 72 dias; e da realização da mamografia até o início do tratamento quimioterápico, era de 189 dias (TRUFELLI *et al.*, 2008). Em um estudo mais recente, Passman *et al.*, (2011) verificaram, por meio da análise de dados do Sistema de Informação do Câncer de Mama (SISMAMA), do Ministério da Saúde do Brasil, que o tempo entre a realização do exame de mamografia e a análise das imagens demorava mais de 30 dias em 67% dos casos.

O tratamento do câncer de mama baseia-se principalmente na cirurgia, na quimioterapia, na radioterapia e na terapia hormonal. De maneira geral, nos Estágios I e II é realizada a cirurgia para retirada do tumor ou de toda a mama, seguida pelo tratamento radioterápico. Nestas etapas pode ser realizada também a terapia hormonal e com produtos biotecnológicos. Enquanto que nos Estágios III e IV, o tratamento inicial é sistêmico, aplicando-se na maioria das vezes a quimioterapia. Porém, o objetivo principal do tratamento de tumores no Estágio IV é melhorar a qualidade de vida do paciente e aumentar sua sobrevida (MAUGHAN; LUTTERBIE; HAM, 2010; BRASIL, 2012).

A cirurgia é uma das principais modalidades para tratamento e controle do câncer (PURUSHOTHAM; LEWISON; SULLIVAN, 2012; RUITERKAMP; ERNST, 2011). Os procedimentos cirúrgicos, ainda que eficazes em inúmeros casos diagnosticados na fase inicial, muitas vezes falham por não ser possível fazer a retirada total ou mesmo parcial do tumor, além de apresentarem riscos de seqüelas físicas e emocionais pós-operatórias.

A realização de radioterapia após a cirurgia diminui a recorrência local do tumor, uma vez que elimina as células tumorais microscópicas remanescentes. Porém, pode também ser realizada antes da cirurgia, com o objetivo de diminuir o volume tumoral, facilitando a sua retirada. A exposição à radiação ionizante danifica o material genético da célula de maneira direta ou, indiretamente, por meio da

formação de radicais livres, induzido à morte celular. Embora as células neoplásicas sejam mais susceptíveis ao tratamento radioterápico, as células normais adjacentes ao tecido tumoral também são danificadas, levando a diversos efeitos colaterais. Há relatos da ocorrência de fibroses, danos vasculares, cardíacos e pulmonares (MALAS ORUÇ *et al.*, 2004; PIERCE, 2005; NILSSON *et al.*, 2011) posteriores ao tratamento radioterápico, além do desenvolvimento de cânceres induzidos pela radioterapia (MAUGHAN; LUTTERBIE; HAM, 2010; SCHNEIDER *et al.*, 2011).

A quimioterapia é um dos tratamentos sistêmicos mais utilizados no tratamento do câncer e tem sido crescente o seu uso em combinação com duas ou mais drogas. Dentre as drogas mais utilizadas no tratamento do câncer de mama metastático, encontram-se os taxanos (Paclitaxel) e as antraciclinas (Adriamicina e Doxorubicina). Entretanto, assim como a radioterapia, a quimioterapia é inespecífica, causando danos não só às células tumorais, mas também às células normais (FENG; CHIEN, 2003). Devido à distribuição sistêmica dos quimioterápicos, são necessárias altas doses para que se tenha efeito antitumoral, o que limita muito a terapia, uma vez que são drogas muito tóxicas. Outra limitação da quimioterapia é a possibilidade de resistência do tumor às drogas (MISRA; ACHARYA, SAHOO, 2010).

Já a terapia hormonal envolve o uso de inibidores enzimáticos, como os inibidores da aromatase, que bloqueiam a conversão de hormônios androgênicos em estrógeno, e de moduladores de receptores hormonais, como o tamoxifeno, que é utilizado para modular o efeito do estrógeno (LI *et al.*, 2009; PUHALLA; BHATTACHARYA; DAVIDSON, 2012). Entretanto, a terapia hormonal só é efetiva contra tumores que apresentam receptores hormonais. Além disso, assim como as outras terapias, apresenta efeitos colaterais, como os observados após o uso prolongado do tamoxifeno, que está relacionado ao risco aumentado de câncer de endométrio em mulheres acima de 50 anos e às ocorrências de trombose venosa profunda e de embolia pulmonar (TANAKA *et al.*, 2009; ABDULKAREEM; ZURMI, 2012).

Já a terapia com produtos biotecnológicos tem sido muito utilizado o trastuzumab (Herceptin®), um anticorpo monoclonal que se liga seletivamente ao receptor-2 de fator de crescimento epidérmico humano (HER-2), uma proteína que é superexpressa em 20 a 30% dos tumores de mama nos Estágios I e II e que está

relacionada a um pior prognóstico. O tratamento com trastuzumab é combinado com a terapia hormonal e com o uso de quimioterápicos, sendo capaz de aumentar a sobrevida dos pacientes. Entretanto, esta combinação está relacionada ao aparecimento de toxicidade cardíaca (MAUGHAN; LUTTERBIE; HAM, 2010; HARBECK, 2011; PEGRAM; LIAO, 2012).

As diversas desvantagens apresentadas pelas terapias convencionalmente empregadas no tratamento do câncer têm estimulado a busca de novas alternativas terapêuticas. Dentre estas, encontram-se as promovidas pela Nanobiotecnologia, um campo da ciência que tem sido foco de diversos estudos científicos nas últimas décadas e que vem apresentando promissoras aplicações biomédicas.

1.1. NANOBIOTECNOLOGIA E CÂNCER

A Nanobiotecnologia, uma subdivisão da Nanotecnologia, envolve o desenvolvimento e a pesquisa de nanomateriais para aplicações terapêuticas e de diagnóstico. O prefixo “nano” deriva da palavra grega “anão”, sendo que 1 (nm) nanômetro equivale à bilionésima parte do metro. Na Nanotecnologia, bem como na Nanobiotecnologia, são utilizados materiais que apresentam pelo menos uma de suas dimensões na escala nanométrica (MOGHIMI; HUNTER; MURRAY, 2005; SAHOO; PARVEEN; PANDA, 2007). Devido à pequena escala, estes nanomateriais podem apresentar propriedades e comportamentos diferentes dos mesmos materiais quando em micro ou macroescala, tais como maior resistência física, tolerância à temperatura e superparamagnetismo (MCNEIL, 2005; FERREIRA; RANGEL, 2009).

O conceito de Nanotecnologia se propagou em 1959, a partir de uma palestra intitulada *“There’s plenty of room at the bottom”* (“Há muito espaço lá embaixo”) proferida pelo físico Richard Feynman, que explorou a possibilidade de manipular átomos e moléculas individualmente. Entretanto, o termo “Nanotecnologia” foi usado pela primeira vez somente em 1974 quando Norio Taniguchi, um pesquisador da Universidade de Tóquio, usou essa palavra para se referir à capacidade de desenvolver materiais na escala nanométrica (SAHOO; PARVEEN; PANDA, 2007).

A Nanobiotecnologia tem um incrível potencial de revolucionar o tratamento e o diagnóstico de diversas doenças, principalmente do câncer. Dentre as diversas aplicações biomédicas dos nanomateriais, destacam-se o seu uso como sistemas

carreadores de fármacos, na terapia gênica, na indução da magnetohipertermia, na terapia fotodinâmica e nos exames de imagem (YOO *et al.*, 2011; YIGIT; MOORE; MEDAROVA, 2012).

Uma das grandes vantagens do uso de nanossistemas terapêuticos e de diagnóstico, é o maior direcionamento e especificidade em relação ao local de interesse, por exemplo, o tumor. Eles podem ser direcionados tanto de forma passiva quanto de forma ativa. Devido ao efeito de maior permeabilidade e retenção, conhecido como efeito EPR, característico do tecido tumoral, os nanossistemas podem se acumular de forma passiva na região do tumor. Isto ocorre porque os vasos que nutrem o tecido tumoral apresentam poros maiores entre as células, em comparação com o tecido saudável, o que resulta na maior permeabilidade local. Ainda, devido à ausência de drenagem linfática eficiente, os nanossistemas podem ficar retidos por mais tempo na região do tumor (MAEDA, 2001; ACHARYA; SAHOO, 2011; FERNANDEZ-FERNANDEZ; MANCHANDA; MCGORON, 2011; DANHIER *et al.*, 2012).

Além disso, a especificidade pode também ser aumentada de forma ativa, por exemplo, associando-se pequenas moléculas, como os anticorpos, que se liguem a receptores específicos superexpressos pelas células tumorais (FERNANDEZ-FERNANDEZ; MANCHANDA; MCGORON, 2011; GROBMYER *et al.*, 2011) ou pelo uso de campo magnético para atrair nanomateriais magnéticos (KUMAR; MOHAMMAD, 2011).

Nanomateriais variados têm sido utilizados em aplicações biomédicas, tais como os lipossomas e magnetolipossomas (PRADAN *et al.*, 2010; CARNEIRO *et al.*, 2011), nanotubos de carbono (MADANI *et al.*, 2011), fulerenos e dendrímeros (GUNASEKERA; PANKHURST; DOUCK, 2009; TANAKA *et al.*, 2009; MISRA; ACHARYA; SAHOO, 2010; FERNANDEZ-FERNANDEZ; MANCHANDA; MCGORON, 2011), bem como as nanopartículas, que podem ser magnéticas (CONDE; DORIA; BAPTISTA, 2012; YIGIT; MOORE; MEDAROVA, 2012) e/ou poliméricas (ESTEVANATO *et al.*, 2011; PORTILHO *et al.*, 2011; ELSABAHY; WOOLEY, 2012), focos desta pesquisa.

1.1.1. Nanopartículas magnéticas e seu uso na magnetohipertermia

Entre os muitos materiais nanoestruturados interessantes para aplicações biomédicas, as nanopartículas magnéticas (NPM) assumem um papel importante. As NPM são compostas por ferritas diversas, como de cobalto e níquel, ou mais comumente de magnetita (Fe_3O_4) e maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) (GUPTA; GUPTA, 2005). Devido ao seu pequeno diâmetro, por volta de 8 a 12 nm, as NPM apresentam comportamento superparamagnético, ou seja, apresentam magnetismo somente quando expostas a um campo magnético (COLOMBO *et al.*, 2012).

Com o intuito de serem utilizadas em aplicações biomédicas, as nanopartículas devem ser hemocompatíveis, biodegradáveis e não tóxicas ao organismo. Para atingir biocompatibilidade e biodistribuição adequadas, as características físico-químicas devem ser consideradas. A cobertura das NPM, por exemplo, é importante para manter a estabilidade coloidal dos fluidos magnéticos, evitando a aglomeração das partículas (COLOMBO *et al.*, 2012), o que poderia resultar em toxicidade. Podem ser recobertas com diversos compostos, como ácido poliaspártico (SADEGHIANI *et al.*, 2005), polifosfato (PORTILHO, 2007), citrato (BRUGIN, 2007), albumina (ESTEVANATO *et al.*, 2011), ácido dimercapto-succínico (DMSA) (VALOIS *et al.*, 2010; MONGE-FUENTES *et al.*, 2011), e dextrana (ESTEVANATO *et al.*, 2012).

Algumas das aplicações das nanopartículas magnéticas vêm do fato delas, isolada ou conjuntamente, servirem como contrastes nos exames de imagem, poderem ser guiadas para o local de interesse por campo magnético contínuo, e pela sua capacidade de promover a hipertermia para tratamento do câncer (PANKHURST *et al.*, 2003; GUNASEKERA; PANKHURST; DOUCK, 2009; COLOMBO *et al.*, 2012).

A hipertermia, aumento da temperatura dos tecidos, pode ser induzida de diversas formas, dentre elas por meio da utilização de um campo magnético alternado, por luz infravermelha e por radiofrequência (MANTHE *et al.*, 2010; GROBMYER *et al.*, 2011). De acordo com revisão de Colombo *et al.* (2012), o aumento de temperatura é aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA) para uso único ou associado com a radioterapia, como um método paliativo no tratamento de alguns tumores sólidos, como melanomas e adenocarcinomas. Segundo o mesmo autor, estudos clínicos utilizando combinação de hipertermia e radioterapia

têm mostrado que 83,7% dos pacientes apresentam diminuição do volume tumoral, dos quais 37,4% apresentam regressão completa do tumor, enquanto que 24,5% apresentam redução em mais de 50% no volume tumoral.

O interesse na utilização de nanopartículas superparamagnéticas para indução da hipertermia, ou mais precisamente, da magnetohipertermia, tem sido crescente. Desde o trabalho pioneiro de Gordon *et al.*, em 1979, que mostrou a redução do volume de tumor mamário em ratos, após tratamento com micropartículas de ferro e exposição ao campo magnético, vários outros estudos tem sido realizados objetivando o uso da magnetohipertermia para tratamento do câncer (ITO *et al.*, 2003; GUEDES *et al.*, 2004a, 2004b; KOBAYASHI, 2011; LAURENT *et al.*, 2011; PORTILHO *et al.*, 2011).

Na magnetohipertermia, os repetidos movimentos de alinhamento dos spins magnéticos das nanopartículas, e de relaxação, em resposta ao campo magnético alternado, gera energia térmica que é dissipada das nanopartículas magnéticas (KHANDHAR; FERGUSON; KRISHNAN, 2011; YOO *et al.*, 2011; COLOMBO *et al.*, 2012). É bem estabelecido que o aumento da temperatura, atingindo por volta de 42°C a 46°C, diminui consideravelmente a viabilidade celular. Este aumento de temperatura danifica principalmente as células tumorais, com menos efeitos nas células normais (TORCHILIN, 2007; ANKAMWAR *et al.*, 2010), uma vez que as células tumorais são mais susceptíveis ao aumento da temperatura devido ao seu baixo suplemento de sangue (LAURENT *et al.*, 2011; CONDE; DORIA; BAPTISTA, 2012; COLOMBO *et al.*, 2012). Além disso, as células neoplásicas apresentam membrana celular mais frágil do que as células normais, devido à sua alta acidez causada pela incapacidade de expelirem apropriadamente os produtos derivados do metabolismo anaeróbico, fazendo com que as células tumorais sejam mais susceptíveis ao aumento da temperatura (KAWASHITA *et al.*, 2005).

Estudos com resultados promissores utilizando magnetohipertermia já foram demonstrados para tratamento de diversos tipos de câncer, incluindo mama (ITO *et al.*, 2003; PORTILHO *et al.*, 2011), próstata, melanoma e tumores de cabeça e pescoço (ZHAO *et al.*, 2012). Ito *et al.* (2003) mostraram em um estudo *in vivo* com camundongos, a remissão completa de um carcinoma mamário, medindo mais de 15 mm, por meio de exposições repetidas a um campo magnético alternado subsequente ao tratamento com magnetolipossomos.

A magnetohipertermia também pode auxiliar no tratamento do câncer principalmente quando combinada com terapias convencionais, como a quimioterapia, a radioterapia e a cirurgia (MORNET *et al.*, 2004; COLOMBO *et al.*, 2012). O aumento da temperatura do tecido tumoral aumenta o fluxo sanguíneo local, fazendo com que mais agente quimioterápico chegue ao tecido alvo, além de aumentar a oxigenação tecidual, fator essencial para a eficácia da radioterapia. A diminuição do volume tumoral proporcionado pela magnetohipertermia também facilita a remoção cirúrgica do tumor (HILDEBRANDT *et al.*, 2002; CHERUKURI; GLAZER; CURLEY, 2010).

1.1.2. Nanopartículas poliméricas e seu uso como sistemas de entrega de drogas

As nanopartículas poliméricas são principalmente utilizadas como sistemas carreadores de drogas e podem ser diferenciadas em nanocápsulas e nanoesferas. As nanocápsulas são constituídas por um invólucro polimérico com um núcleo diferenciado, em que o medicamento pode estar disposto tanto na região central quanto na matriz polimérica. Por sua vez, as nanoesferas são compostas por uma matriz polimérica, em que o medicamento é imerso por todo o polímero (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003). A Figura 1 mostra a representação esquemática de nanocápsulas e nanoesferas.

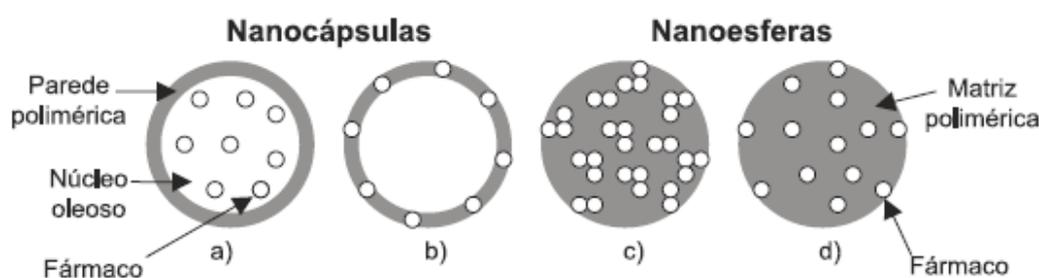


Figura 1: Representação esquemática de nanocápsulas e nanoesferas poliméricas. a) fármaco dissolvido no núcleo oleoso das nanocápsulas; b) fármaco adsorvido à parede polimérica das nanocápsulas; c) fármaco retido na matriz polimérica das nanoesferas; d) fármaco adsorvido ou disperso molecularmente na matriz polimérica das nanoesferas. (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003)

As nanocápsulas, juntamente com os lipossomas, são os carreadores mais utilizados para entrega de drogas. Devido ao pequeno tamanho, sistemas nanoestruturados apresentam maior área de superfície por unidade de volume, permitindo a associação de quantidades maiores de drogas ou biomoléculas adsorvidas (DANHIER *et al.*, 2012).

Uma das grandes vantagens do uso de sistemas carreadores de drogas é a possibilidade de aumentar a concentração do fármaco no local de interesse, no tumor por exemplo, maximizando a resposta terapêutica, ao mesmo tempo em que diminui os danos às células normais (MISRA; ACHARYA; SAHOO, 2010). Os sistemas de entrega de drogas nanoestruturados têm demonstrado, além de menos efeitos adversos, estabilidade, maior taxa de absorção pelos tecidos biológicos e liberação controlada (NIE *et al.*, 2007; FAROKHAZD; LANGER, 2009). Além disso, a possibilidade de reduzir a frequência da administração das drogas, melhora o conforto do paciente, o que pode aumentar a adesão ao tratamento prolongado (SAHOO; PARVEEN; PANDA, 2007).

Características como tamanho, carga de superfície, biocompatibilidade, padrão de liberação e disponibilidade de grupos funcionais para conjugação de diversas moléculas, são cruciais para o sucesso do veículo de entrega (ACHARYA; SAHOO, 2011). A utilização de nanocápsulas preparadas a partir de polímeros biodegradáveis, como o PLGA [ácido poli(láctico-co-glicólico)] (Figura 2), são de grande interesse. O PLGA é biocompatível e biodegradável, sendo os seus subprodutos (ácido láctico e ácido glicólico) eliminados do organismo pelas vias metabólicas normais do ciclo do ácido cítrico (ACHARYA; SAHOO, 2011; DANHIER *et al.*, 2012). Formulações à base de PLGA podem ser empregadas para encapsular tanto drogas hidrofílicas, quanto drogas hidrofóbicas. Drogas hidrofóbicas como Doxorubicina (SPARANO *et al.*, 2001; PARK *et al.*, 2009; LI *et al.*, 2011; CHEN, *et al.*, 2012; JIA *et al.*, 2012), Adriamicina (DAVARAN *et al.*, 2006) e Paclitaxel (GRADISHAR *et al.*, 2005; JIN *et al.*, 2009; DANHIER *et al.*, 2009) têm sido associadas a sistemas de entrega de drogas nanoestruturados, facilitando a sua administração e aumentando a eficácia antitumoral (WANG *et al.*, 2011).

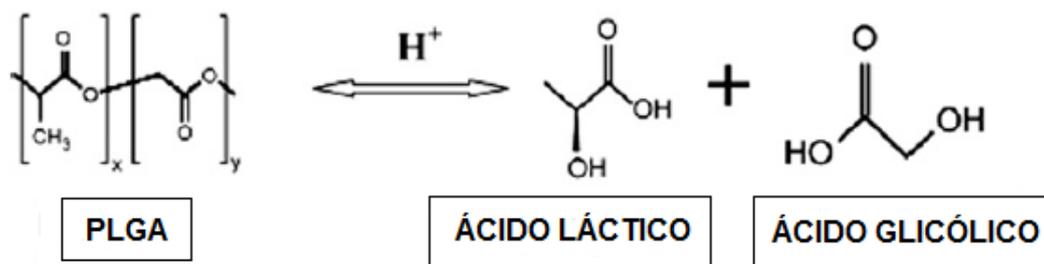


Figura 2: Representação estrutural do PLGA, com os subprodutos do seu metabolismo (ácido láctico e ácido glicólico). Danhier *et al.* (2012), com modificações.

Uma das drogas mais utilizadas no tratamento do câncer de mama metastático é o Paclitaxel, que impede a polimerização da tubulina e, conseqüentemente, a formação dos microtúbulos, impedindo assim a divisão celular e a proliferação das células tumorais (DANHIER *et al.*, 2009). O Paclitaxel também é utilizado no tratamento do câncer de ovário, cólon e pulmões. Devido à baixa solubilidade, ele deve ser diluído em óleo de rícino e etanol o que aumenta a sua citotoxicidade e os efeitos adversos. Uma nova formulação chamada de Abraxane®, desenvolvida para tratamento do câncer de mama metastático, é composta por Paclitaxel conjugado a nanopartículas de albumina e tem apresentado menos efeitos colaterais do que a droga livre, além de maior efeito antitumoral (GRADISHAR *et al.*, 2005; MIELE *et al.*, 2009).

O encapsulamento de drogas e de nanopartículas magnéticas, em nanoestruturas poliméricas e em lipossomos, forma nanocompostos que são vantajosos por poderem ser utilizados não só como sistemas de entrega de drogas, mas também para indução da magnetohipertermia. Kulshrestha *et al.* (2012) mostrou que a magnetohipertermia potencializou a citotoxicidade do Paclitaxel encapsulado em magnetolipossomas. Resultados similares foram observados por Pradhan *et al.* (2010), quando o quimioterápico Doxorubicina era encapsulado em magnetolipossomas. Além disso, os sistemas de entrega de drogas magnéticos podem também ser direcionados de forma ativa ao local de interesse, por meio da exposição a um campo magnético contínuo, aumentando assim a concentração de drogas no sítio-alvo (KUMAR; MOHAMMAD, 2011).

1.2. COMPOSTOS DE SELÊNIO NO TRATAMENTO E PREVENÇÃO DO CÂNCER

Selênio (Se) é um microelemento essencial para o funcionamento normal do organismo, podendo ser encontrado em cereais, castanhas, nozes, carnes, vegetais (principalmente alho, cebola e brócolis) e em frutos do mar (NAFISI; MONTAZERI; MANOUCHEHRI, 2012). A recomendação para o consumo diário de selênio é em média de 60 µg para os homens e de 53 µg para as mulheres (RAYMAN, 2012).

Já é bem estabelecido que o consumo inadequado de selênio está relacionado ao início da progressão de diversas patologias, como doenças cardiovasculares e neurológicas, diabetes e câncer (MAURO *et al.*, 2011; RAYMAN, 2012). A suplementação de selênio pode prevenir o desenvolvimento de alguns tipos de câncer, como os de próstata, pulmões, cólon e fígado (CHEN; WONG; SHENG, 2009; TAN *et al.*, 2009; MUECKE *et al.*, 2010; MAURO *et al.*, 2011). Entretanto, em excesso, o selênio é tóxico, podendo ter o efeito contrário, induzindo o processo de carcinogênese e promovendo danos ao DNA (NOVOTNY *et al.*, 2010; LUO *et al.*, 2012).

Tanto os compostos orgânicos de selênio (como a selenocisteína e a selenometionina), quanto os inorgânicos (como o selenito de sódio), apresentam potencial para prevenir e controlar o desenvolvimento de neoplasias malignas. Os compostos orgânicos são mais efetivos, uma vez que apresentam maior atividade antitumoral e menor toxicidade do que os compostos inorgânicos, induzido apoptose, sem danificar a membrana celular ou o DNA (SHANG *et al.*, 2011). Por outro lado, os compostos inorgânicos de selênio induzem necrose celular, além de danos ao DNA e perda da integridade da membrana celular.

O efeito protetor do selênio está associado à sua presença na estrutura de algumas enzimas, dentre elas a glutathiona peroxidase, conhecida pelo seu papel na redução de espécies reativas de oxigênio (ROS). Devido à sua alta reatividade, ROS em excesso causam lesões no DNA e em proteínas, levando ao aparecimento de diversas patologias, incluindo o câncer (COLE-EZEA *et al.*, 2012). Desta forma, o selênio pode ser considerado um componente envolvido na neutralização de ROS, apresentando propriedades antitumorais (SUCHOCKI *et al.*, 2007; BROZMANOVÁ *et al.*, 2010; HAWKES; ALKAN, 2011).

Os compostos de selênio também estão envolvidos na redução da inflamação; na detoxificação; no aumento da resposta imune; no aumento dos níveis da proteína p53, envolvida com a supressão tumoral; no bloqueio do ciclo celular e na indução de apoptose (BROZMANOVÁ *et al.*, 2010; LUO *et al.*, 2012; YAZDI *et al.*, 2012).

Outra forma de ação do selênio é a inibição da angiogênese, um meio de controlar o crescimento tumoral, a ocorrência de metástase e a resposta às terapias. Jiang *et al.* (1999) mostrou a redução dos níveis do fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) em animais portadores de carcinoma mamário que receberam suplementação de selênio.

Há também relatos do efeito do selênio como inibidor da enzima aromatase, bloqueando assim a conversão de hormônios androgênicos em estrógeno, hormônio relacionado à progressão de alguns tipos de tumores, como os de mama (GAO *et al.*, 2012).

Ainda, já foi demonstrado que o selênio pode aumentar a eficácia terapêutica de alguns quimioterápicos, uma vez que protege o tecido normal contra a toxicidade destes medicamentos (LI *et al.*, 2007; CHEN; WONG; ZHENG, 2009; SONG *et al.*, 2009), além de potencializar o efeito antitumoral (VADGAMA *et al.*, 2000; LI *et al.*, 2007, 2009). Em estudos com tumores de mama humano, da linhagem MCF-7, foi observado sinergismo quando o tratamento com selênio era associado à administração do quimioterápico Doxorrubicina (LI *et al.*, 2007) ou com Tamoxifeno (LI *et al.*, 2009), diminuindo a viabilidade celular e induzindo apoptose. Tan *et al.* (2009), também demonstraram a potencialização do efeito antitumoral do quimioterápico Adriamicina no tratamento de células hepáticas humanas, quando estas eram também expostas a compostos de selênio.

O desenvolvimento de novos compostos ricos em selênio, assim como a nanoestruturação deste elemento, tem sido alvo de diversas pesquisas objetivando a redução da sua toxicidade. Estudos já demonstraram que o selênio, quando nanoestruturado, é menos tóxico do que outros compostos de selênio, embora mantenha os efeitos antitumorais (ZHANG; WANG; XU, 2008; VEKARIYA; KAUR; TIKOO, 2012; YAZDI *et al.*, 2012). Luo *et al.* (2012), por exemplo, mostraram que nanopartículas de selênio diminuem a viabilidade de células de carcinoma mamário (MDA-MB-231) e de carcinoma cervical humano (HeLa).

Dentre os compostos a base de selênio que já foram desenvolvidos, encontra-se o Selol.

1.2.1. Selol

O Selol é uma mistura de selenitotriglicerídeos, um grupo de componentes semi-sintéticos contendo selênio (Se^{4+}), preparados a partir do óleo de girassol (JASTRZEBSKI *et al.*, 1995). O Selol foi sintetizado e patenteado (FITAK; GRABOWSKI; SUCHOCKI, 1999) por um grupo de pesquisa da Universidade de Varsóvia, Polônia. A estrutura do Selol, determinada por espectroscopia de ressonância magnética nuclear (NMR), está representada na Figura 3.

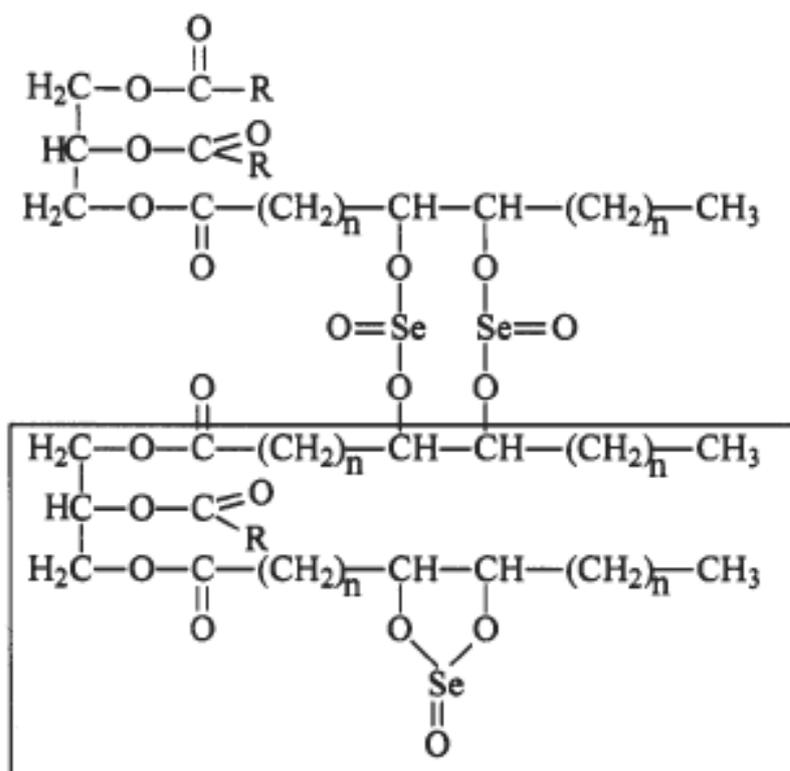


Figura 3: Estrutura esquemática do Selol (SUCHOCKI *et al.*, 2007).

Um estudo de toxicidade aguda em ratos, mostrou que a DL_{50} (dose letal para 50% dos animais) era de 100 mg/Kg após a administração oral de Selol. Enquanto

que a toxicidade desta substância após administração subcutânea e intraperitoneal foi extremamente baixa (JASTRZEBSKI *et al.*, 1995).

O padrão de distribuição do Selol também foi demonstrado em ratos. Para estas análises, Selol, contendo 5% de selênio, foi administrado oralmente ou por via subcutânea, na dose de 12 mg/Kg. Foi verificado que, independente da via de tratamento, o selênio é rapidamente distribuído por todo o organismo, tendo sido encontrado em altas concentrações nas glândulas supra-renais, testículos, epidídimos e cortex cerebral. Concentrações menores foram também encontradas no cerebelo, fígado, pulmões e baço. O coração era o órgão com menor acúmulo de selênio. Porém, a retenção do selênio nos órgãos foi maior nos animais tratados por via subcutânea. O Selol foi excretado principalmente pelos rins, sendo completamente eliminado do organismo dentro de 24 horas da administração (JASTRZEBSKI *et al.*, 1997).

Estudos em cultura de células leucêmicas humanas (HL-60) (SUCHOCKI *et al.*, 2007) e de carcinoma cervical humano (HeLa) (DUDKIEWICZ-WILCZYNSHA *et al.*, 2011) confirmaram o efeito antiproliferativo do Selol, de maneira dose e tempo dependente. Interessantemente, Suchocki *et al.* (2007) também mostraram que o Selol tornou sensíveis células leucêmicas resistentes a quimioterápicos, indicando que este composto pode ser utilizado também como agente quimiosensibilizador no tratamento do câncer.

Os testes realizados mostraram que o Selol apresenta baixa toxicidade em comparação com outros compostos de selênio, permitindo assim a administração de quantidades maiores deste microelemento, o que aumenta sua eficácia antitumoral (SUCHOCKI *et al.*, 2007; DUDKIEWICZ-WILCZYNSHA *et al.*, 2011).

1.3. NANOCÁPSULAS MAGNÉTICAS DE SELOL

Tendo em vista que tanto o Selol, quanto as nanopartículas magnéticas, podem apresentar efeito antitumoral, pressupõe-se que a conjugação de ambos represente uma formulação com potencial para o tratamento do câncer.

Uma vez que o Selol é um composto altamente hidrofóbico, a sua nanoestruturação em nanocápsulas de PLGA facilita a sua administração. Além disso, a associação de nanopartículas magnéticas às nanocápsulas de Selol permite

a aplicação da técnica de magnetohipertermia, por meio da utilização de um campo magnético de frequência alternada. Estudos *in vitro* realizados concomitantemente com esta pesquisa, mostraram o efeito antitumoral de nanocápsulas magnéticas de Selol (NCMagh-SE) em células de melanoma (B16-F10) (FALQUEIRO *et al.*, 2011) e de carcinoma de células escamosas oral (OSSC) (FALQUEIRO *et al.*, 2012). Foi demonstrado, também, por Falqueiro *et al.* (2012), a potencialização do efeito antitumoral de NCMagh-SE em células de melanoma, quando o tratamento era associado à exposição ao campo magnético alternado.

Considerando que os efeitos antitumorais podem variar de acordo com o tipo celular (FALQUEIRO *et al.*, 2012); e que é fundamental a avaliação não só em células tumorais, bem como em células normais (CARNEIRO *et al.*, 2011), decidiu-se pesquisar os efeitos de NCMagh-SE, associado ou não à exposição ao campo magnético alternado, em células de adenocarcinoma mamário murino (4T1) e humano (MCF-7), assim como em células normais de mama (MCF-10A).

Considerando-se, também, que a avaliação dos efeitos *in vivo* é uma etapa importante da pesquisa pré-clínica com novos medicamentos, diversos parâmetros biológicos foram avaliados neste estudo. As análises foram realizadas em camundongos portadores de carcinoma mamário ortotópico autólogo, induzido por células 4T1, tratados com NCMagh-SE.

Ainda, sabendo que compostos de selênio podem aumentar a eficácia terapêutica de alguns quimioterápicos (VADGAMA *et al.*, 2000; LI *et al.*, 2009; CHEN; WONG; ZHENG, 2009) e que a hipertermia pode aumentar a eficácia da quimioterapia (MORNET *et al.*, 2004; COLOMBO *et al.*, 2012), decidiu-se testar os efeitos do tratamento com NCMagh-SE, associado ao tratamento com o quimioterápico Paclitaxel, e também à exposição ao campo magnético de frequência alternada.

2. JUSTIFICATIVA

A alta incidência do câncer na população mundial, em especial o de mama, que é o que mais acomete mulheres em todo o mundo, e a necessidade de se desenvolver novas formas de tratamento, uma vez que as terapias convencionais apresentam efeitos adversos severos, incentivam a busca por métodos alternativos para tratamento das neoplasias malignas. Neste contexto, a Nanobiotecnologia surge com novas propostas de materiais capazes de auxiliar no tratamento e no diagnóstico do câncer. A utilização de nanopartículas magnéticas como sistemas carreadores de fármacos e, ao mesmo tempo, eficazes na promoção da magnetohipertermia, representa uma alternativa para o tratamento de tumores malignos.

Nosso grupo de pesquisa tem investido na pesquisa de novos materiais em escala nanométrica para tratamento do câncer e, recentemente, um nova amostra composta por nanocápsulas magnéticas de Selol (NCMagh-SE) foi desenvolvida. Considerando que tanto o Selol quanto as nanopartículas magnéticas podem apresentar efeito antitumoral, pressupõe-se que o co-encapsulamento de ambos em um sistema carreador represente uma formulação com potencial para o tratamento do câncer. Este é o primeiro estudo *in vitro* comparando-se os efeitos do tratamento com NCMagh-SE em células tumorais e normais. Além disso, representa o primeiro relato de estudo com amostras à base de Selol em animais portadores de tumor. A necessidade de se investigar a eficácia deste novo nanossistema em induzir a morte de células tumorais, em promover a magnetohipertermia e em auxiliar no tratamento quimioterápico, justifica a realização desta pesquisa.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Investigar os efeitos biológicos de nanocápsulas magnéticas de Selol (NCMagh-SE) e a sua eficácia no tratamento do câncer de mama experimental.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Caracterização

- (1) Caracterizar a morfologia e o tamanho de NCMagh-SE, por Microscopia Eletrônica;
- (2) Caracterizar o tamanho e a carga de NCMagh-SE por Espalhamento de Luz Dinâmica e Zeta-sizer.

Ensaio *in vitro*

- (3) Avaliar a citotoxicidade e a ocorrência de alterações morfológicas induzidas por NCMagh-SE, em células de adenocarcinoma mamário e em células epiteliais de mama normal, por meio de testes de viabilidade celular e microscopia de luz;
- (4) Avaliar o tipo de morte celular e a indução de fragmentação do DNA por NCMagh-SE, em células de adenocarcinoma mamário, por meio de técnicas de citometria de fluxo;
- (5) Verificar o efeito citotóxico do tratamento com NCMagh-SE, associado à exposição ao campo magnético alternado, em células de adenocarcinoma mamário.

Ensaio *in vivo*

- (6) Avaliar a toxicidade de NCMagh-SE em camundongos portadores de carcinoma mamário, por meio de análises clínicas, histopatológicas, hematológicas, bioquímicas e genotóxicas;
- (7) Avaliar o efeito antitumoral de NCMagh-Se, por meio de observações clínicas e análises histológicas dos tumores;
- (8) Avaliar o efeito antitumoral do tratamento com NCMagh-SE, associado ao tratamento com o quimioterápico Paclitaxel;
- (9) Avaliar o efeito antitumoral do tratamento com NCMagh-SE, combinado ao tratamento com o quimioterápico Paclitaxel e à exposição ao campo magnético alternado.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. AMOSTRA

A amostra utilizada neste estudo, denominada nanocápsulas magnéticas de Selol (NCMagh-SE), é constituída por nanocápsulas de ácido poli(láctico-co-glicólico) (PLGA) contendo nanopartículas de maghemita e Selol.

A amostra de Selol utilizada neste estudo apresenta 5% de selênio em sua composição e foi gentilmente cedida pelos departamentos de Análise de Drogas e de Química Farmacêutica, da Universidade de Medicina de Varsóvia, Polônia, local onde foi sintetizada.

As nanopartículas de maghemita eram provenientes de um fluido magnético iônico, sintetizado seguindo a metodologia descrita por Bee *et al.* (1995), com modificações. Resumidamente, a síntese foi realizada pelo método de coprecipitação de sais de ferro (II) e (III) em meio alcalino e, após a remoção da solução alcalina, foi termicamente tratado com nitrato férrico. Posteriormente, foi adicionada uma solução de ácido nítrico ao precipitado, até que o pH 1,5 fosse atingido (LACAVA, 2010). O fluido iônico utilizado neste estudo foi cedido pelo Laboratório de Manipulação de Amostras, do Instituto de Física, da Universidade de Brasília (UnB).

O encapsulamento das nanopartículas de maghemita e do Selol em nanocápsulas de ácido poli(láctico-co-glicólico) (PLGA) (FALQUEIRO *et al.*, 2011), foi realizado pelo grupo de Fotobiologia e Fotomedicina, Departamento de Química, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (USP). Resumidamente, as nanocápsulas foram preparadas pelo método de precipitação, em que PLGA 50:50, fosfatidilcolina e Selol foram dissolvidos em acetona. A solução então foi adicionada, gota a gota, a uma solução aquosa contendo poloxamer 188 e fluido iônico (utilizado na preparação das nanocápsulas magnéticas). O solvente foi removido por evaporação e as formulações foram concentradas para um volume final de 10 mL.

A amostra NCMagh-SE contém 10 mg/mL de Selol 5%, o que corresponde a 500 µg/mL de selênio, e 5×10^{11} nanopartículas de maghemita/mL. Como controles da amostra NCMagh-SE, foram sintetizadas amostras de nanocápsulas de PLGA

contendo nanopartículas de maghemita ou Selol. Estas amostras foram nomeadas nanocápsulas magnéticas (NCMagh) e nanocápsulas de Selol (NCSE), respectivamente.

4.2. CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS

Para visualização do tamanho e do formato das nanocápsulas foram utilizadas técnicas de Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) e Varredura (MEV). Para tais análises, as amostras foram diluídas 500 vezes em água destilada e colocadas em telas para MET, de 300 meshes, recobertas com Formvar (0,4%) ou metalizadas com ouro coloidal para análise por MEV. Após secarem, as amostras foram analisadas e fotomicrografadas em Microscópio Eletrônico de Transmissão (JEOL 1011) e Varredura (JEOL JSM-7001F), no Laboratório de Microscopia Eletrônica da Universidade de Brasília. O diâmetro médio das amostras avaliadas por MET foi obtido por análise em computador, utilizando-se o *software* Image-Pro Plus versão 5.1. A distribuição das partículas foi conseguida utilizando-se o melhor ajuste log normal.

O diâmetro médio das amostras também foi determinado por Espalhamento de Luz Dinâmica (DLS - *Dynamic Light Scattering*) e a carga de superfície das nanocápsulas foi avaliada por medição do potencial zeta no equipamento Zetasizer NanoZS (Malvern). Para as análises, foram utilizadas amostras diluídas 100 vezes em água nanopura. Todas as medições foram realizadas em triplicata, a 25°C, com um ângulo fixo de detecção de 173°. O pH das amostras foi medido utilizando fita indicadora de pH.

4.3. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Inicialmente avaliou-se a toxicidade *in vitro* de NCMagh-SE, tanto em células tumorais quanto em células normais de mama, utilizando diferentes concentrações e tempos de tratamento. A citotoxicidade foi avaliada pelo método do MTT [(brometo de 3(4,5 dimetiliazol-2il)-2,5-difenil-tetrazólio)]. Para controle da amostra NCMagh-SE foram utilizadas, nos testes *in vitro*, amostras de nanocápsulas magnéticas

(NCMagh) e de nanocápsulas de Selol (NCSE). As células foram ainda coradas por Giemsa e pelo método de Perls para análise, por microscopia de luz, da morfologia e da associação de NCMagh-SE às células. Com base nos resultados encontrados no teste do MTT, foram realizadas análises, por citometria de fluxo, para identificação do tipo de morte celular e para avaliação da fragmentação do DNA.

Posteriormente, foi avaliado o efeito da aplicação do campo magnético alternado, subsequente ao tratamento com NCMagh-SE, na viabilidade de células neoplásicas de mama. As análises foram feitas pelo teste do MTT, utilizando duas concentrações diferentes de NCMagh-SE, definidas com base nos testes *in vitro* realizados no início desta pesquisa.

Foram então iniciados os experimentos *in vivo*, em que foi avaliada a toxicidade e o efeito antitumoral do tratamento com NCMagh-SE, associado ou não ao tratamento com quimioterápico Paclitaxel, em camundongos portadores de adenocarcinoma mamário. O modelo de indução tumoral utilizado neste estudo foi previamente validado por Carneiro (2011). Os camundongos foram tratados com duas doses diferentes de NCMagh-SE, injetadas via intratumoral, enquanto que a administração do quimioterápico Paclitaxel foi realizada via endovenosa. Os animais e os tumores foram avaliados clinicamente e foram realizadas análises citométricas, bioquímicas e histológicas para avaliação da toxicidade e do efeito antitumoral dos tratamentos.

Por fim, foi realizado, em camundongos portadores de carcinoma mamário, um experimento piloto para avaliação da toxicidade e do efeito antitumoral do tratamento concomitante com NCMagh-SE e Paclitaxel, associado à exposição ao campo magnético de frequência alternada. Nesta etapa, tanto a amostra NCMagh-SE, quanto o quimioterápico Paclitaxel, foram administrados via intratumoral. Os animais e os tumores foram avaliados clinicamente e foram realizadas análises citométricas, genotóxicas e bioquímicas para avaliação da toxicidade e do efeito antitumoral dos tratamentos.

Um resumo da estratégia experimental adotada nesta tese está representado na Figura 4.

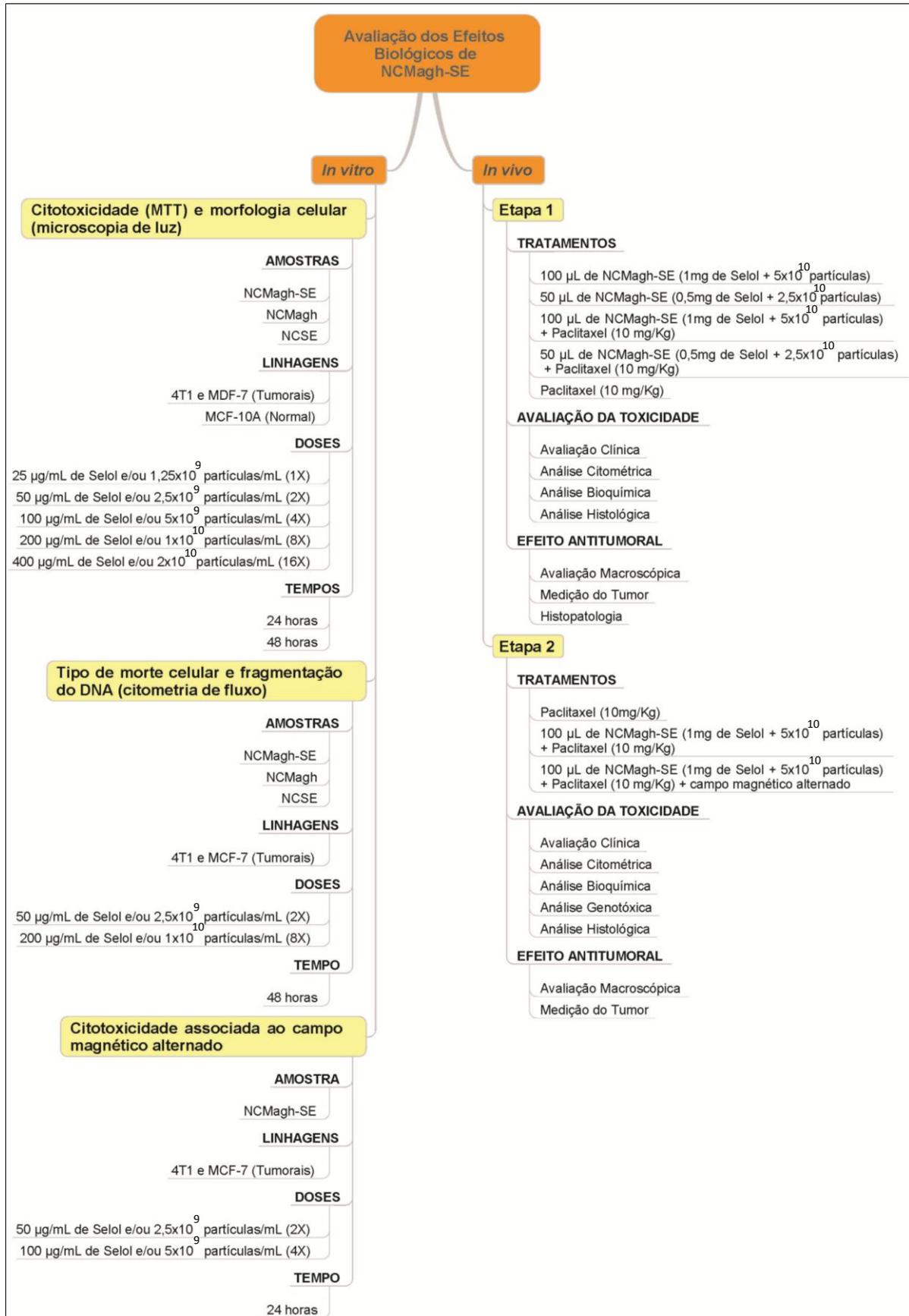


Figura 4: Diagrama representativo da estratégia experimental utilizada no desenvolvimento desta tese.

4.4. EXPERIMENTOS *IN VITRO*

Os estudos *in vitro* foram realizados objetivando a análise dos efeitos biológicos de NCMagh-SE de acordo com a dose, tempo de tratamento e exposição ao campo magnético alternado. Como controles da amostra NCMagh-SE, foram utilizadas nanocápsulas magnéticas (NCMagh) e nanocápsulas de Selol (NCSE).

Para a avaliação dos efeitos biológicos da dose das nanocápsulas, foram utilizadas até cinco concentrações diferentes de NCMagh-SE, NCMagh e NCSE, apresentadas na Tabela 1, definidas com base no artigo publicado por Suchocki *et al.* (2007), que avaliou o efeito do Selol em células leucêmicas humanas.

Tabela 1: Concentrações de amostras de nanocápsulas utilizadas nos experimentos *in vitro*.

Concentração	NCMagh-SE	NCMagh	NCSE
1x	25 µg/mL de Selol + 1,25x10 ⁹ partículas/mL	1,25x10 ⁹ partículas/mL	25 µg/mL de Selol
2x	50 µg/mL de Selol + 2,5x10 ⁹ partículas/mL	2,5x10 ⁹ partículas/mL	50 µg/mL de Selol
4x	100 µg/mL de Selol + 5x10 ⁹ partículas/mL	5x10 ⁹ partículas/mL	100 µg/mL de Selol
8x	200 µg/mL de Selol + 1x10 ¹⁰ partículas/mL	1x10 ¹⁰ partículas/mL	200 µg/mL de Selol
16x	400 µg/mL de Selol + 2x10 ¹⁰ partículas/mL	2x10 ¹⁰ partículas/mL	400 µg/mL de Selol

4.4.1. Linhagens celulares

Foram utilizadas células das linhagens 4T1 (adenocarcinoma mamário murino), MCF-7 (adenocarcinoma mamário humano) e MCF-10A (célula epitelial de ducto mamário normal).

A linhagem 4T1 (ATCC[®] CRL-2539TM) foi cedida pela Prof^a. Dr^a. Suzanne Ostrand-Roseberg, do Departamento de Ciências Biológicas, da Universidade de Baltimore, Estados Unidos. A linhagem MCF-7 foi adquirida da American Type Culture Collection (ATCC[®] HTB-22TM). E a linhagem MCF-10A (ATCC[®] CRL

1037TM) foi gentilmente cedida pela Prof^a. Dr^a. Maria Mitzi Brentani, do Laboratório de Oncologia Experimental, do Departamento de Radiologia, da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, USP, Brasil.

As células MCF-7 e 4T1 foram mantidas em meio de cultura DMEM (Gibco), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB, Gibco) e 1% de penicilina (100 unidades/mL)/estreptomicina (50 unidades/mL) (Invitrogen). Enquanto que as células MCF-10A foram mantidas em meio de cultura DMEM/F12 (Gibco), suplementado com fator de crescimento epidermal humano (20 ng/mL, Sigma), toxina colérica (100 ng/mL, Sigma), insulina bovina (1 mg/mL, Sigma), hidrocortisona (500 ng/mL, Sigma) e 5% de soro fetal equino (Gibco), acrescidos de 1% de penicilina e estreptomicina.

As células foram rotineiramente mantidas em frascos de cultura celular de poliestireno de 75 cm² e mantidas a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂. Uma vez atingidos 80 a 90% de confluência, as células eram soltas do fundo do frasco por adição de solução 0,25% de tripsina (Gibco) por 5 a 15 minutos e, posteriormente, centrifugadas a 1000 rpm por 3 minutos.

4.4.2. Avaliação da citotoxicidade induzida por NCMagh-SE e seus controles (NCMagh e NCSE)

A citotoxicidade foi avaliada pelo método do MTT, um teste colorimétrico que quantifica a redução do reagente MTT em um composto roxo, conhecido como formazan, por meio da ação de desidrogenases mitocondriais. A presença destas enzimas ativas é um indicativo de viabilidade celular. Este método tem sido amplamente utilizado para avaliar a citotoxicidade de nanocompostos (AHMADIAN *et al.*, 2009; CARNEIRO *et al.*, 2011; CUNHA-AZEVEDO *et al.*, 2011).

A avaliação da citotoxicidade induzida pelo tratamento com NCMagh-SE e seus controles foi realizada utilizando-se cinco diferentes concentrações, variando de 25 µg/mL (1X) a 400 µg/mL(16X) de Selol e/ou 1,25x10⁹ partículas/mL (1X) a 2x10¹⁰ partículas/mL (16X), com o objetivo de se verificar o efeito da dose na viabilidade celular. Para que as células fossem submetidas aos mesmos estímulos de crescimento celular, adotou-se manter o mesmo volume de meio de cultura para todos os grupos experimentais, variando-se apenas o volume de amostra e de tampão fosfato-salino (PBS, pH 7,2, Laborclin). Células não tratadas foram usadas

como grupo controle, enquanto que células tratadas com o quimioterápico Paclitaxel (T7402, Sigma), na concentração de 40 µg/mL, foram utilizadas como controle positivo.

As análises foram realizadas em linhagens celulares 4T1, MCF-7 e MCF-10A, semeadas em placas de cultura de 96 poços, na concentração de 5×10^3 células por poço, contendo 200 µL de meio de crescimento. A quantificação das células foi realizada por meio da contagem direta em câmara de Neubauer, utilizando o corante Azul de Tripán (Sigma). Após 24 horas, o meio de cultura foi substituído pelos diferentes tratamentos. As células foram então incubadas a 37°C, em atmosfera de 5% de CO₂ e 80% de umidade, por 24 e 48 horas, com o objetivo de se verificar o efeito do tempo de exposição na citotoxicidade induzida por NCMagh-SE, NCMagh e NCSE. Após o tempo de incubação, as células foram lavadas três vezes com PBS, para retirada completa do meio de tratamento e posterior substituição por solução contendo 10% de MTT (5 mg/mL, Invitrogen) em meio de cultura. Após outro período de incubação de 2,5 horas, o meio de cultura foi removido e foram adicionados 200 µL do solvente dimetilsulfóxido (DMSO, Vetec), para diluição dos cristais de formazan. A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro (SpectraMax M2, Molecular Devices, EUA), utilizando comprimento de onda de 595 nm. A média das absorbâncias do grupo controle foi considerada como 100% de viabilidade e foi utilizada para calcular o percentual de células viáveis após os diversos tratamentos. Os experimentos foram realizados em triplicata e repetidos duas vezes.

A concentração de NCMagh-SE necessária para inibir o crescimento celular em 50% (IC₅₀) foi calculada com base nos resultados do teste do MTT, utilizando o software GraphPad Prism, versão 5.00 (GraphPad Software Inc., EUA).

4.4.3. Análises morfológicas de células tratadas com NCMagh-SE e seus controles (NCMagh e NCSE)

A análise da morfologia celular, por microscopia de luz, foi realizada para verificar possíveis alterações induzidas pelo tratamento com NCMagh-SE e seus controles (NCMagh e NCSE), assim como para avaliar a presença e a incorporação de nanopartículas magnéticas. Para realização destas análises, seguiu-se os

mesmos procedimentos de plaqueamento e tratamento utilizados para avaliação da citotoxicidade (item 4.4.2.). Após 24 e 48 horas de incubação com cinco diferentes concentrações de NCMagh-SE, NCMagh e NCSE, variando de 1X a 16X, as células foram lavadas três vezes com PBS e fixadas por 5 minutos em metanol a 4°C. Em seguida, foram coradas por solução de Giemsa 4% em metanol, por 5 minutos, para avaliação da morfologia celular; ou coradas com solução de Perls (ácido clorídrico a 2% e ferrocianeto de potássio tri-hidratado a 2%, na proporção v/v de 1:1) e contra-corados com vermelho rápido nuclear, para avaliação da presença e incorporação das nanopartículas de maghemita. As células foram analisadas em microscópio Axiovert 100 (Zeiss) e fotografadas em aumento de 20x e 40x.

4.4.4. Avaliação do tipo de morte celular induzido por NCMagh-SE e seus controles (NCMagh e NCSE)

A avaliação do tipo de morte celular foi realizada por citometria de fluxo (CyFlow, Partec, Alemanha) por meio da análise da exposição de fosfatidilserina. Este teste foi realizado utilizando-se o Kit Anexina-V-FITC e iodeto de propídio (PI) (PHN1010, Invitrogen). A exposição da fosfatidilserina é uma das primeiras alterações que ocorrem nas células em processo de apoptose. Esta exposição pode ser identificada pela marcação por Anexina-V, que tem a capacidade de se ligar fortemente aos fosfolípidos da membrana plasmática, enquanto que a marcação por iodeto de propídio permite identificar células com permeabilidade na membrana, indicando fase tardia de apoptose ou necrose (BERTHO; SANTIAGO; COUTINHO, 2000; PERES; CURI, 2005).

As concentrações de NCMagh-SE utilizadas para avaliação do tipo de morte celular foram definidas com base nos resultados do teste do MTT (item 4.4.2.). A concentração de 50 µg/mL de Selol + $2,5 \times 10^9$ partículas/mL (NCMagh-SE - 2X) foi escolhida por ter sido citotóxica apenas para as células tumorais (4T1 e MCF-7) após 48 horas de exposição. Por este motivo as análises não foram realizadas na linhagem normal (MCF-10A). Como controle, foram também avaliados os efeitos do tratamento com NCMagh ($2,5 \times 10^9$ partículas/mL – 2X) e NCSE (50 µL/mL de Selol – 2X). Para avaliação do efeito da dose no tipo de morte celular, as células também

foram tratadas com 200 µg/mL de Selol + 1×10^{10} partículas/mL (8X) de NCMagh-SE. Células sem tratamento foram utilizadas como controle negativo e células tratadas com Paclitaxel (40 µg/mL) foram utilizadas como controle positivo. Todos os tratamentos foram realizados em triplicatas .

O experimento foi realizado em células tumorais de mama, das linhagens 4T1 e MCF7, semeadas em placas de 6 poços, na concentração de $2,5 \times 10^5$ células por poço contendo 2 mL de meio de cultura. Após 24 horas, o meio de cultura foi substituído pelos diferentes tratamentos conforme previamente descrito. As células foram incubadas por 48 horas, a 37°C, em atmosfera de 5% de CO₂ e 80% de umidade. Após o tempo de incubação, o sobrenadante foi transferido para tubo Falcon e as células aderidas à placa foram tripsinizadas e transferidas para o mesmo tubo, ao qual foi adicionado meio de cultura para inativação da tripsina. As células foram centrifugadas a 2500 rpm por 5 minutos e ressuspensas em PBS. Este procedimento foi realizado duas vezes e, ao final, as células foram ressuspensas em 100 µL de tampão de ligação contendo 5 µL de Anexina-V-FITC. Transcorridos 15 minutos de incubação a 4°C, no escuro, foram adicionados 400 µL de tampão de ligação e 0,5 µL de iodeto de propídio (5 µg/mL). A análise foi realizada após 5 minutos.

Analisou-se 10000 células, por amostra, em citômetro de fluxo (CyFlow, Partec). A fluorescência emitida nos canais de fluorescência verde (FITC - FL1) e vermelha (PI - FL2) foi avaliada utilizando-se o programa FlowMax, versão 2.52, da Partec. Os resultados, de dois experimentos independentes, foram normalizados em relação ao grupo controle sem tratamento para determinação do percentual de células vivas, de células em apoptose e de células em necrose.

4.4.5. Análise da fragmentação do DNA induzida por NCMagh-SE e seus controles (NCMagh e NCSE)

A análise de fragmentação do DNA foi realizada por citometria de fluxo, utilizando-se iodeto de propídio para avaliação do potencial genotóxico das amostras. O iodeto de propídio se liga ao DNA e as células contendo núcleos íntegros emitem alta fluorescência, enquanto que fragmentos menores de DNA

emitem menor fluorescência por captarem menos iodeto de propídio (PERES; CURI, 2005).

Para essas análises, as células foram submetidas ao mesmo esquema de plaqueamento e tratamento utilizado para avaliação do tipo de morte celular (item 4.4.4.). A análise de fragmentação do DNA foi realizada somente nas células aderidas à placa, após 48 horas de incubação com o tratamento. Após descarte do sobrenadante, as células aderidas foram lavadas com PBS, tripsinizadas e centrifugadas a 2500 rpm por 5 minutos. Em seguida, as células foram fixadas em 1 mL de etanol 70% a 4°C e congeladas a -20°C por no máximo 5 dias.

Após o descongelamento das células, as mesmas foram centrifugadas e ressuspensas, duas vezes, em 500 µL de PBS. Após a última centrifugação, as células foram ressuspensas em 200 µL de tampão de lise (0,1% de citrato de sódio, 0,1% de Triton X-100 e 20 µg/mL de iodeto de propídio em PBS) e incubadas por 30 minutos, em temperatura ambiente, ao abrigo da luz.

Analisou-se 5000 eventos por amostra, no canal FL2 do citômetro de fluxo (Partec), seguindo o protocolo descrito por Peres e Curi (2005). O número de células com DNA fragmentado foi normalizado em relação ao grupo controle sem tratamento.

4.4.6. Avaliação da citotoxicidade induzida pelo tratamento com NCMagh-SE, associado à exposição ao campo magnético alternado

Para avaliação do efeito citotóxico do tratamento com NCMagh-SE, associado à exposição ao campo magnético alternado, células das linhagens 4T1 e MCF-7 foram plaqueadas em placas de cultura de 24 poços, na concentração de 2×10^4 células por poço, contendo 500 µL de meio de cultura. Após 24 horas de incubação em atmosfera úmida, para aderência das células à placa, o meio de crescimento foi substituído por meio de cultura contendo NCMagh-SE nas concentrações de 50 µg/mL de Selol + $2,5 \times 10^9$ partículas/mL (2X) e 100 µg/mL de Selol + 5×10^9 partículas/mL (4X). Após 4 horas de incubação, o meio contendo NCMagh-SE foi removido, as células foram lavadas duas vezes com PBS e 500 µL de meio de cultura foi adicionado. Em seguida, as células de cada um dos poços foram expostas por 3 minutos ao campo magnético alternado, com a ponteira do

equipamento a aproximadamente 5 mm de distância da superfície do meio de cultura. O campo magnético alternado era gerado por um equipamento desenvolvido pelo nosso grupo de pesquisa (Patente: PI 0204433-1), que opera a 1 MHz com 40 Oe de amplitude de campo. Após a exposição ao campo, as células foram incubadas por mais 20 horas em incubadora úmida e a viabilidade celular foi avaliada pelo método do MTT, descrito no item 4.4.2.

Células sem tratamento, expostas ou não ao campo magnético alternado, foram utilizadas como grupos controle. A média das absorbâncias de cada um dos grupos controle foi considerada como 100% de viabilidade e foi utilizada para calcular o percentual de células viáveis após os tratamentos. Os resultados foram obtidos a partir de três experimentos independentes, realizados em triplicata.

As concentrações de NCMagh-SE utilizadas neste experimento foram definidas com base na avaliação da citotoxicidade descrita no item 4.4.2., porém levando-se em consideração que o tempo de exposição à amostra NCMagh-SE neste experimento foi menor (apenas de 4 horas), o que possivelmente promoveria menor toxicidade.

4.5. EXPERIMENTOS *IN VIVO*

4.5.1. Animais

Neste estudo foram utilizados camundongos fêmeas isogênicos, da linhagem BALB/c (Figura 5), com 12 semanas de idade, fornecidos pelo biotério do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. Durante a fase experimental, os animais foram mantidos no Biotério do Laboratório Nanogen, da Universidade de Brasília, em ambiente com temperatura controlada (25°C), com ciclo claro/escuro de 12 horas, recebendo ração balanceada e água potável.



Figura 5: Camundongos BALB/c fêmeas.

Todos os procedimentos experimentais realizados durante este estudo estão em acordo com o Comitê de Ética no Uso Animal (CEUA) do Instituto de Ciências Biológicas (IB) da Universidade de Brasília – CEUA/63 – IB – UnB.

4.5.2. Transplante das células tumorais

O transplante de células tumorais nos camundongos foi realizado utilizando-se células de adenocarcinoma mamário murino (4T1). Esta linhagem é um dos poucos modelos celulares com capacidade de desenvolver metástases nos mesmos locais afetados pelo câncer de mama em humanos (PULASKI; OSTRAND-

ROSENBERG, 2001). As células 4T1 foram descongeladas e mantidas em cultura duas semanas antes do transplante.

O transplante ortotópico autólogo das células foi realizado na primeira glândula mamária abdominal esquerda (Figura 6), injetando-se subcutaneamente 50 μL de suspensão celular, contendo 2×10^4 células, em meio de cultura DMEM sem soro fetal bovino. Este procedimento foi realizado em animais anestesiados com 100 μL de solução de ketamina (aproximadamente 10 mg/Kg) e xilazina (aproximadamente 80 mg/Kg) injetada intraperitonealmente.

O método de indução tumoral utilizado neste trabalho foi previamente validado por Carneiro (2011).



Figura 6: Local do transplante ortotópico de células 4T1. A inoculação das células foi realizada na primeira glândula mamária abdominal esquerda, em camundongos BALB/c.

4.5.3. Grupos de tratamento

Os estudos *in vivo* foram realizados em duas etapas, sendo que em cada etapa os animais foram divididos em diferentes grupos de tratamento, conforme descrito no itens 4.5.3.1 e 4.5.3.2.

4.5.3.1. Etapa 1 - Avaliação da toxicidade e do efeito antitumoral do tratamento com NCMagh-SE associado ou não à administração de quimioterápico Paclitaxel

Após 7 dias da indução do tumor e constatado o seu desenvolvimento, os animais foram divididos em grupos (n=6) de tratamento, conforme demonstrado na Figura 7. Todos os procedimentos foram realizados em animais anestesiados com solução de ketamina e xilazina.

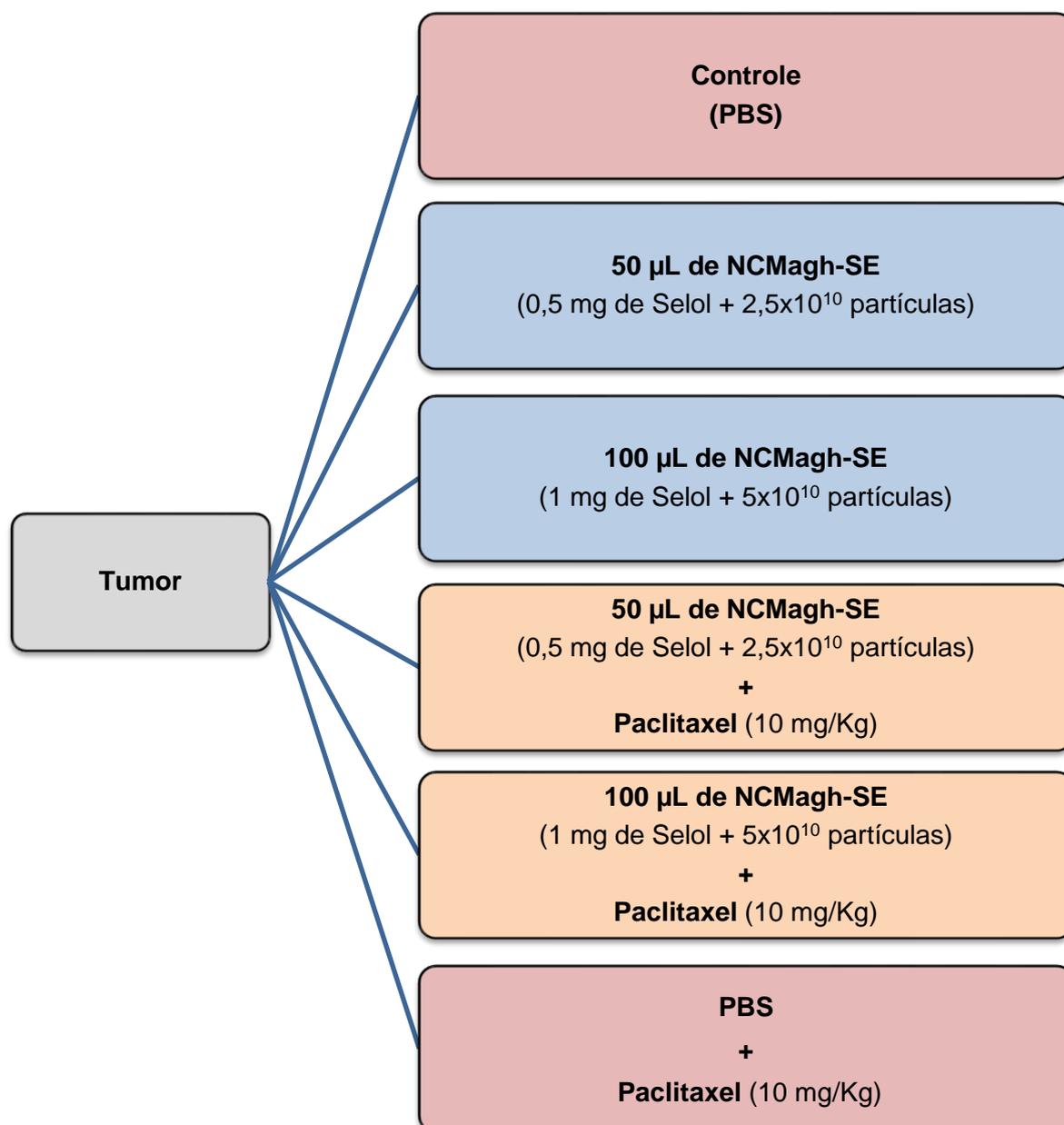


Figura 7: Grupos de tratamento (n=6) testados na Etapa 1 dos experimentos *in vivo*.

A amostra NCMagh-SE foi administrada, via intratumoral, injetando-se 50 μL (0,5 mg de Selol + $2,5 \times 10^{10}$ partículas) ou 100 μL (1 mg de Selol + 5×10^{10} partículas), a cada três dias, totalizando cinco aplicações. A dose de 1 mg de Selol + 5×10^{10} partículas foi escolhida com base nos estudos de Jastrzebski *et al.* (1995, 1997), que avaliou a toxicidade do Selol em ratos. Além disso, era possível injetar no máximo 100 μL de NCMagh-SE, via intratumoral, sem que a amostra extravasasse. A administração de 0,5 mg de Selol + $2,5 \times 10^{10}$ foi escolhida para se avaliar o efeito da dose no tratamento.

O tratamento quimioterápico foi realizado utilizando-se Paclitaxel, um agente antineoplásico utilizado em vários tipos de câncer, inclusive no câncer de mama metastático (SOMA *et al.*, 2009; HUANG *et al.*, 2010). Nesta etapa, o quimioterápico Paclitaxel (Taxilan®, Bergamo) foi administrado na veia da cauda, na concentração aproximada de 10 mg/Kg, a cada 6 dias, totalizando 3 aplicações.

Como controle foram utilizados camundongos que receberam injeção intratumoral e intravenosa de PBS, com o objetivo de submeter os animais ao mesmo tipo de estresse dos outros grupos.

Após 22 dias da inoculação do tumor, os animais foram anestesiados para coleta de sangue e posteriormente eutanasiados por deslocamento cervical para a coleta dos órgãos e do tumor.

O cronograma de transplante das células, do tratamento e da eutanásia dos animais da Etapa 1, está ilustrado na Figura 8.

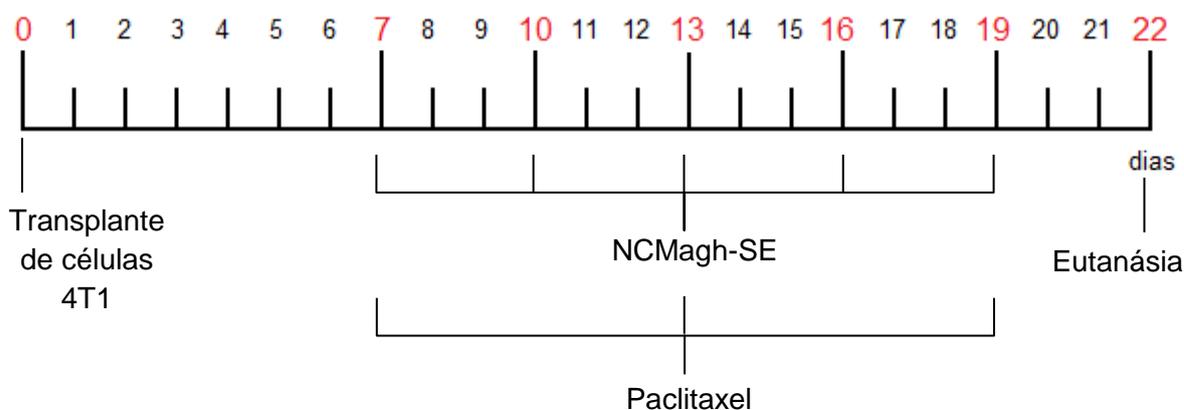


Figura 8: Cronograma de transplante de células, tratamentos e eutanásia dos camundongos utilizados na Etapa 1.

4.5.3.2. Etapa 2 - Avaliação da toxicidade e do efeito antitumoral do tratamento concomitante com NCMagh-SE e com quimioterápico Paclitaxel, associado à exposição ao campo magnético alternado

Nesta etapa foi realizado um teste piloto em camundongos portadores de adenocarcinoma mamário, divididos em 4 grupos de tratamento (n=3), conforme o esquema apresentado na Figura 9. Todos os procedimentos foram realizados em animais anestesiados com solução de xilazina e ketamina.

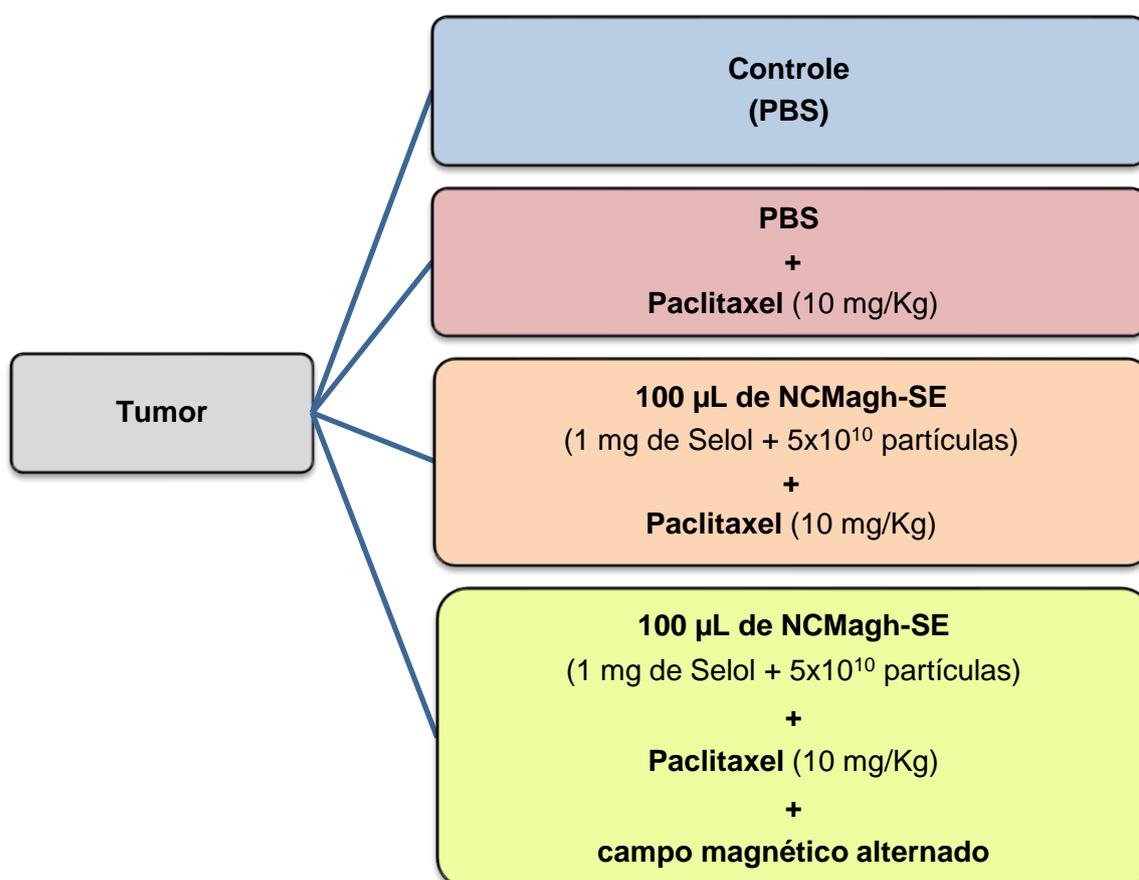


Figura 9: Grupos de tratamento (n=3) testados na Etapa 2 dos experimentos *in vivo*.

Os tratamentos foram iniciados após 10 dias do transplante das células tumorais, após constatado o desenvolvimento do tumor.

A amostra NCMagh-SE foi administrada, via intratumoral, injetando-se 100 µL (1 mg de Selol + 5×10^{10} partículas), a cada três dias, totalizando 4 aplicações. Esta concentração foi definida a partir dos resultados da Etapa 1 desta pesquisa.

Na Etapa 2, o Paclitaxel foi administrado via intratumoral, devido às dificuldades constatadas na Etapa 1 para aplicação endovenosa deste quimioterápico. O Paclitaxel foi administrado duas vezes, com intervalo de 6 dias entre as aplicações, na concentração de 10 mg/Kg.

Como controle foram utilizados camundongos que receberam injeção intratumoral de PBS, com o objetivo de submeter os animais ao mesmo tipo de estresse dos outros grupos.

A aplicação do campo magnético alternado foi realizada utilizando-se o mesmo equipamento descrito no item 4.4.6. Após cada aplicação da amostra NCMagh-SE, os camundongos eram expostos ao campo magnético alternado por 10 minutos. Os animais eram posicionados de forma que a ponta do equipamento ficasse encostada no animal, exatamente no local do tumor.

Após 22 dias da inoculação do tumor, os animais foram anestesiados para coleta de sangue e posteriormente sacrificados por deslocamento cervical para a coleta dos órgãos, da medula óssea e do tumor.

O cronograma utilizado na Etapa 2 para transplante das células, tratamentos e eutanásia dos animais, está ilustrado na Figura 10.

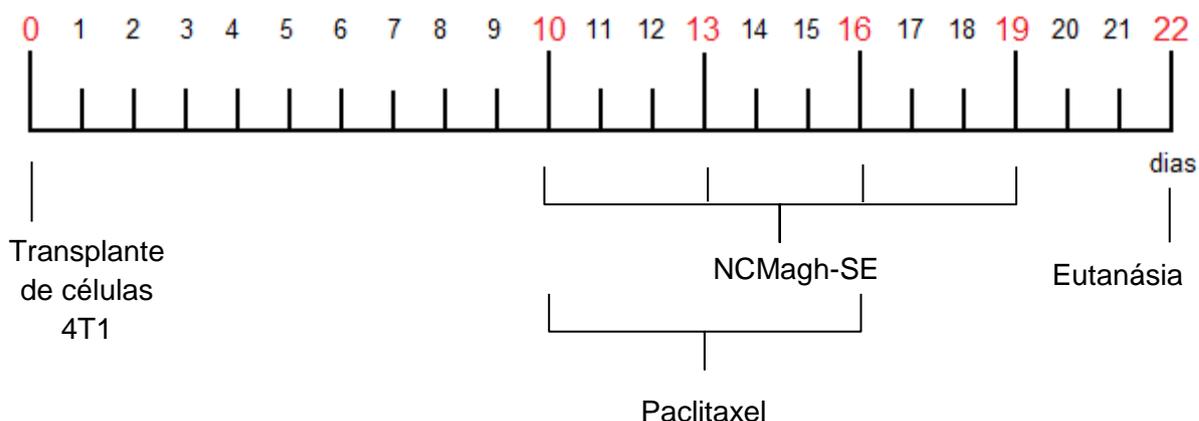


Figura 10: Cronograma de transplante de células, tratamentos e eutanásia dos camundongos utilizados na Etapa 2.

4.5.4. Avaliação clínica dos animais

Os animais foram observados para avaliar os aspectos físicos gerais, crescimento tumoral, peso e comportamento durante todo o período de tratamento.

Foi também pesada a quantidade de ração e o volume de água oferecida aos animais, para avaliação de possíveis alterações no aspecto físico dos animais e no ganho de peso.

Os animais foram pesados, em balança digital, com o objetivo de determinar a alteração de peso conforme a progressão tumoral e o tratamento utilizado. As pesagens foram realizadas antes de cada tratamento e da eutanásia dos animais. Na etapa 2, os animais também foram pesados no dia do transplante das células tumorais.

Após retirada cirúrgica do tumor, os mesmos foram pesados em balança digital e o volume tumoral foi estimado pela mensuração dos tumores com auxílio de um paquímetro digital. O volume foi calculado conforme Yazdi *et al.* (2012), utilizando-se a fórmula $V = 0,5 \times d^2 \times D$, onde d é o diâmetro menor e D , o diâmetro maior.

4.5.5. Análises hematológicas e bioquímicas

As análises hematológicas e bioquímicas foram utilizadas para avaliar a toxicidade dos tratamentos realizados. Para estas análises, aproximadamente 1 mL de sangue foi coletado por punção cardíaca. Uma parte do sangue (aproximadamente 200 μ L) foi transferida para microtubos contendo anticoagulante EDTA (10%) e imediatamente submetido à análise hematológica. O restante do sangue foi centrifugado, por 5 minutos a 4000 rpm, para separação do soro sangüíneo e este foi congelado a -20°C para realização das análises bioquímicas.

O hemograma foi realizado utilizando-se um hematocômetro veterinário automático (pocH -100iV Diff, Sysmex, Brasil) calibrado para camundongos. Foram avaliados os seguintes parâmetros hematológicos: (1) leucograma: leucócitos totais, número e percentual de linfócitos, neutrófilos, monócitos e eosinófilos; (2) eritrograma: número de células vermelhas, hematócrito, VCM (Volume Corpuscular Médio), HCM (Hemoglobina Corpuscular Média), CHCM (Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média), RDW (amplitude ou variação da distribuição do tamanho dos eritrócitos); e (3) número de plaquetas.

A análise bioquímica do soro foi realizada pelo Laboratório Sabin, mediante parceria. Os aparelhos utilizados foram calibrados para dosagens em animais de

pequeno porte. Nas amostras de soro sanguíneo dos animais utilizados na Etapa 1 foram dosadas as enzimas aspartato transaminases (AST), alanina transaminases (ALT), bilirrubina total e frações, e uréia. Além destas mesmas dosagens, o soro dos animais da Etapa 2 foram medidos os níveis de gama-glutamil transferase (GGT), fosfatase alcalina e creatinina.

4.5.6. Análise genotóxica

A ação genotóxica foi avaliada por meio da análise de fragmentação do DNA em eritrócitos da medula óssea (CARNEIRO, 2011). Esta análise foi realizada apenas nos camundongos tratados na Etapa 2.

Para essas análises, os fêmures foram removidos e as epífises cortadas para expor a medula óssea, que foi retirada pela introdução de uma agulha acoplada à seringa, contendo 1 mL de soro fetal bovino. O material foi homogeneizado e centrifugado por 5 minutos a 2500 rpm. O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi ressuspensão em 50 µL de SFB. Desta suspensão celular, 40 µL foram fixados em etanol 70% e congelados a -20°C. Este material foi submetido à análise de fragmentação celular por citometria de fluxo, seguindo o mesmo protocolo utilizado no experimento *in vitro* (item 4.4.5.).

4.5.7. Análises histológicas dos órgãos e do tumor

A análise histológica foi realizada somente na Etapa 1.

Os órgãos fígado, pulmões, baço, coração, rins e cérebro, de animais controles tratados com solução salina ou tratados com 50 µL e 100 µL de NCMagh-SE, foram coletados para avaliação da toxicidade dos tratamentos. Foi verificado o aspecto geral dos órgãos, a presença de aglomerados de nanopartículas magnéticas e a ocorrência de metástases.

Para avaliação do efeito antitumoral dos diversos tratamentos, os tumores de todos os animais tratados na Etapa 1, foram coletados. Foi observada a ocorrência de necrose no tecido tumoral e a presença de aglomerados de nanopartículas magnéticas.

Os órgãos foram fixados em solução de Davidson (1 mL de ácido acético adicionado a 9 mL de solução estoque composta por 40mL de glicerina, 80 mL de formol 40%, 120 mL de etanol 95% e 120 mL de água destilada) por 12 horas a 4°C, enquanto que os tumores foram fixados em solução de paraformaldeído 4% por 6 horas. Após fixação, o tumor e os fragmentos dos órgãos foram desidratados em soluções alcoólicas crescentes (de 70 a 100%), diafanizados em xileno e incluídos em parafina usando histotécnico (OMA, modelo DM-40, Brasil).

Os blocos foram seccionados em micrótomo Leica RM2235 manual (Leica Microsystems, Alemanha), tendo sido realizados cortes semi-seriados de 5 µm. Foram preparadas seis lâminas de cada um dos blocos contendo o tumor, enquanto que para os blocos contendo fragmentos dos órgãos, foram confeccionadas três lâminas. Cada lâmina continha três ou quatro cortes, que foram corados pelo método de hematoxilina-eosina (HE), para visualização do citoplasma e do núcleo. Lâminas dos tumores também foram coradas pelo método de Perls, para avaliação da presença de aglomerados de ferro.

4.6. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As análises estatísticas foram feitas com o software SPSS (*Statistical Package for the Social Sciences*), versão 19. Os resultados encontrados foram submetidos ao teste de Shapiro-Wilk, para verificar se os dados apresentavam distribuição normal. Os dados que apresentaram distribuição normal foram submetidos ao teste de análise de variância simples (One-way ANOVA), para verificar a ocorrência de grupos diferentes estatisticamente; e ao teste post-hoc de Tukey, para identificar quais grupos eram estatisticamente diferentes entre si. Os dados que não apresentavam distribuição normal foram submetidos ao teste de Kruskal-Wallis, para verificação de diferenças entre as variáveis, e ao teste de Mann-Whitney, para verificar diferenças entre os grupos de tratamento. As diferenças foram consideradas significativas para valores de $p < 0,05$. Os dados foram expressos como média \pm EPM (erro padrão da média).

5. RESULTADOS

5.1. CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS

5.1.1. Caracterização por Microscopia Eletrônica de Transmissão e Varredura

A amostra de nanocápsulas magnéticas de Selol (NCMagh-SE), quando analisada por microscopia eletrônica (Figura 11), apresentou nanocápsulas com formato arredondado, tamanhos variados e com núcleo elétron-denso devido à presença de nanopartículas magnéticas localizadas, tanto no interior, quanto na superfície das nanocápsulas. O diâmetro médio das nanocápsulas da amostra NCMagh-SE ($235,8 \text{ nm} \pm 57,8 \text{ nm}$) (Figura 11-D) foi determinado por meio da contagem de pelo menos 300 nanoestruturas.

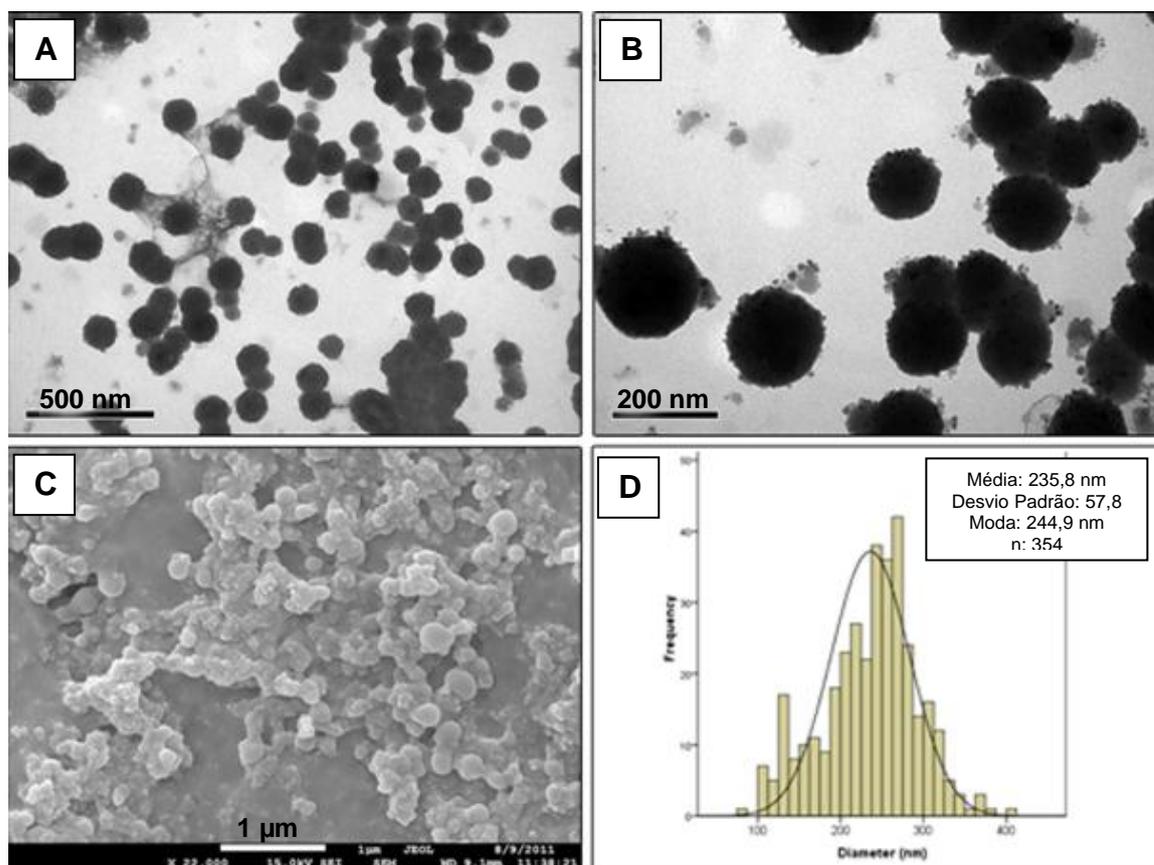


Figura 11: Caracterização morfológica e mensuração de NCMagh-SE. (A e B) Fotomicrografias eletrônicas de transmissão de NCMagh-SE; (C) fotomicrografia eletrônica de varredura de NCMagh-SE; (D) histograma da distribuição dos diâmetros de NCMagh-SE.

Durante a análise por MET da amostra NCMagh-SE, foi verificada a presença de poucas nanopartículas de maghemita dispersas fora das nanocápsulas. Estas nanopartículas foram fotomicrografadas (Figura 12-A) e o diâmetro médio ($10,0 \text{ nm} \pm 2,5 \text{ nm}$) foi calculado a partir da contagem de mais de 300 nanopartículas (Figura 12-B).

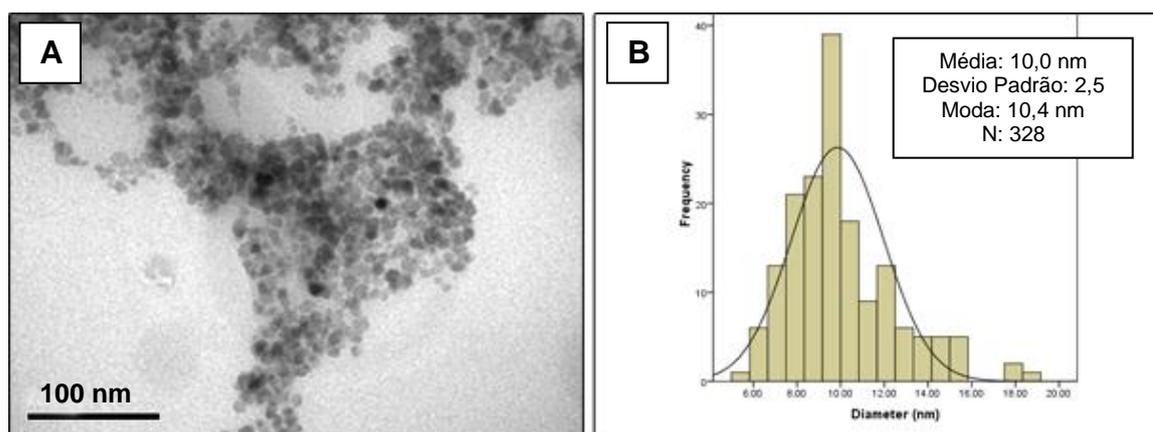


Figura 12: Caracterização das nanopartículas de maghemita dispersas na amostra NCMagh-SE. (A) Fotomicrografia eletrônica de transmissão das nanopartículas de maghemita dispersas na amostra NCMagh-SE; (B) histograma da distribuição dos diâmetros das nanopartículas de maghemita.

Para comparação, a morfologia das nanocápsulas magnéticas (NCMagh) e das nanocápsulas de Selol (NCSE) também foram avaliadas por MET. Diferentemente da amostra NCMagh-SE, a amostra NCMagh estava aparentemente desestabilizada, apresentando-se aglomerada e com partículas de maghemita localizadas principalmente na superfície das nanocápsulas (Figura 13).

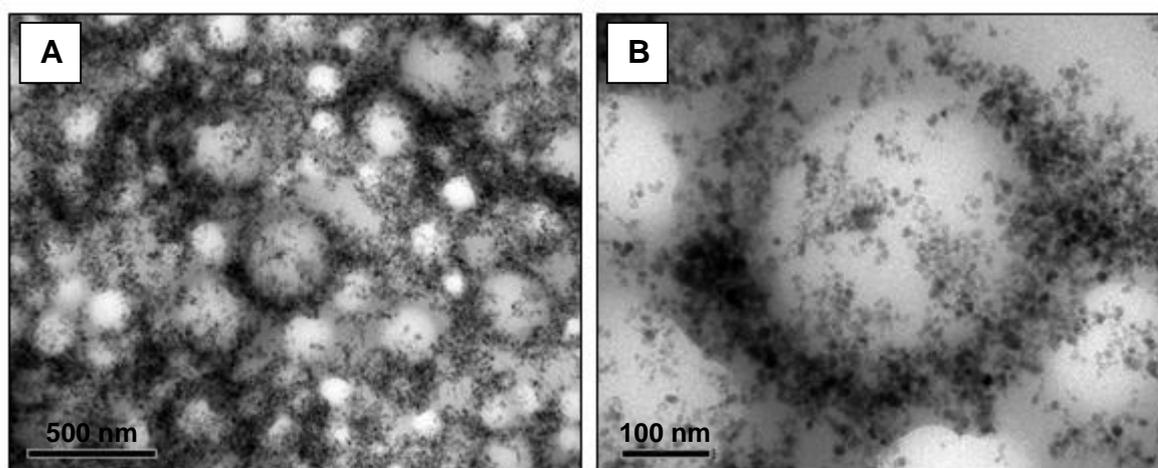


Figura 13: Fotomicrografias eletrônicas de transmissão da amostra NCMagh. A figura mostra nanopartículas localizadas mais próximas da superfície das nanocápsulas.

As nanocápsulas de PLGA contendo somente Selol (NCSE) apresentaram-se arredondadas, distribuídas individualmente e com pouco contraste nas análises por MET (dados não mostrados), uma vez que não foram submetidas à contrastação .

5.1.2. Caracterização por Espalhamento de Luz Dinâmica (DLS) e Zeta-sizer

O diâmetro hidrodinâmico das nanocápsulas foi avaliado por DLS, enquanto que a carga de superfície e a estabilidade da amostra foi avaliada por meio da medição do potencial zeta. Os resultados encontrados estão apresentados na Tabela 2.

As nanocápsulas de NCMagh-SE apresentaram diâmetro hidrodinâmico (244.10 nm) próximo ao diâmetro médio observado nas análises por MET (235,83 nm). As nanocápsulas de NCMagh apresentaram diâmetro aproximadamente 4 vezes maior do que as nanocápsulas das amostras NCMagh-SE e NCSE. Diferentemente de NCMagh-SE e NCSE, a amostra NCMagh apresentou-se altamente polidispersa nas análises por DLS, como pôde ser observado pelo índice de polidispersividade (PDI).

Em relação ao potencial zeta, com exceção de NCMagh-SE, todas as amostras apresentaram carga negativa.

Tabela 2. Caracterização das nanocápsulas por DLS e Zetasizer.

Amostras	NCMagh-SE	NCMagh	NCSE
Diâmetro médio (nm)	244,10 ± 2,32	948,50 ± 109,20	212,50 ± 3,15
PDI	0,23 ± 0,01	0,87 ± 0,07	0,31 ± 0,02
Potencial Zeta (mV)	20,10 ± 0,70	-11,70 ± 0,57	-28,60 ± 0,80
pH	7,4	7,5	7,0

Os dados representam a média ± EPM de três diferentes análises de cada amostra, com ângulo de difração de 173°, a 25°C. PDI - índice de polidispersividade.

5.2. EXPERIMENTOS *IN VITRO*

Os experimentos *in vitro* foram realizados utilizando-se células normais de mama (MCF-10A) e de adenocarcinoma mamário murino (4T1) e humano (MCF-7). As células foram tratadas com nanocápsulas magnéticas de Selol (NCMagh-SE) e, como controle, foram utilizadas nanocápsulas magnéticas (NCMagh) e nanocápsulas de Selol (NCSE). As células foram submetidas ao tratamento com diferentes concentrações, conforme a Tabela 1 - Materiais e Métodos.

5.2.1. Avaliação da citotoxicidade induzida pelo tratamento com NCMagh-SE e seus controles (NCMagh e NCSE)

O experimento do MTT foi realizado para avaliar a citotoxicidade de NCMagh-SE e seus controles, NCMagh e NCSE, e o efeito da dose e do tempo de tratamento na viabilidade celular.

Como descrito na Figura 14, o tratamento das células de carcinoma mamário murino (linhagem 4T1) com NCMagh-SE e seus controles (NCMagh e NCSE) diminuiu a viabilidade celular em todas as concentrações testadas, de maneira estatisticamente significativa em relação ao grupo controle sem tratamento. O tratamento com NCMagh-SE, nas concentrações de 25 µg/mL de Selol + $1,25 \times 10^9$ partículas/mL (1X) a 100 µg/mL de Selol + 5×10^9 partículas/mL (4X), reduziu em aproximadamente 38% o percentual de células viáveis em relação ao grupo sem tratamento, após 24 horas de exposição à amostra. Além disso, a citotoxicidade induzida pelas concentrações mais altas (8X e 16X), de todas as amostras nanoestruturadas, foi dose e tempo dependente. Não foi observada diferença estatística na viabilidade celular entre os grupos tratados com as amostras magnéticas (NCMagh-SE e NCMagh) em todas as concentrações testadas. Ainda que todas as concentrações testadas de NCSE tenham induzido redução significativa na viabilidade celular, em relação ao grupo controle sem tratamento, a amostra NCSE foi menos citotóxica do que as nanocápsulas magnéticas de Selol (NCMagh-SE), principalmente quando as concentrações mais altas (4X a 16X) foram avaliadas.

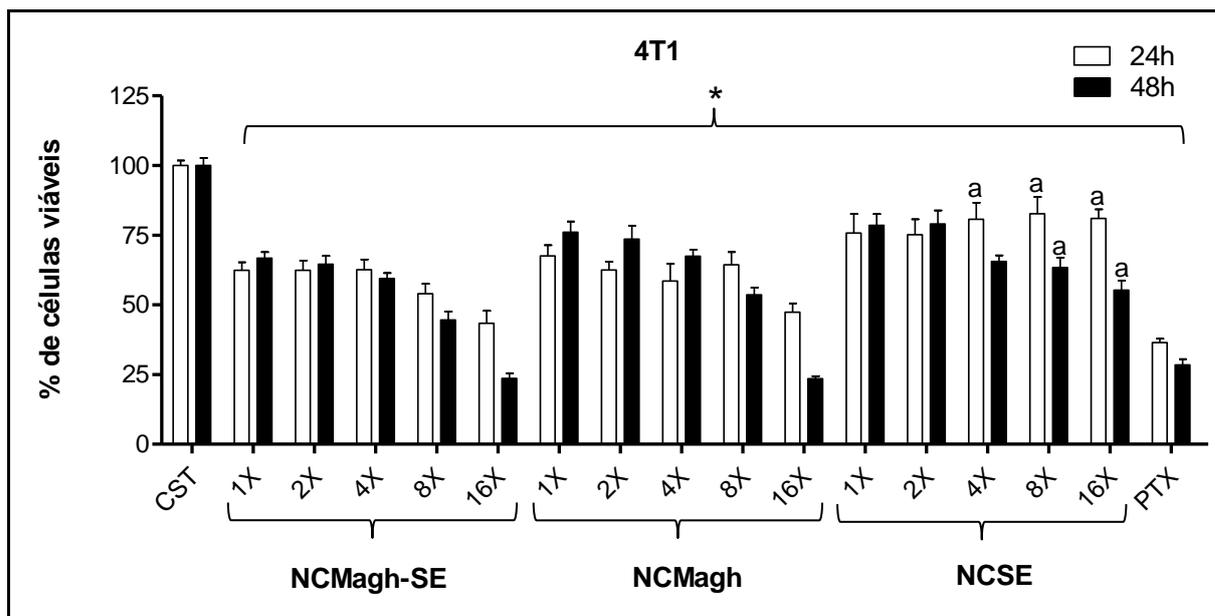


Figura 14: Análise da viabilidade celular da linhagem 4T1, após 24 e 48 horas de exposição a diferentes tratamentos. NCMagh-SE - nanocápsulas magnéticas de Selol; NCMagh - nanocápsulas magnéticas; NCSE - nanocápsulas de Selol; CST - controle sem tratamento; PTX - 40 $\mu\text{g/mL}$ de Paclitaxel. 1X - 25 $\mu\text{g/mL}$ de Selol e/ou $1,25 \times 10^9$ partículas/mL; 2X - 50 $\mu\text{g/mL}$ de Selol e/ou $2,5 \times 10^9$ partículas/mL; 4X - 100 $\mu\text{g/mL}$ de Selol e/ou 5×10^9 partículas/mL; 8X - 200 $\mu\text{g/mL}$ de Selol e/ou 1×10^{10} partículas/mL; 16X - 400 $\mu\text{g/mL}$ de Selol e/ou 2×10^{10} partículas/mL. * indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle sem tratamento; "a" indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo tratado com NCMagh-SE na mesma concentração; $p < 0,05$. As barras correspondem à média \pm EPM de três experimentos independentes, realizados em triplicata.

Assim como nas células de adenocarcinoma mamário murino (4T1, Figura 14), o tratamento com NCMagh-SE, NCMagh e NCSE reduziu a viabilidade das células de adenocarcinoma mamário humano (MCF-7), em todas as concentrações, como pode ser observado na Figura 15. Entretanto, diferentemente de 4T1, as células MCF-7 foram menos susceptíveis aos efeitos citotóxicos induzidos pelo quimioterápico Paclitaxel. As concentrações mais altas de todas as amostras nanoestruturadas testadas (8X e 16X) foram inclusive mais citotóxicas do que o quimioterápico Paclitaxel (40 $\mu\text{g/mL}$) utilizado como controle positivo.

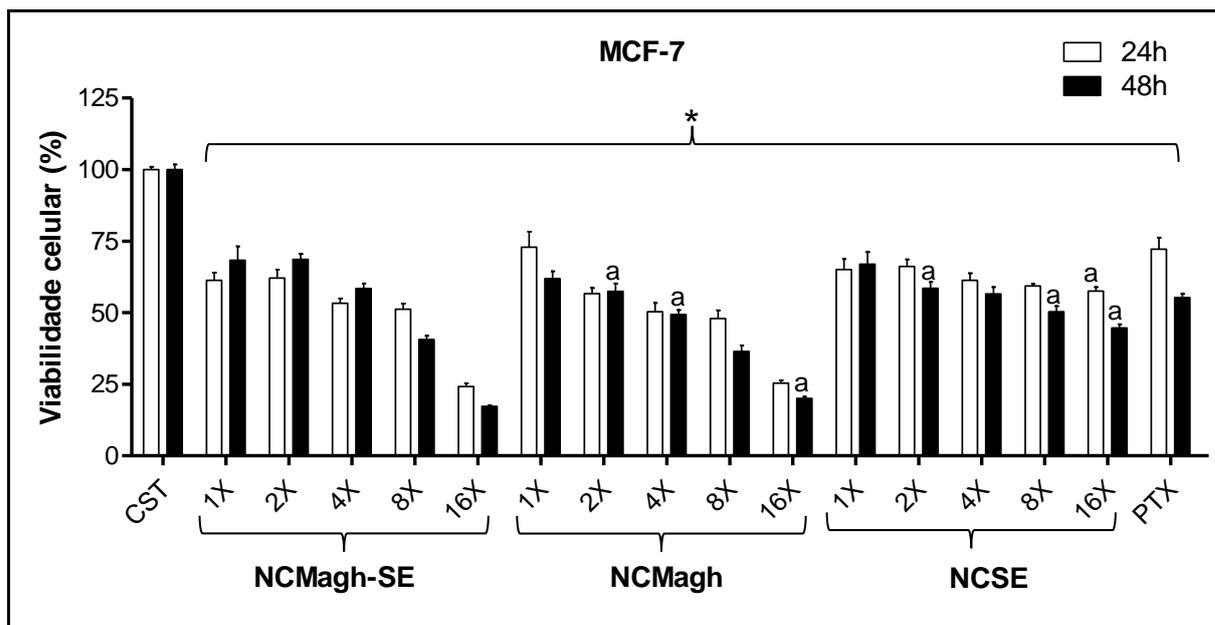


Figura 15: Análise da viabilidade celular da linhagem MCF-7, após 24 e 48 horas de exposição a diferentes tratamentos. NCMagh-SE - nanocápsulas magnéticas de Selol; NCMagh - nanocápsulas magnéticas; NCSE - nanocápsulas de Selol; CST - controle sem tratamento; PTX - 40 $\mu\text{g/mL}$ de Paclitaxel. 1X - 25 $\mu\text{g/mL}$ de Selol e/ou $1,25 \times 10^9$ partículas/mL; 2X - 50 $\mu\text{g/mL}$ de Selol e/ou $2,5 \times 10^9$ partículas/mL; 4X - 100 $\mu\text{g/mL}$ de Selol e/ou 5×10^9 partículas/mL; 8X - 200 $\mu\text{g/mL}$ de Selol e/ou 1×10^{10} partículas/mL; 16X - 400 $\mu\text{g/mL}$ de Selol e/ou 2×10^{10} partículas/mL. * indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle sem tratamento; "a" indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo tratado com NCMagh-SE na mesma concentração; $p < 0,05$. As barras correspondem à média \pm EPM de três experimentos independentes, realizados em triplicata.

Diferentemente das linhagens tumorais, a exposição às amostras magnéticas NCMagh-SE e NCMagh, por 24 e 48 horas, reduziu a viabilidade das células normais de mama (MCF-10A, Figura 16) somente nas concentrações mais altas (4X a 16X). A citotoxicidade observada foi dose e tempo dependente. Ainda que após 24 horas de exposição as concentrações mais baixas de NCMagh-SE, de 25 $\mu\text{g/mL}$ de Selol + $1,25 \times 10^9$ partículas/mL (1X) e 50 $\mu\text{g/mL}$ de Selol + $2,5 \times 10^9$ partículas/mL (2X), tenham reduzido de maneira estatisticamente significativa a viabilidade celular em relação às células sem tratamento, depois de 48 horas houve um aumento na viabilidade das células atingindo em média 99,9% e 91,4%, respectivamente para as concentrações 1X e 2X. Estes valores foram similares aos do grupo controle sem tratamento. Além disso, o tratamento com o NCMagh-SE, nas concentrações de 8X e 16X, foi menos citotóxico do que NCMagh nas mesmas concentrações. Em relação à amostra NCSE, esta foi citotóxica somente após 48 horas de exposição às concentrações mais altas, de 8X e 16X.

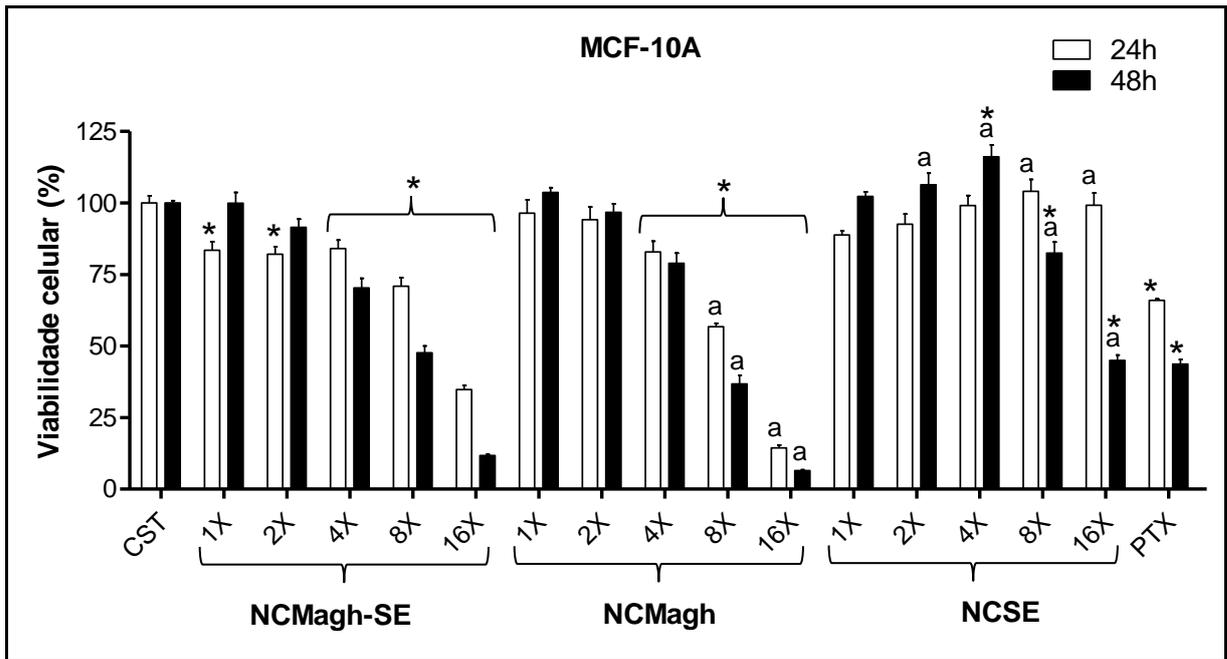


Figura 16: Análise da viabilidade celular da linhagem MCF-10A, após 24 e 48 horas de exposição a diferentes tratamentos. NCMagh-SE - nanocápsulas magnéticas de Selol; NCMagh - nanocápsulas magnéticas; NCSE - nanocápsulas de Selol; CST - controle sem tratameto; PTX - 40 $\mu\text{g/mL}$ de Paclitaxel. 1X - 25 $\mu\text{g/mL}$ de Selol e/ou $1,25 \times 10^9$ partículas/mL; 2X - 50 $\mu\text{g/mL}$ de Selol e/ou $2,5 \times 10^9$ partículas/mL; 4X - 100 $\mu\text{g/mL}$ de Selol e/ou 5×10^9 partículas/mL; 8X - 200 $\mu\text{g/mL}$ de Selol e/ou 1×10^{10} partículas/mL; 16X - 400 $\mu\text{g/mL}$ de Selol e/ou 2×10^{10} partículas/mL. * indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle sem tratamento; "a" indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo tratado com NCMagh-SE na mesma concentração; $p < 0,05$. As barras correspondem à média \pm EPM de três experimentos independentes, realizados em triplicata.

A partir dos resultados do teste do MTT, foi determinada a concentração de NCMagh-SE necessária para inibir o crescimento de cada linhagem celular em 50% (IC_{50}) (Tabela 3). Como observado nesta tabela, as células tumorais (4T1 e MCF-7) são mais sensíveis ao tratamento com NCMagh-SE do que as células normais (MCF-10A). No entanto, o aumento do tempo de incubação das células normais com NCMagh-SE aumenta de maneira significativa a sensibilidade das mesmas ao tratamento.

Tabela 3: Distribuição dos valores de IC₅₀ e seus respectivos intervalos de confiança (95%) em células 4T1, MCF-7 e MCF-10A, após o tratamento com nanocápsulas magnéticas de Selol (NCMagh-SE).

Linhagens celulares	IC ₅₀ (intervalo de confiança - 95%) (µg/mL)	
	24 horas	48 horas
4T1	163,1 (127,4 a 208,8)	121,2 (92,4 a 159,0)
MCF-7	109,4 (78,7 a 151,9)	116,2 (92,6 a 145,9)
MCF-10A	337,3 (301,8 a 377,0)	171,2 (154,7 a 189,5)

Os valores de IC₅₀ foram calculados com base nos dados de viabilidade celular obtidos nos testes de MTT após o tratamento com NCMagh-SE, nas concentrações de 25 µg/mL de Selol + 1,25 x 10⁹ partículas/mL (1X) a 400 µg/mL Selol + 2 x 10¹⁰ partículas/mL (16X).

A Figura 17 apresenta os resultados da análise de citotoxicidade pelo método do MTT, de forma a evidenciar as diferenças na viabilidade celular entre as linhagens 4T1, MCF-7 e MCF-10A, após a exposição por 24 e 48 horas, ao tratamento com a amostra NCMagh-SE e seus controles (NCMagh e NCSE). Como pode ser observado, com raras exceções, os tratamentos, com as diferentes amostras e concentrações, diminuíram a viabilidade de maneira mais intensa nas células tumorais do que nas células normais, de forma dose e tempo dependente.

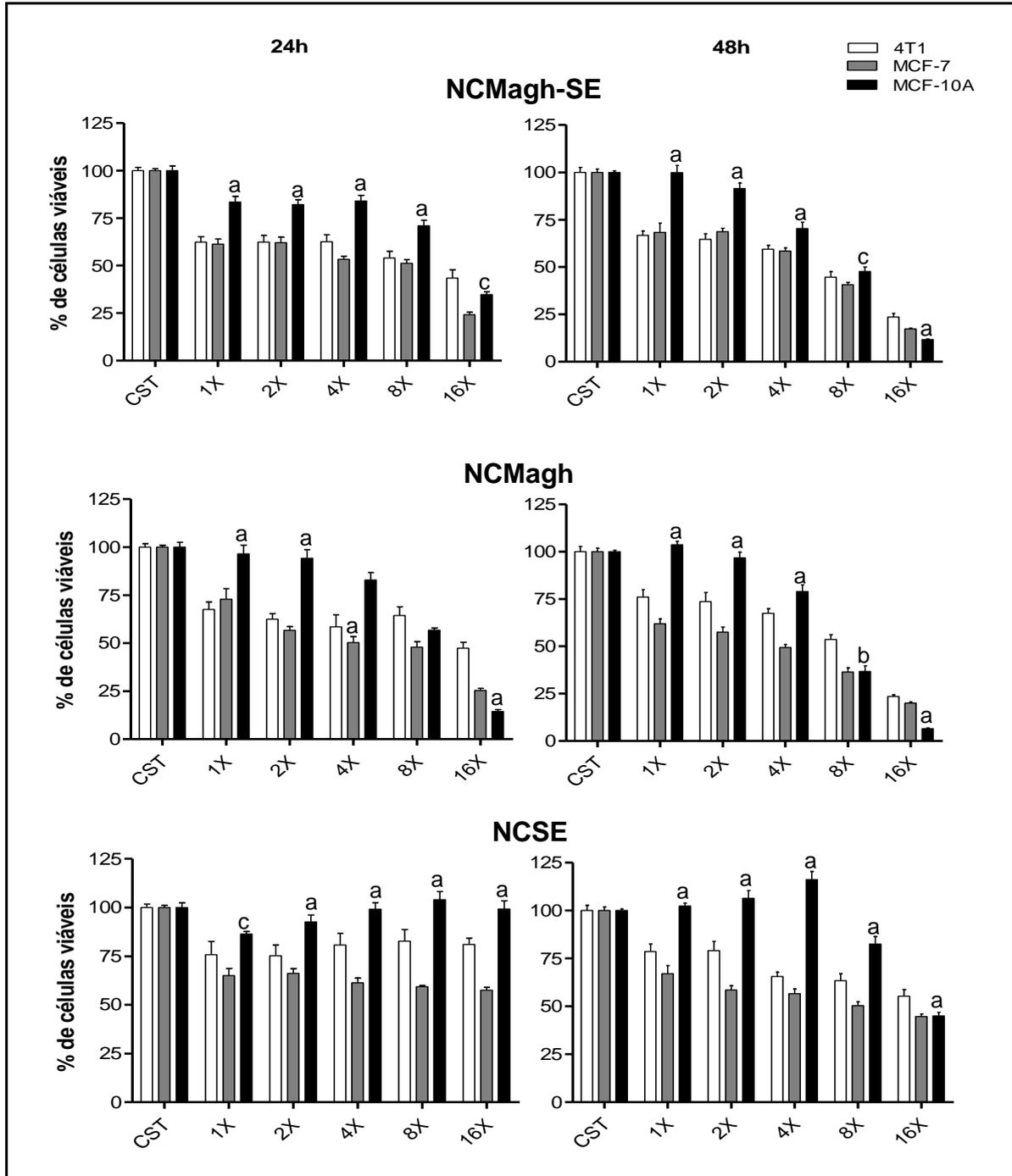


Figura 17: Comparação da viabilidade celular das linhagem 4T1, MCF-7 e MCF-10A, após 24 horas (esquerda) e 48 horas (direita) de exposição a diferentes tratamentos. NCMagh-SE - nanocápsulas magnéticas de Selol; NCMagh - nanocápsulas magnéticas; NCSE - nanocápsulas de Selol; CST - controle sem tratamento. 1X - 25 µg/mL de Selol e/ou $1,25 \times 10^9$ partículas/mL; 2X - 50 µg/mL de Selol e/ou $2,5 \times 10^9$ partículas/mL; 4X - 100 µg/mL de Selol e/ou 5×10^9 partículas/mL; 8X - 200 µg/mL de Selol e/ou 1×10^{10} partículas/mL; 16X - 400 µg/mL de Selol e/ou 2×10^{10} partículas/mL. “a” indica diferença estatisticamente significativa entre a linhagem normal de mama (MCF-10A) e as linhagens de adenocarcinoma mamário (4T1 e MCF-7); “b” indica diferença estatisticamente significativa entre as linhagens MCF-10A e 4T1; “c” indica diferença estatisticamente significativa entre as linhagens MCF-10A e MCF-7; $p < 0,05$. As barras indicam a média \pm EPM de três experimentos independentes, realizados em triplicata.

5.2.2. Avaliação da morfologia celular após tratamento com NCMagh-SE e seus controles (NCMagh e NCSE)

A morfologia das células tumorais (4T1 e MCF-7) e das células normais (MCF-10A) de mama, após a exposição durante 24 e 48 horas às diferentes concentrações (1X a 16X) da amostra NCMagh-SE e de seus controles (NCMagh e NCSE), foi avaliada por microscopia de luz. Porém, devido às diversas lavagens realizadas para retirada do meio de cultura e da amostra, foram observadas apenas as células que permaneciam aderidas à placa de cultura. Possivelmente, por esse motivo, não tenham sido verificadas células com morfologia alterada, uma vez que estas células se desprendem com maior facilidade da placa e são perdidas com as lavagens.

Entretanto, foi observada menor quantidade de células (4T1, MCF-7 e MCF-10A) aderidas às placas, com o aumento das concentrações de NCMagh-SE, NCMagh e NCSE. A Figura 18 exemplifica os resultados encontrados, mostrando aglomerados de nanocompostos magnéticos corados em marrom pelo corante Giemsa (Figura 18-B a E) e quantidade menor de células com o aumento da concentração de NCMagh-SE testada. Nota-se ausência da pigmentação marrom nas células sem tratamento (Figura 18-A) ou tratadas com NCSE (Figura 18-F).

Além disso, por meio da coloração de Perls, que cora componentes de ferro em azul, ficou evidente o acúmulo maior de NCMagh-SE nas células tumorais (4T1 e MCF-7) do que na linhagem normal de mama (MCF-10A), por meio da observação de quantidade maior de agregados azuis nas células tumorais (Figura 19).

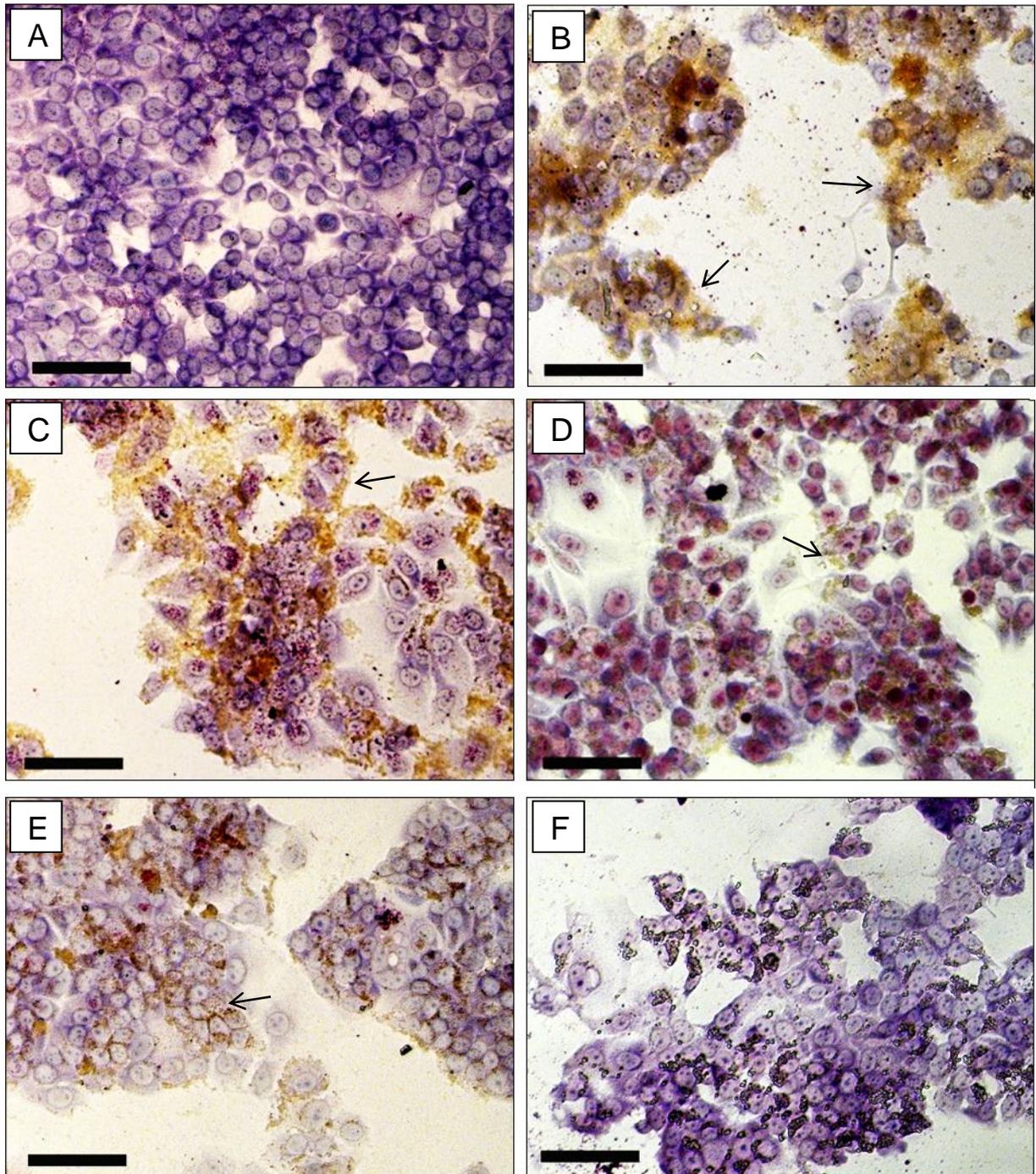


Figura 18: Morfologia das células MCF-7 após 48 horas de exposição a diferentes tratamentos. (A) Células sem tratamento; tratamento com NCMagh-SE: (B) 200 $\mu\text{L}/\text{mL}$ de Selol + 1×10^{10} partículas/mL (8X); (C) 100 $\mu\text{L}/\text{mL}$ de Selol + 5×10^9 partículas/mL (4X); (D) 50 $\mu\text{L}/\text{mL}$ de Selol + $2,5 \times 10^9$ partículas/mL (2X); (E) tratamento com NCMagh (5×10^9 partículas/mL - 4X); (F) tratamento com NCSE (100 $\mu\text{L}/\text{mL}$ de Selol - 4X). Coloração por Giemsa. As setas indicam aglomerados de nanoestruturas magnéticas, que podem ser visualizados pela coloração marrom. As barras indicam 100 μm .

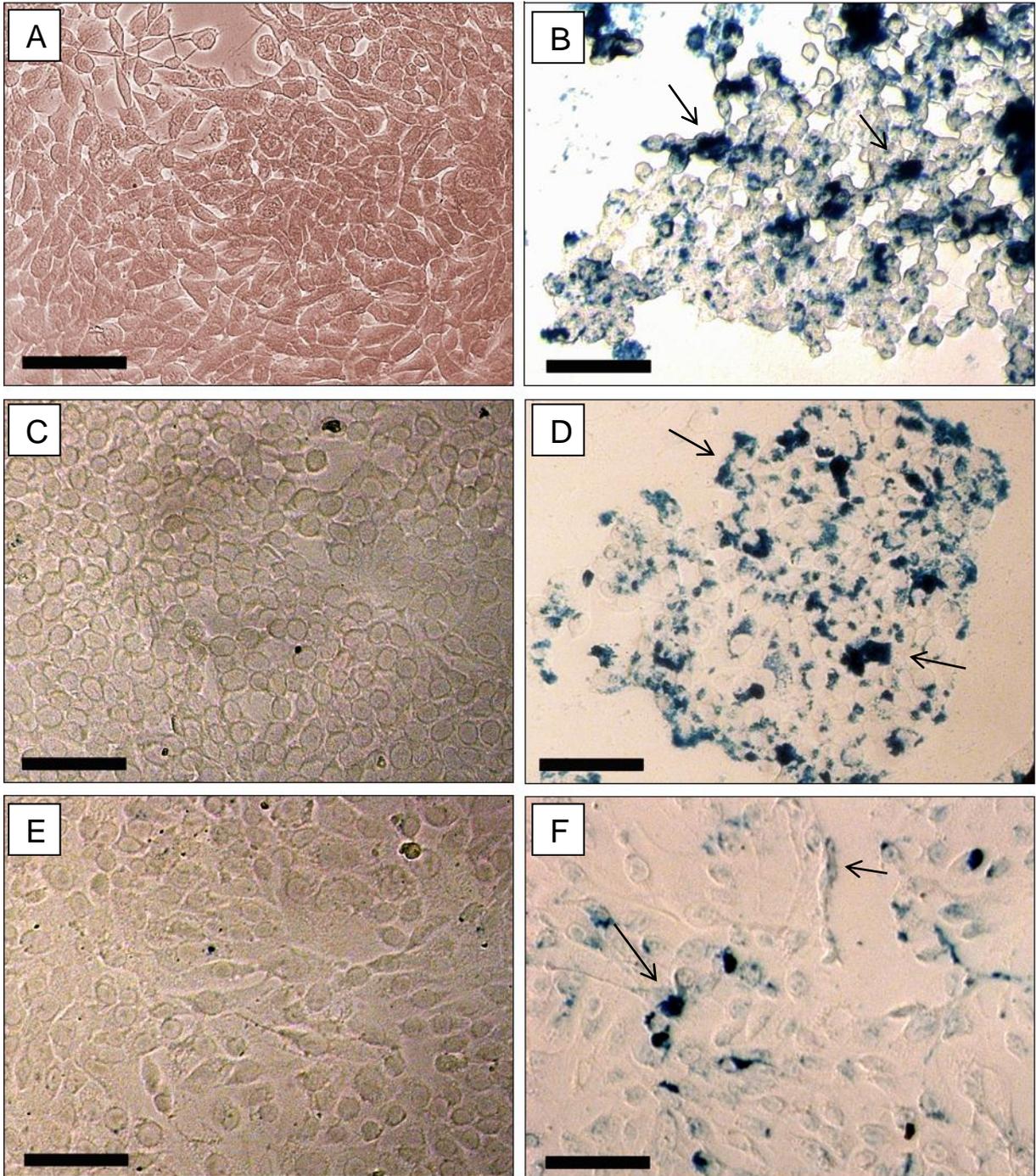


Figura 19: Coloração, pelo método de Perls, das células 4T1 (A e B), MCF-7 (C e D) e MCF-10A (E e F) após 48 horas do tratamento com NCMagh-SE. (A, C e E) células sem tratamento; (B, D e F) tratamento com NCMagh-SE - 100 μL/mL de Selol + 5×10^9 partículas/mL (4X). As setas indicam aglomerados de nanoestruturas magnéticas, que podem ser visualizados pela coloração azul. As barras indicam 100 μm.

5.2.3. Análise do tipo de morte celular induzida por NCMagh-SE e seus controles, NCMagh e NCSE, em células de adenocarcinoma mamário (4T1 e MCF-7)

Como foi verificado, pelo teste do MTT, que o tratamento com NCMagh-SE, NCMagh e NCSE foi citotóxico, resolveu-se verificar se a morte estava ocorrendo por apoptose ou por necrose. Para tal análise, as células tumorais foram tratadas com NCMagh-SE na concentração de 50 µg/mL de Selol + $2,5 \times 10^9$ partículas/mL (2X) e com seus controles (NCMagh - 2X e NCSE - 2X), uma vez que nesta concentração, a exposição por 48 horas à amostra NCMagh-SE induziu redução da viabilidade somente das células tumorais, sem efeito significativo nas células normais. Para avaliação do efeito da dose no tipo de morte celular, as células também foram tratadas com NCMagh-SE na concentração de 200 µg/mL de Selol + 1×10^{10} partículas/mL (8X).

A Figura 20 apresenta o percentual de células marcadas com anexina-V-FITC (células em apoptose) e células marcadas com anexina-V-FITC e iodeto de propídio (células em apoptose tardia). Todos os tratamentos induziram morte celular por apoptose, que foi estatisticamente maior do que a do grupo controle sem tratamento. Não foi verificada presença de células mortas por necrose.

Com observado na Figura 20, a indução de apoptose por NCMagh-SE foi dose dependente nas duas linhagens tumorais. As células tratadas com NCMagh-SE, na concentração de 200 µg/mL de Selol + 1×10^{10} partículas/mL, apresentaram, em média, aproximadamente 7 vezes mais células em processo de apoptose (64,5%) do que as células sem tratamento (8,1%). Inclusive, o percentual de células em apoptose após o tratamento com 200 µg/mL de Selol + 1×10^{10} partículas/mL, tanto nas células 4T1 quanto nas células MCF-7, foi similar ao grupo controle positivo tratado com Paclitaxel.

Na linhagem 4T1, o tratamento com NCMagh-SE (50 µg/mL de Selol + $2,5 \times 10^9$ partículas/mL) causou apoptose em 41,8% das células, resultado similar aos controles NCMagh (40,8%) e NCSE (31,4%). Por outro lado, na linhagem MCF-7, o controle NCMagh (49,4%) induziu maior percentual de células em apoptose do que a amostra NCMagh-SE (34,4%).

Com exceção do tratamento com NCSE, que induziu maior índice de morte celular por apoptose em MCF-7 (44,8%) do que em 4T1 (31,4%), todos os tratamentos foram similares entre as linhagens tumorais.

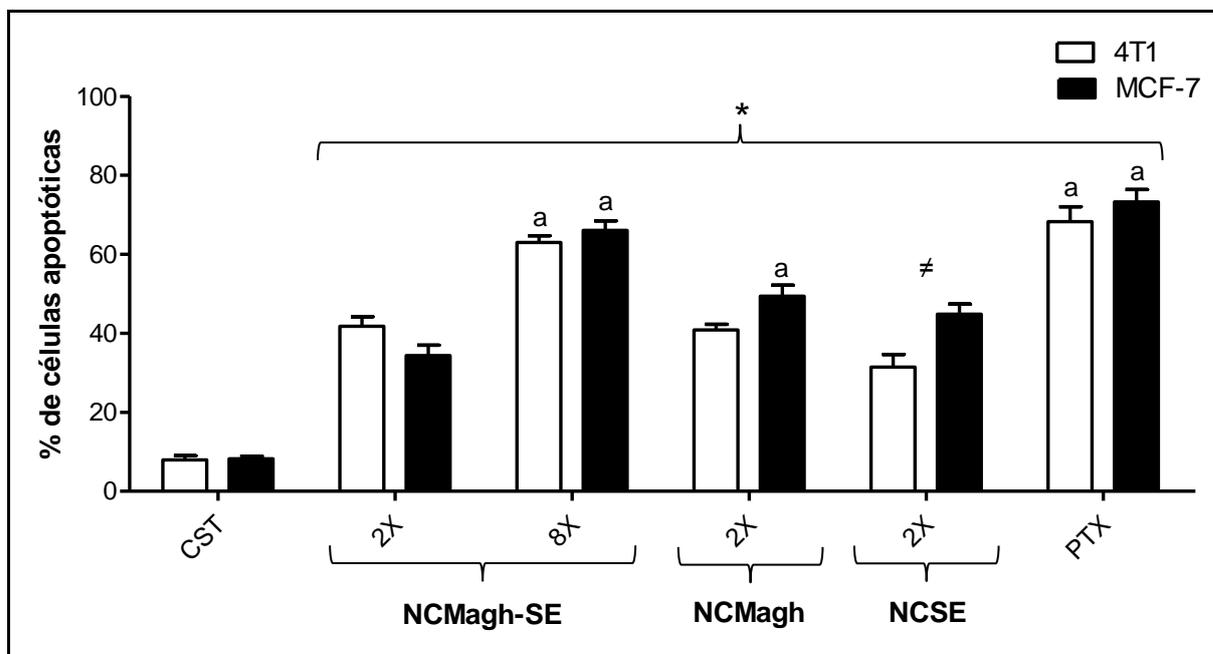


Figura 20: Análise do percentual de células, 4T1 e MCF-7, em apoptose, após 48 horas dos diferentes tratamentos. NCMagh-SE - nanocápsulas magnéticas de Selol; NCMagh - nanocápsulas magnéticas; NCSE - nanocápsulas de Selol; CST – controle sem tratamento; PTX - 40 µg/mL de Paclitaxel. 2X – 50 µg/mL de Selol e/ou $2,5 \times 10^9$ partículas/mL; 8X – 200 µg/mL de Selol e/ou 1×10^{10} partículas/mL. * indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle sem tratamento; ≠ indica diferença estatisticamente significativa entre as duas linhagens; “a” indica diferença estatisticamente significativa em relação a NCMagh-SE-2X; $p < 0,05$. As barras correspondem à média \pm EPM de dois experimentos independentes, realizados em triplicata.

5.2.4. Análise de fragmentação do DNA induzida por NCMagh-SE e seus controles, NCMagh e NCSE, em células de adenocarcinoma mamário (4T1 e MCF-7)

Seguindo os mesmos tratamentos utilizados para análise do tipo de morte celular, foi realizada também a análise de fragmentação do DNA, para avaliação do potencial genotóxico das amostras.

Como mostrado na Figura 21, todos os tratamentos induziram aumento na fragmentação do DNA, de maneira significativa em relação ao grupo controle sem

tratamento. A indução da fragmentação do DNA por NCMagh-SE foi dose dependente, como observado após o tratamento com 50 $\mu\text{g/mL}$ de Selol + $2,5 \times 10^9$ partículas/mL (2X) e 200 $\mu\text{g/mL}$ de Selol + 1×10^{10} partículas/mL (8X), que induziram, respectivamente, 33,0% e 62,8% de fragmentação nas células 4T1 e 27,6% e 72,6% de fragmentação nas células MCF-7.

O tratamento com NCSE (2X) induziu percentual de fragmentação do DNA de maneira similar ao grupo tratado com NCMagh-SE (2X), em ambas as linhagens. Enquanto que o tratamento com NCMagh (2X) foi mais genotóxico do que NCMagh-SE (2X) para a linhagem 4T1.

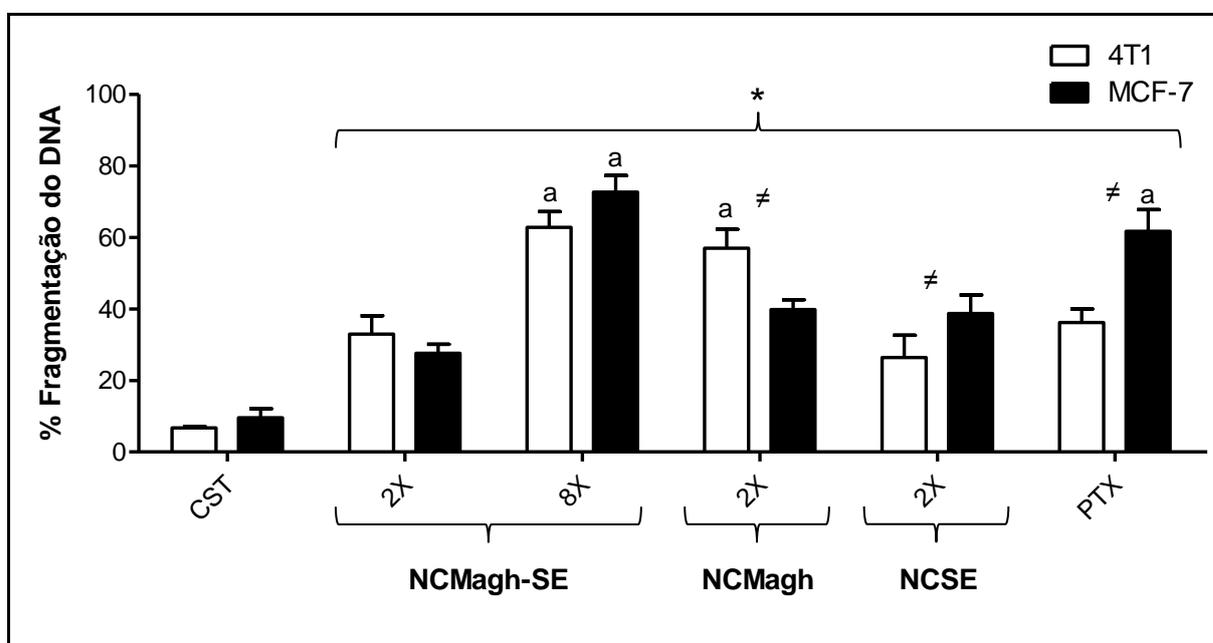


Figura 21: Análise do percentual de fragmentação do DNA em células das linhagens 4T1 e MCF-7, após 48 horas dos diferentes tratamentos. NCMagh-SE - nanocápsulas magnéticas de Selol; NCMagh - nanocápsulas magnéticas; NCSE - nanocápsulas de Selol; CST – controle sem tratamento; PTX - 40 $\mu\text{g/mL}$ de Paclitaxel. 2X – 50 $\mu\text{g/mL}$ de Selol e/ou $2,5 \times 10^9$ partículas/mL; 8X – 200 $\mu\text{g/mL}$ de Selol e/ou 1×10^{10} partículas/mL. * indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle sem tratamento; # indica diferença estatisticamente significativa entre as duas linhagens; “a” indica diferença estatisticamente significativa em relação a NCMagh-SE-2X; $p < 0,05$. As barras correspondem à média \pm EPM de dois experimentos independentes, realizados em triplicata.

5.2.5. Avaliação da citotoxicidade, em células 4T1 e MCF-7, induzida pelo tratamento com NCMagh-SE, associado à exposição ao campo magnético alternado

Para avaliar se a exposição ao campo magnético alternado pode aumentar o efeito antitumoral das nanocápsulas magnéticas de Selol, as células tumorais (4T1 e MCF-7) foram tratadas com NCMagh-SE e posteriormente submetidas ou não ao campo magnético alternado. Para esta análise, foi escolhida a concentração de 50 µg/mL de Selol + $2,5 \times 10^9$ partículas/mL (2X), com base nos resultados do ensaio de citotoxicidade, apresentados no item 5.2.1., e também uma concentração pouco maior, de 100 µg/mL de Selol + 5×10^9 partículas/mL (4X). Vale ressaltar que o tempo de exposição às amostras NCMagh-SE foi de apenas 4 horas, diferentemente dos experimentos realizados no item 5.2.1.

Como pode ser observado na Figura 22-A, a incubação das células 4T1, por 4 horas, com NCMagh-SE [50 µg/mL de Selol + $2,5 \times 10^9$ partículas/mL (2X) e 100 µg/mL de Selol + 5×10^9 partículas/mL (4X)], induziu leve diminuição na viabilidade celular em relação ao grupo controle sem tratamento, mas que não foi significativa. No entanto, quando as células foram expostas ao campo magnético de frequência alternada (CMA), posterior ao tratamento com NCMagh-SE nas concentrações de 2X e 4X, a viabilidade celular diminuiu significativamente em 31,5% e 42,4%, respectivamente, em relação ao grupo controle sem tratamento.

Quando a citotoxicidade foi avaliada nas células de carcinoma mamário humano (MCF-7), foi observado que o tratamento com NCMagh-SE diminuiu a viabilidade tanto das células expostas quanto das células não expostas ao CMA (Figura 22-B). Após o tratamento com 100 µg/mL de Selol + 5×10^9 partículas/mL (4X), seguido pela exposição ao CMA, a viabilidade celular foi significativamente diminuída em 51,8%, enquanto que sem a exposição ao CMA, foi reduzida somente em 32,2%, em relação ao grupo controle sem tratamento.

Vale ressaltar que as células, tanto da linhagem 4T1, quanto da linhagem MCF-7, tratadas com NCMagh-SE e expostas ao CMA, apresentaram redução significativa na viabilidade em comparação com as células tratadas mas não expostas ao CMA, em ambas as concentrações testadas.

Ainda que não significativa, foi observada diminuição da viabilidade das células expostas ao CMA e tratadas com NCMagh-SE na concentração 4X em relação às células tratadas com a concentração 2X.

Como esperado, a exposição ao campo magnético não induziu qualquer alteração na viabilidade das células 4T1 e MCF-7 sem tratamento, que foram usadas como controle (dados não mostrados).

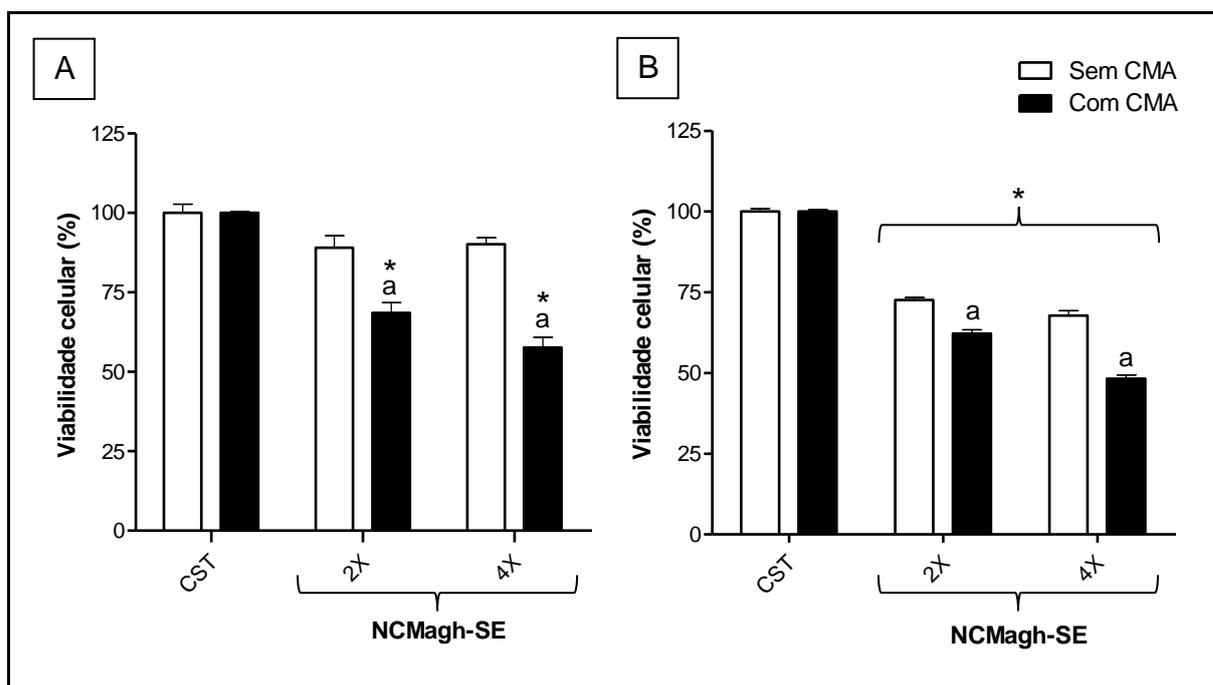


Figura 22: Efeito do tratamento com nanocápsulas magnéticas de Selol (NCMagh-SE), associado ou não à exposição subsequente ao campo magnético alternado, na viabilidade de células tumorais das linhagens células 4T1 (A) e MCF-7 (B). Os dados foram normalizados em relação aos grupos controles sem tratamento expostos ou não ao campo magnético. 2X – 50 µg/mL de Selol + $2,5 \times 10^9$ partículas/mL; 4X – 100 µg/mL de Selol + 5×10^9 partículas/mL. * indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle sem tratamento; “a” indica diferença estatisticamente significativa em relação ao tratamento com NCMagh-SE, na mesma concentração, porém sem exposição ao campo magnético alternado (CMA); $p < 0,05$.

5.3. EXPERIMENTOS *IN VIVO*

Os experimentos *in vivo* foram realizados em camundongos BALB/c, portadores de adenocarcinoma mamário induzido por meio da inoculação ortotópica de células da linhagem 4T1. Os experimentos foram realizados em duas etapas.

5.3.1. Etapa 1 - Avaliação da toxicidade e do efeito antitumoral do tratamento com nanocápsulas magnéticas de Selol (NCMagh-SE) associado ou não à administração do quimioterápico Paclitaxel

Nesta etapa os animais foram divididos em grupos (n=6) controle e submetidos a diferentes tratamentos conforme especificado na Figura 7, dos Materiais e Métodos.

5.3.1.1. Avaliação clínica dos animais

Não foram observadas alterações comportamentais e clínicas como diarreia, queda de pêlos e atividade motora diminuída ao longo de todo o experimento (22 dias), em todos os grupos estudados.

5.3.1.2. Peso dos animais

O peso dos animais foi registrado nos dias em que os mesmos eram tratados e imediatamente antes da eutanásia. Não houve mudanças significativas no peso corporal dos animais em nenhum dos grupos de tratamento (Figura 23).

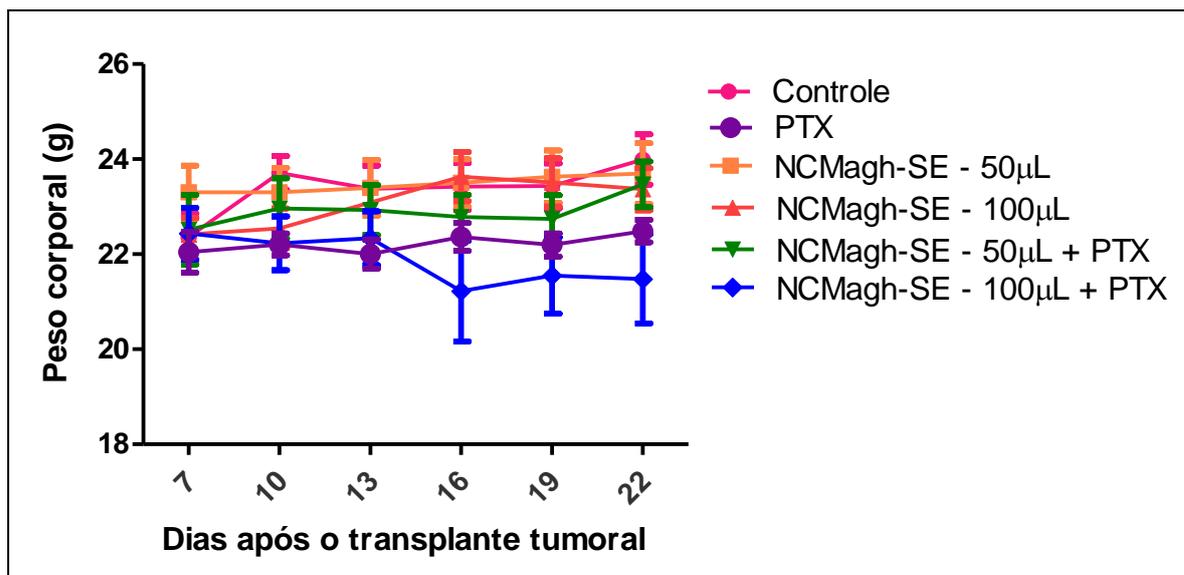


Figura 23: Média do peso corporal de camundongos ao longo de todo o período de tratamento. PTX - tratamento com Paclitaxel (10 mg/Kg); NCMagh-SE - nanocápsulas magnéticas de Selol. Os dados correspondem à média \pm EPM.

5.3.1.3. Análises hematológicas

Os resultados obtidos nas análises do hemograma dos camundongos portadores de tumor, submetidos a diferentes tratamentos, estão apresentados nas Tabelas 4 e 5.

Não houve diferença estatisticamente significativa nas contagens total e diferencial de leucócitos, entre os diversos grupos de tratamento (Tabela 4). Entretanto, baseando-se nos valores de referência para camundongos, descrito por Vianna (2007), foi verificada intensa leucocitose em todos os animais analisados. Foi também observada inversão na proporção de linfócitos e monócitos/neutrófilos em comparação com os valores de referência, tendo sido identificada a ocorrência de intensa linfopenia, concomitante ao aumento no percentual de monócitos/neutrófilos. Ainda comparando-se os resultados encontrados com os valores de referência, foi detectado aumento no percentual de eosinófilos nos animais experimentais tratados com NCMagh-SE e/ou Paclitaxel, e pequena diminuição no número de eosinófilos nos camundongos do grupo controle.

Tabela 4: Resultados do leucograma de camundongos BALB/c portadores de tumor, tratados com NCMagh-SE e/ou Paclitaxel.

Tratamento	Leucócitos ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	Linfócitos (%)	Monócito + Neutrófilos(%)	Eosinófilos (%)
Controle	17,12 \pm 2,25	31,44 \pm 2,39	66,60 \pm 2,19	1,96 \pm 0,20
PTX	34,03 \pm 3,38	23,73 \pm 1,28	72,17 \pm 1,03	4,10 \pm 0,46
NCMagh-SE 50 μL	36,40 \pm 3,25	23,93 \pm 1,89	71,18 \pm 1,60	4,88 \pm 0,44
NCMagh-SE 100 μL	31,42 \pm 3,02	23,92 \pm 1,55	72,40 \pm 1,26	3,55 \pm 0,40
NCMagh-SE 50 μL + PTX	30,48 \pm 6,55	29,00 \pm 3,10	66,55 \pm 2,15	4,45 \pm 1,03
NCMagh-SE 100 μL + PTX	15,88 \pm 4,05	24,72 \pm 3,05	72,56 \pm 3,09	2,72 \pm 0,54
Referência	12,00 a 13,00	65,90 a 77,90	16,70 a 19,60	2,00 a 2,70

Os dados correspondem à média \pm EPM. NCMagh-SE - nanocápsulas magnéticas de Selol; PTX – Paclitaxel (10mg/Kg). Os valores de referência correspondem aos valores descritos por Vianna (2007).

As análises do eritrograma e da contagem de plaquetas (Tabela 5) revelou poucas alterações em relação aos valores de referência. Ainda que não significativas, foi mais evidente a diminuição do hematócrito em todos os grupos estudados e o aumento no número de plaquetas em todos os grupos tratados com NCMagh-SE e/ou Paclitaxel. Comparando-se os resultados encontrados neste estudo, a única diferença estatisticamente significativa observada foi a diminuição dos valores da hemoglobina entre os grupo tratados com Paclitaxel, com as doses de 100 μL e 50 μL de NCMagh-SE.

Vale ressaltar que todos os animais analisados apresentavam tumor, o que já induz alterações nos parâmetros hematológicos.

Tabela 5: Resultados dos exames hematológicos de camundongos BALB/c portadores de tumor, tratados com NCMagh-SE e/ou Paclitaxel.

Tratamento	Eritrócitos ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	Hemoglobina (g/dL)	Hematócrito (%)	MCV(FI)	MCH (pg)	MCHC (g/dL)	RDW %	Plaquetas ($\times 10^3/\mu\text{L}$)
Controle	8,90 \pm 0,13	12,42 \pm 0,19	30,90 \pm 0,48	34,70 \pm 0,27	13,94 \pm 0,15	40,18 \pm 0,15	16,06 \pm 0,29	432,20 \pm 54,49
PTX	9,62 \pm 0,07	12,73 \pm 0,08	32,37 \pm 0,02	33,67 \pm 0,25	13,23 \pm 0,14	39,33 \pm 0,25	17,20 \pm 0,41	869,67 \pm 88,36
NCMagh-SE 50 μL	8,96 \pm 0,10	12,77 \pm 0,10	31,33 \pm 1,71	35,00 \pm 0,13	14,28 \pm 0,07	40,77 \pm 0,10	16,72 \pm 0,18	722,83 \pm 56,52
NCMagh-SE 100 μL	8,83 \pm 0,20	12,42 \pm 0,25	30,62 \pm 0,64	34,73 \pm 0,17	14,10 \pm 0,09	40,58 \pm 0,09	16,73 \pm 0,26	756,50 \pm 70,57
NCMagh-SE 50 μL + PTX	9,57 \pm 0,18	13,63 \pm 0,14*	33,73 \pm 0,47	35,30 \pm 0,22	14,28 \pm 0,18	40,43 \pm 0,26	16,48 \pm 0,16	916,00 \pm 77,16
NCMagh-SE 100 μL + PTX	6,67 \pm 0,60	9,30 \pm 0,80*	23,40 \pm 2,00	35,54 \pm 0,27	14,04 \pm 0,09	39,58 \pm 0,23	16,52 \pm 0,28	569,60 \pm 77,14
Referência	7,30 a 10,50	12,00 a 15,00	35,00 a 50,00	-	-	-	-	497

Os dados correspondem à média \pm EPM. PTX - tratamento com Paclitaxel (10mg/Kg); NCMagh-SE - nanocápsulas magnéticas de Selol. * indica diferença estatística entre os tratamentos; $p < 0,05$. Os valores de referência correspondem aos valores descritos por Vianna (2007).

5.3.1.4. Análises bioquímicas

Comparando-se os resultados das análises bioquímicas entre os grupos de tratamento, não houve alterações nas dosagens enzimáticas nos soros sanguíneos dos animais, exceto nos valores de bilirrubina direta (Tabela 6). O tratamento com 100 µL de NCMagh-SE dobrou os níveis desta enzima no soro, em relação à dose de 50 µL. Este aumento foi estatisticamente significativo também em relação ao grupo controle. Além disso, o quimioterápico Paclitaxel, administrado isoladamente ou associado com NCMagh-SE, contribuiu para o aumento nos níveis de bilirrubina direta em relação aos grupos controle e tratado com 50 µL de NCMagh-SE.

Tabela 6: Resultados das dosagens bioquímicas no soro de camudongos BALB/c portadores de tumor, tratados com NCMagh-SE e/ou Paclitaxel.

Tratamento	Uréia (mg/dL)	Bilirrubina Total (mg/dL)	Bilirrubina Direta (mg/dL)	Bilirrubina Indireta (mg/dL)	ALT (UI/L)	AST (UI/L)
Controle	48,25 ± 1,49	0,04 ± 0,01	0,02 ± 0,00	0,02 ± 0,01	8,25 ± 2,72	66,75 ± 12,55
PTX	46,60 ± 2,29	0,05 ± 0,01	0,03 * ± 0,00	0,01 ± 0,00	3,80 ± 0,58	68,80 ± 5,84
NCMagh-SE 50 µL	59,00 ± 13,47	0,04 ± 0,01	0,02 ± 0,00	0,02 ± 0,01	4,25 ± 0,25	51,00 ± 5,85
NCMagh-SE 100 µL	49,25 ± 2,69	0,06 ± 0,01	0,04 * ± 0,00	0,02 ± 0,01	5,00 ± 1,08	50,75 ± 4,37
NCMagh-SE 50 µL + PTX	47,25 ± 2,02	0,05 ± 0,01	0,03 * ± 0,00	0,02 ± 0,01	3,50 ± 0,29	57,50 ± 4,57
NCMagh-SE 100 µL + PTX	47,00 ± 3,34	0,04 ± 0,00	0,03 * ± 0,00	0,02 ± 0,00	3,75 ± 0,48	54,25 ± 5,72

Os dados correspondem à média ± EPM. PTX - Paclitaxel (10mg/Kg); NCMagh-SE - nanocápsulas magnéticas de Selol; ALT – alanina transaminases; AST – aspartato transaminases. * significa diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle, tratado com solução salina, e ao grupo tratado com 50 µL de NCMagh-SE.

5.3.1.5. Volume e peso dos tumores

Após 22 dias do transplante ortotópico das células, os tumores foram retirados, medidos e pesados.

Ainda que não significativa, foi observada leve diminuição no volume dos tumores (Figura 24) dos animais tratados com 100 μ L de NCMagh-SE associado com Paclitaxel, em relação a todos os grupos estudados. Além disso, foi observado aumento no volume tumoral dos animais tratados somente com NCMagh-SE, nas duas concentrações testadas, embora também não tenha sido significativo.

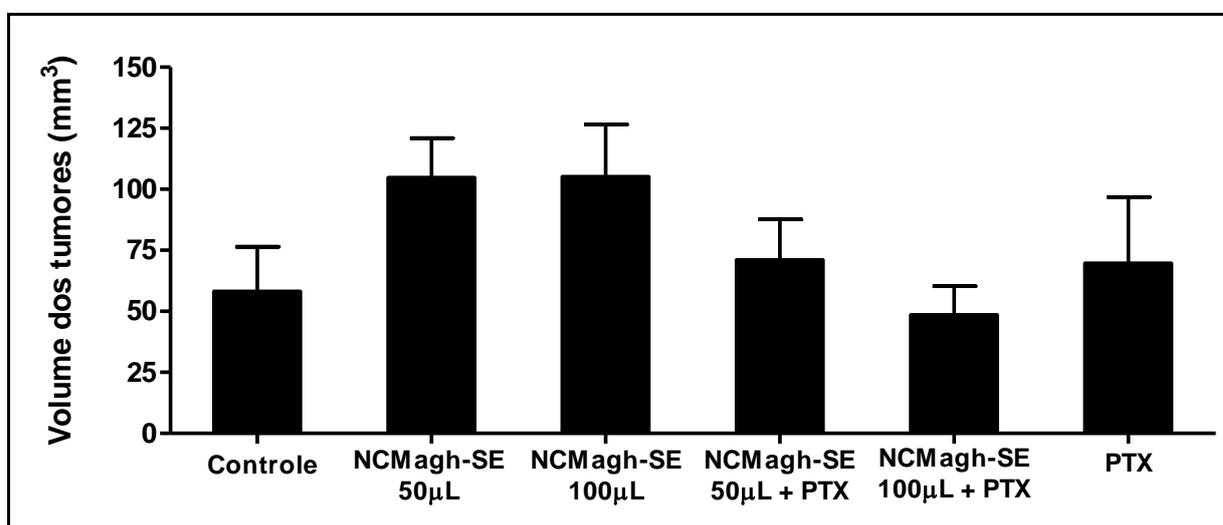


Figura 24: Avaliação do volume (mm³) dos tumores coletados dos camundongos, após 22 dias da inoculação das células tumorais. NCMagh-SE - nanocápsulas magnéticas de Selol; PTX - tratamento com Paclitaxel (10mg/Kg). As barras correspondem à média \pm EPM.

Os tumores também foram pesados e os resultados estão apresentados na Figura 25. Foi verificado aumento, não significativo, no peso dos tumores dos animais tratados com NCMagh-SE, nas duas concentrações testadas. Porém, o tratamento concomitante com NCMagh-SE e Paclitaxel, diminuiu o peso da massa tumoral em relação aos grupos tratados somente com NCMagh, ainda que estas diferenças não tenham sido significativas.

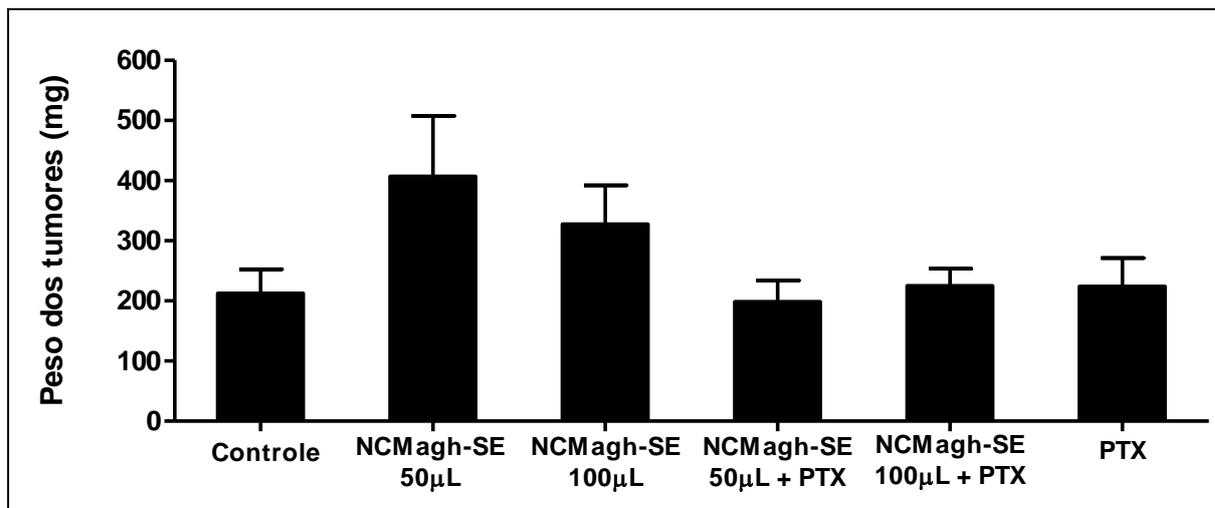


Figura 25: Avaliação do peso (mg) dos tumores coletados dos camundongos, após 22 dias da inoculação das células tumorais. NCMagh-SE - nanocápsulas magnéticas de Selol; PTX - tratamento com Paclitaxel (10mg/Kg). As barras correspondem à média \pm EPM.

5.3.1.6. Análises macroscópicas dos tumores

Todos os animais desenvolveram tumor na glândula mamária, após inoculação das células 4T1. A Figura 26 apresenta imagens ilustrativas dos tumores em cada um dos grupos experimentais. As Figuras 26-A e 26-B mostram camundongos portador de adenocarcinoma mamário do grupo controle e do grupo tratado somente com paclitaxel, respectivamente. Na Figura 26 (C a F) é possível visualizar o acúmulo de NCMagh-SE na região do tumor, uma vez que a administração foi realizada por via intratumoral. Os animais tratados com 100 μ L de NCMagh-SE (Figura 26 – D e F) apresentavam quantidade visualmente maior de amostra acumulada do que os tratados com 50 μ L (Figura 26 - C e E). Foi notada maior aderência do tumor nos animais tratados com NCMagh-SE (Figura 26 - C a F) do que nos animais controle tratados com salina (Figura 26-A) ou tratados somente com Paclitaxel (Figura 26-F).

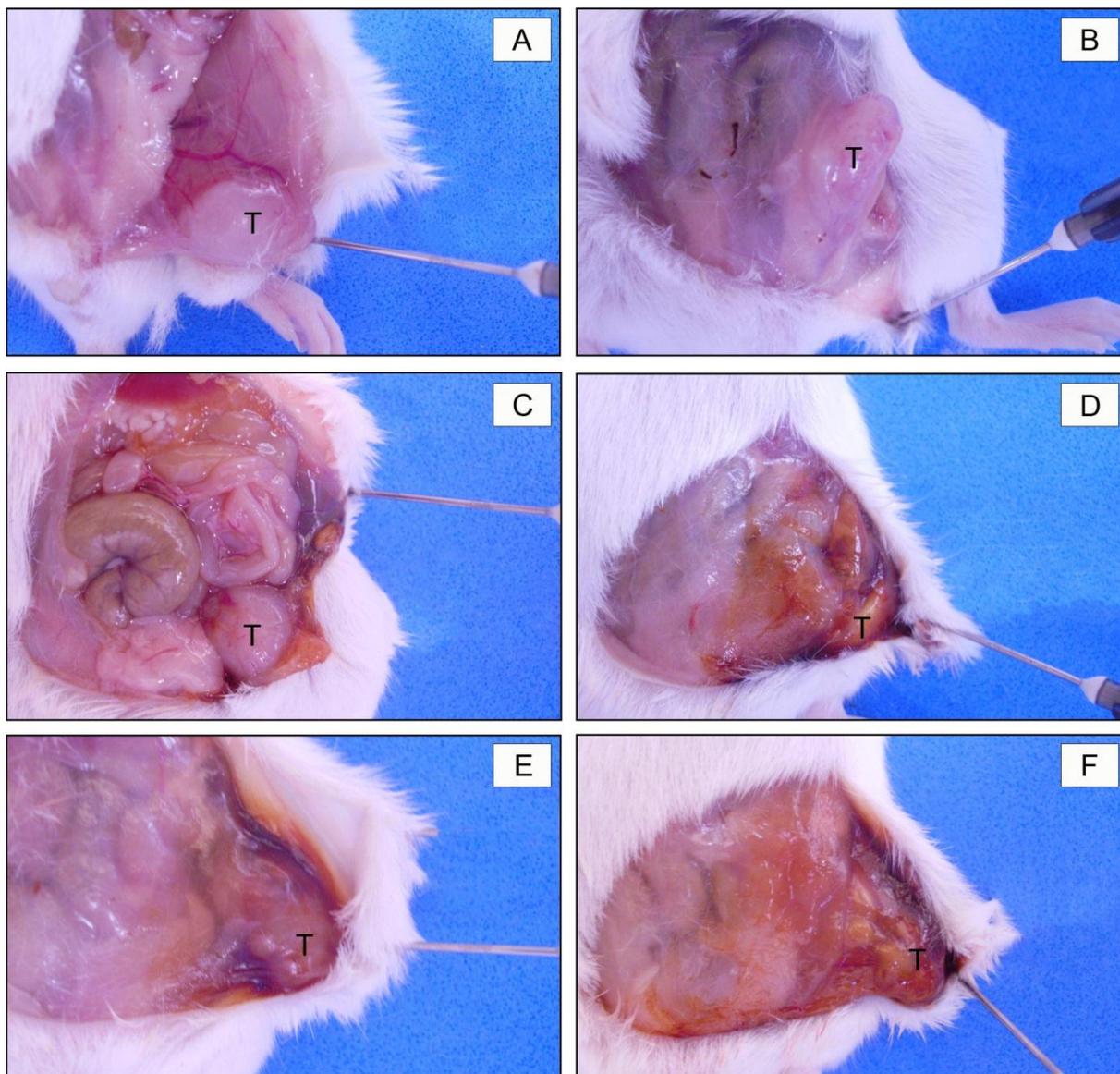


Figura 26: Fotografias de adenocarcinomas mamários, após 22 dias da inoculação do tumor, em animais submetidos a diferentes tratamentos. Camundongos do (A) grupo controle; tratados com (B) Paclitaxel via intravenosa; (C) 50 µL e (D) 100 µL de NCMagh-SE via intratumoral; Paclitaxel (10 mg/Kg) via intravenosa combinado com (E) 50 µL e (F) 100 µL de NCMagh-SE via intratumoral.

Ao exame macroscópico, os tumores do grupo controle (Figura 27-A) apresentavam áreas de coloração avermelhada, sugerindo hemorragia ou elevada vascularização; enquanto que o tumor dos animais tratados somente com Paclitaxel apresentava coloração clara, sem evidências de hemorragia ou vascularização (Figura 27-B). Já nos animais tratados com NCMagh-SE (Figura 27 - C a F), foi observada presença de áreas amarronzadas devido ao acúmulo da amostra, que eram mais evidentes nos animais tratados com 100 µL de NCMagh-SE (Figura 27 -

D e F) do que nos tratados com 50 μ L (Figura 27 – C e E). O tamanho dos tumores do grupo tratado concomitante com 100 μ L de NCMagh-SE e Paclitaxel era visualmente menor em comparação com os outros grupos de tratamento (Figura 27-F).

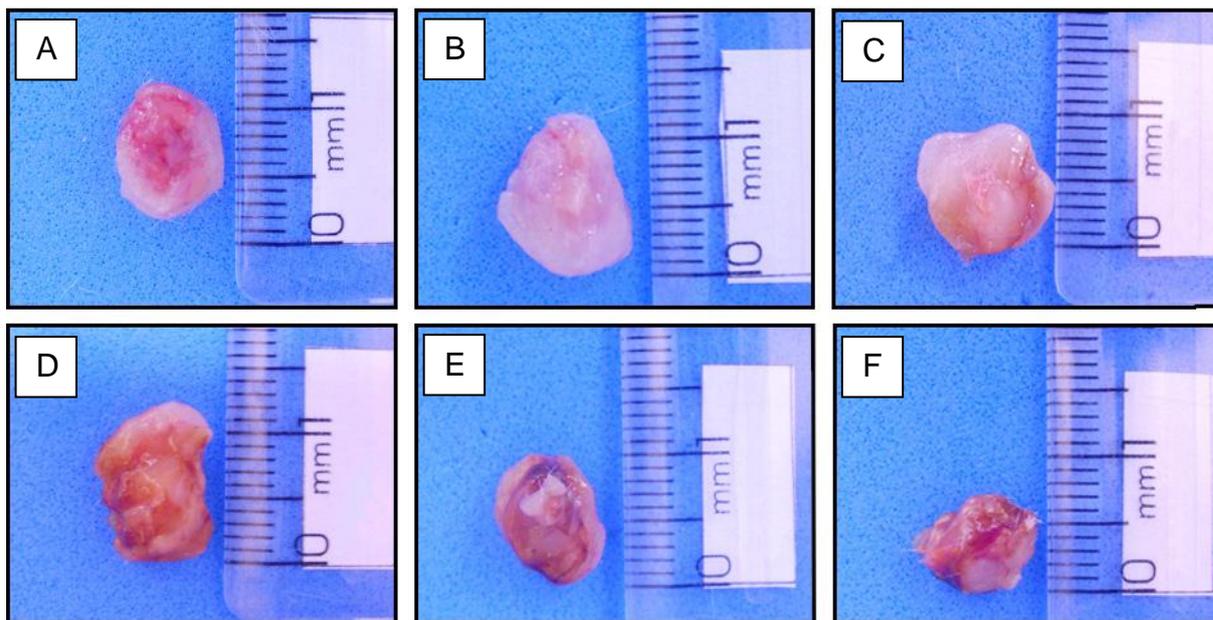


Figura 27: Fotografias de adenocarcinomas mamários, coletados após 22 dias da inoculação do tumor, em animais submetidos a diferentes tratamentos. Tumor de camundongos do (A) grupo controle; tratados com (B) Paclitaxel via intravenosa; (C) 50 μ L e (D) 100 μ L de NCMagh-SE via intratumoral; Paclitaxel (10 mg/Kg) via intravenosa combinado com (E) 50 μ L e (F) 100 μ L de NCMagh-SE via intratumoral.

5.3.1.7. Análise histopatológica dos tumores

A análise histopatológica dos tumores, passo essencial para avaliação dos efeitos antitumorais dos tratamentos, permitiu constatar que todos os animais apresentaram implantação adequada de células 4T1 no tecido mamário, mostrando que a técnica utilizada foi eficiente para indução de tumor ortotópico.

Na Figura 28, que apresenta fotomicrografias do adenocarcinoma mamário de animais do grupo controle, é possível verificar a presença de tecido tumoral implantado no tecido mamário, próximo aos ductos mamários e ao tecido adiposo. A Figura 28-B mostra a invasão do tecido adiposo por tecido tumoral, enquanto que a Figura 28-C evidencia a presença de células tumorais próximas ao ducto mamário.

Na Figura 28 (D e E) é possível visualizar a presença de células neoplásicas indiferenciadas, de infiltrado inflamatório, células com núcleo hiper cromático indicando a ocorrência de apoptose, algumas células com vacúolos no citoplasma e células em mitose. Foi verificado também hemorragia em algumas áreas do tumor, como mostrado na Figura 28-F, corroborando com os achados macroscópicos. Praticamente não foram encontradas células em necrose.

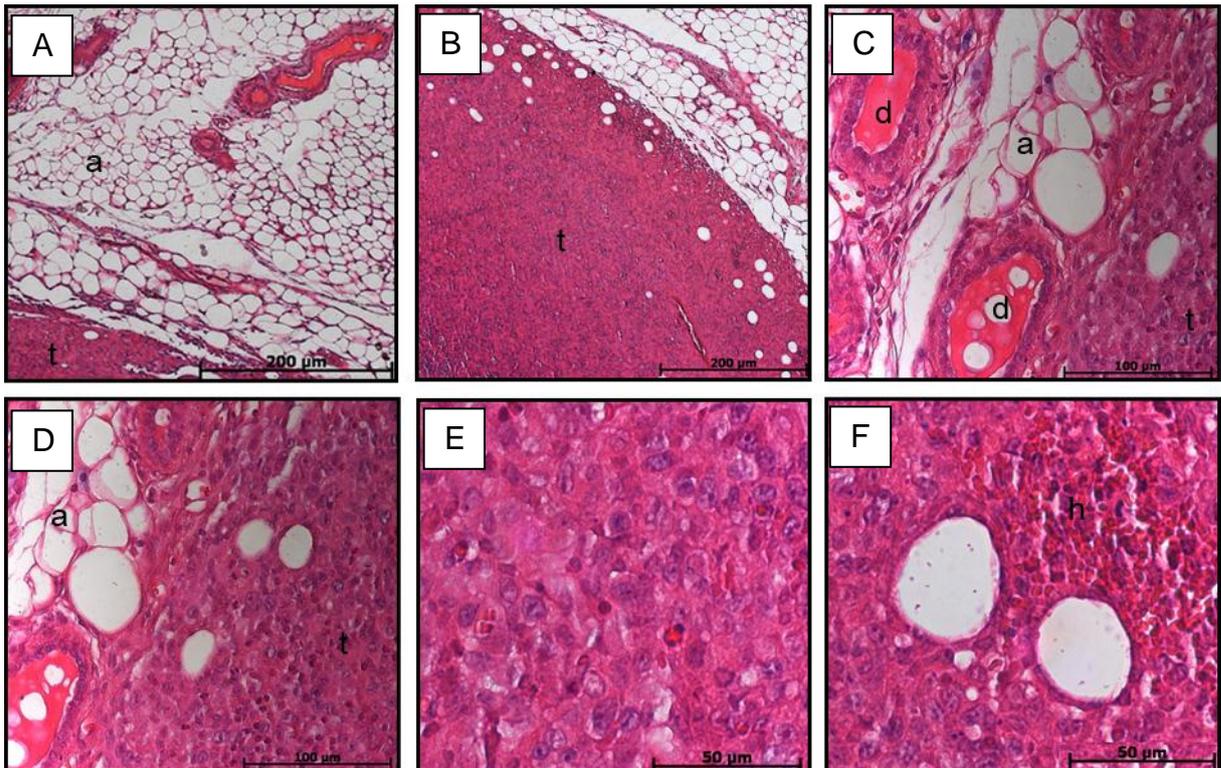


Figura 28: Fotomicrografias de adenocarcinoma mamário, transplantado na mama de camundongos BALB/c, do grupo controle. Os tumores foram coletados após 22 dias da inoculação das células tumorais. (A) aspecto geral do parênquima mamário composto por tecido adiposo (a) e ductos (d) adjacente ao tumor (t); (B) infiltração do tecido adiposo por células tumorais; (C) células neoplásicas próximas ao ducto mamário; (D e E) presença de células com núcleo picnótico, vacúolos e com polimorfismo, além de infiltrado inflamatório; (F) área com hemorragia (h). Coloração por H&E.

No grupo dos animais tratados somente com Paclitaxel (10 mg/Kg), um quimioterápico utilizado no tratamento do câncer de mama metastático, foi também verificada a presença de células neoplásicas próximas a ductos mamários (Figura 29 - A e B), e infiltrando o tecido adiposo (Figura 29 - B e C). A Figura 29-B também evidencia a hiperplasia dos ductos mamários. Foi observada densa quantidade de células na área superficial do tumor (Figura 29 - C e D), enquanto que na região

central foi observado espaçamento intercelular (Figura 29 - C e E). Áreas de necrose foram observadas (Figura 29-F).

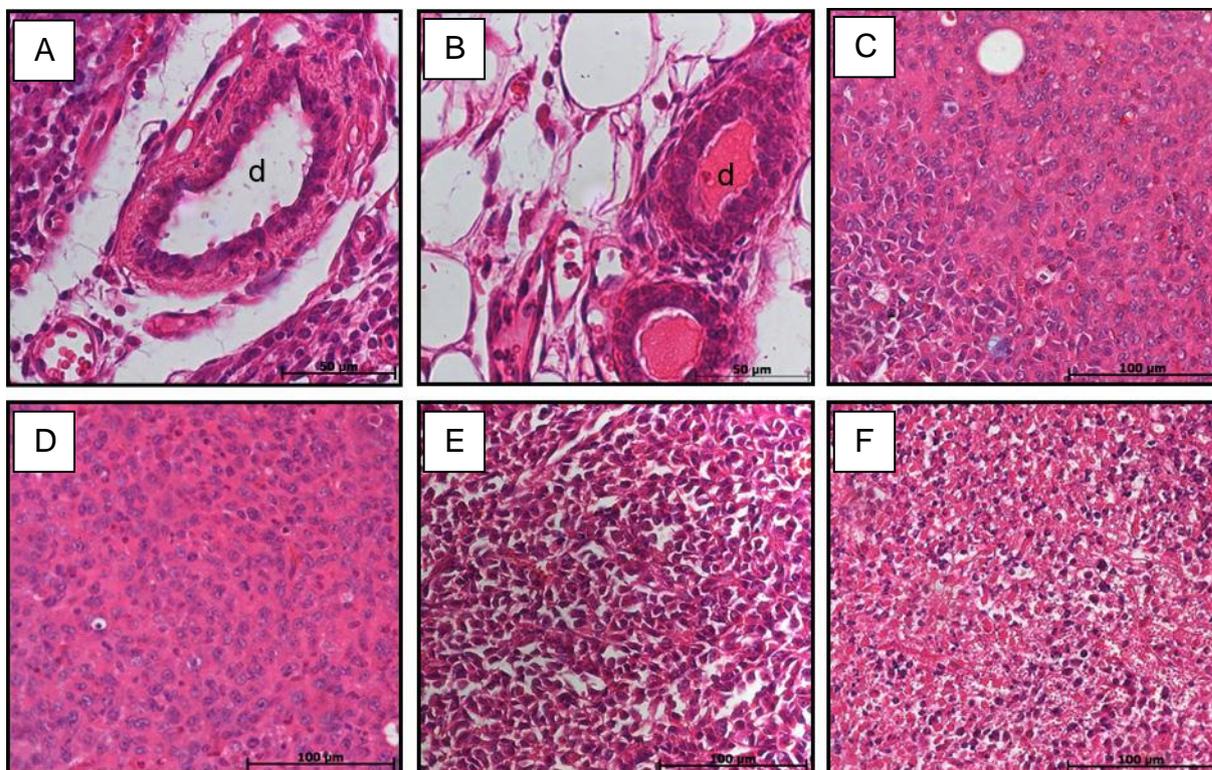


Figura 29: Fotomicrografias de adenocarcinoma mamário, transplantado na mama de camundongos BALB/c, do grupo tratado somente com Paclitaxel. Os tumores foram coletados após 22 dias da inoculação das células tumorais. (A e B) hiperplasia do ducto mamário adjacente ao tecido tumoral; (B) infiltração do tecido adiposo por células tumorais (C), mostrando maior densidade celular na região periférica do tumor (D) e células espaçadas na região central do tumor (E); (F) células em necrose. Coloração por H&E.

A Figura 30 mostra fotomicrografias dos tumores dos animais tratados com NCMagh-SE, nas doses de 50 μ L (Figura 30 - A a C) e 100 μ L (Figura 30 - D a I). A Figura 30-A apresenta a invasão do tecido adiposo pelo tecido tumoral, enquanto que na Figura 30-B é possível visualizar as células indiferenciadas do tecido tumoral. Foram visualizados aglomerados de coloração marrom, indicativo da presença da amostra NCMagh-SE, no citoplasma das células tumorais, principalmente na periferia do tumor (Figura 30-C). Já as Figuras 30-D e 30-E mostram a presença de células da periferia e do centro do tumor, respectivamente, evidenciando o maior espaçamento das células localizadas no interior do tumor. Foi observado maior número de aglomerados marrons, indicativos da presença de NCMagh-SE, nos

animais tratados com 100 μ L (Figura 30-F), do que nos tratados com 50 μ L (Figura 30-C) de NCMagh-SE. É possível verificar nas Figuras 30-G a 30-I, a ocorrência de necrose, associada à presença de aglomerados de coloração marrom e com preenchimento por tecido conjuntivo fibroso (Figura 30 - H e I).

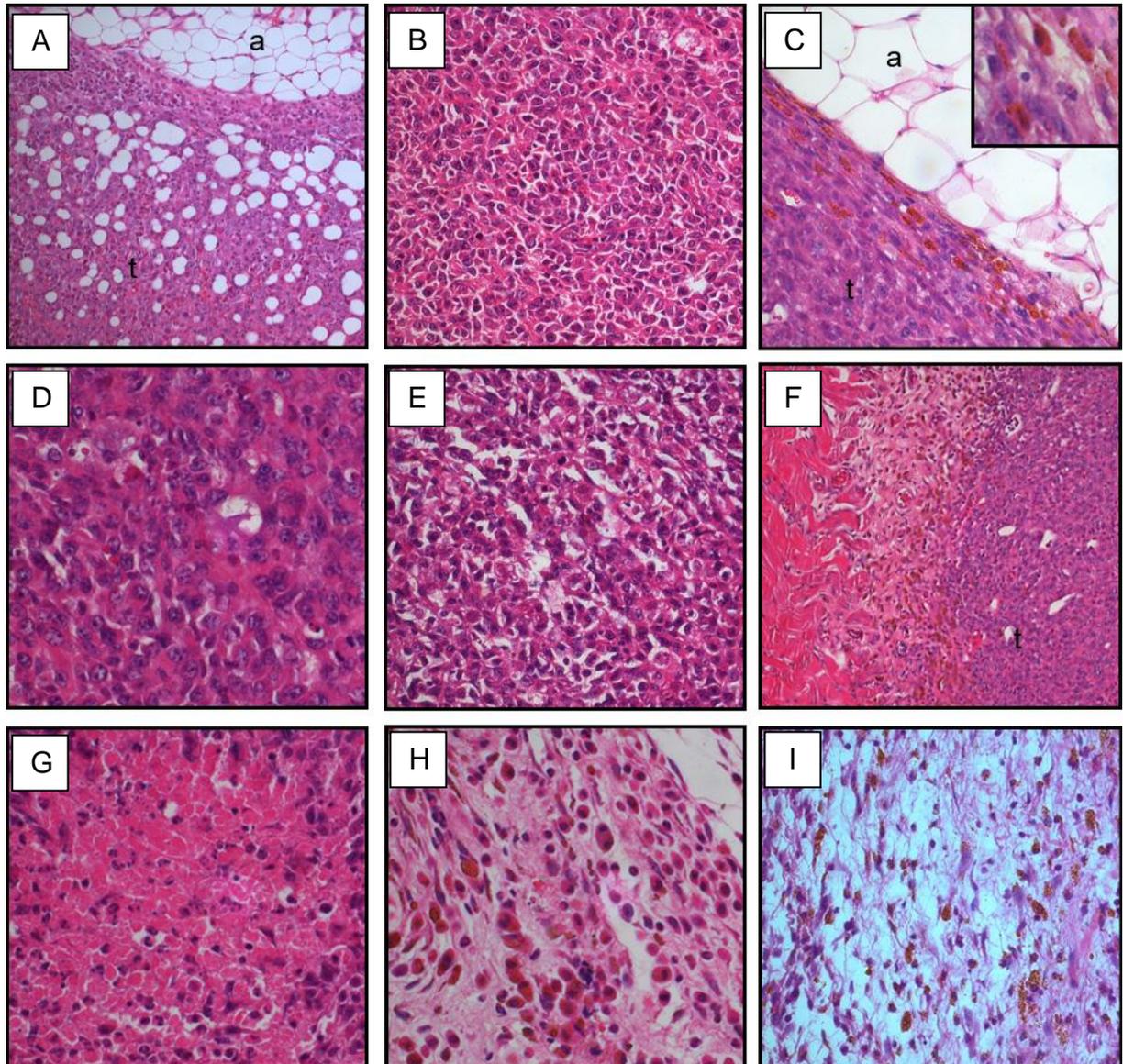


Figura 30: Fotomicrografias de adenocarcinoma mamário, transplantado na mama de camundongos BALB/c, dos grupos tratados com 50 μ L (A-C) e 100 μ L (D-I) de NCMagh-SE. Os tumores foram coletados após 22 dias da inoculação das células tumorais. (A) infiltração do tecido adiposo por células tumorais; (B) células indiferenciadas características do tecido tumoral; (C) presença de aglomerados marrons na região superficial do tumor, próximo ao tecido adiposo; (D) presença de aglomerados marrons na região superficial do tumor e evidenciando denso tecido tumoral; (E) espaçamento entre as células tumorais localizadas na região central do tumor e presença de aglomerados; (F) presença de grande quantidade de aglomerados marrons; (G, H e I) áreas de necrose e com aglomerados marrons. Coloração por H&E.

Nos animais tratados com NCMagh-SE via intraperitoneal e com Paclitaxel via intravenosa (Figura 31), foi observado intenso acúmulo de aglomerados marrons. Interessantemente, este acúmulo foi muito maior do que no grupo tratado somente com NCMagh-SE (Figura 30), além de ter atingido todo o tecido tumoral. Foi observada a presença de tecido tumoral infiltrando o tecido adiposo (Figura 31 - A, B, D e E). Grande quantidade de aglomerados marrons, indicativos da presença de NCMagh-SE, foram visualizados principalmente nos animais tratados com 100 μ L de NCMagh-SE (Figura 31 – D a G). Além disso, o tratamento combinado de Paclitaxel e NCMagh-SE, nas doses de 50 μ L (Figura 31-C) e 100 μ L (Figura 31 - G a I) , aumentou a ocorrência de necrose em relação aos grupos tratados somente com NCMagh-SE. Extensas áreas necróticas, principalmente no grupo tratado com 100 μ L de NCMagh-SE e Paclitaxel (10 mg/Kg), foram observadas (Figura 31 - G a I). Diversas regiões necrosadas apresentavam acúmulo de aglomerados marrons (Figura 31 - G e H).

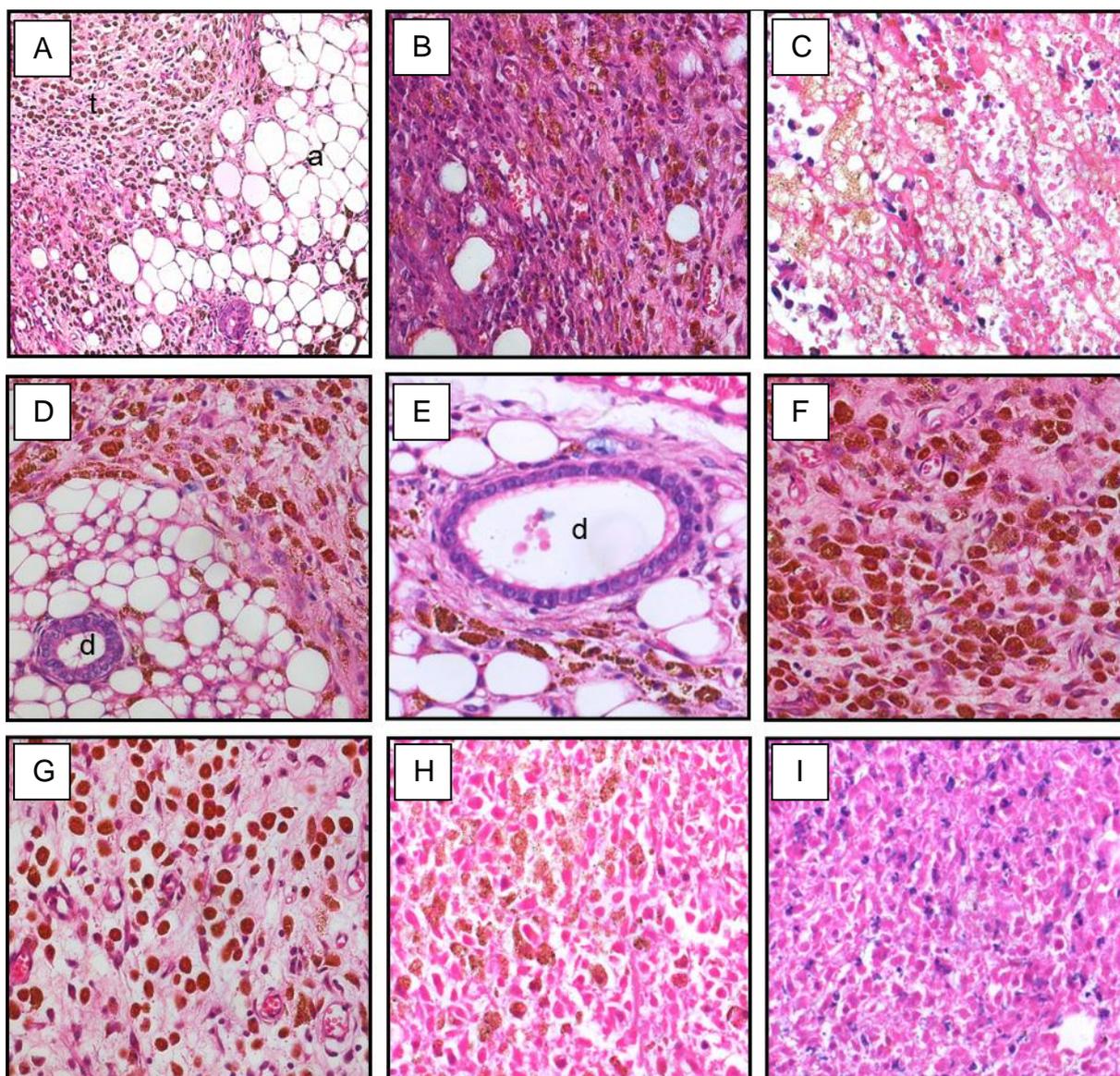


Figura 31: Fotomicrografias de adenocarcinoma mamário, transplantado na mama de camundongos BALB/c, dos grupos tratados com 50 μ L (A-C) e 100 μ L (D-I) de NCMagh-SE via intratumoral, associado ao tratamento endovenoso com Paclitaxel. Os tumores foram coletados após 22 dias da inoculação das células tumorais. (A) tecido tumoral infiltrando o tecido adiposo; (B) presença de grande quantidade de aglomerados marrons na periferia do tumor; (C) área de necrose e presença de aglomerados marrons; (D) grande quantidade de aglomerados marrons no tecido tumoral, próximo ao tecido adiposo; (E) aglomerados marrons próximos ao ducto mamário; (F) grande quantidade de aglomerados marrons na periferia do tumor; (G e H) áreas de necrose com presença de aglomerados marrons; (I) área de necrose. Coloração por H&E.

Vale ressaltar que o tratamento somente com Paclitaxel induziu pouca necrose das células tumorais, em comparação com os grupos tratados com NCMagh-SE. Entretanto, quando os dois tratamentos eram associados, foi

observado aumento aparente das áreas necróticas. O grupo tratado com 100 μ L de NCMagh-SE em conjunto com Paclitaxel, foi o que apresentou, áreas mais extensas de necrose, atingindo a maior parte do tecido tumoral.

Por meio da coloração pelo método de Perls, foi possível confirmar que os aglomerados amarronzados visualizados nos cortes dos tumores dos animais tratados com NCMagh-SE, eram decorrentes da presença de ferro na amostra. A Figura 32 (A e B) mostram tumores de camundongos do grupo controle tratados com solução salina e tratado com Paclitaxel, respectivamente, mostrando ausência de pigmento azul. Entretanto, após o tratamento com NCMagh-SE, foi possível verificar a presença de pigmento azul (Figura 32 - C a F), inclusive em quantidade maior nos camundongos tratados, conjuntamente, com 100 μ L de NCMagh-SE e Paclitaxel (Figura 32 – F).

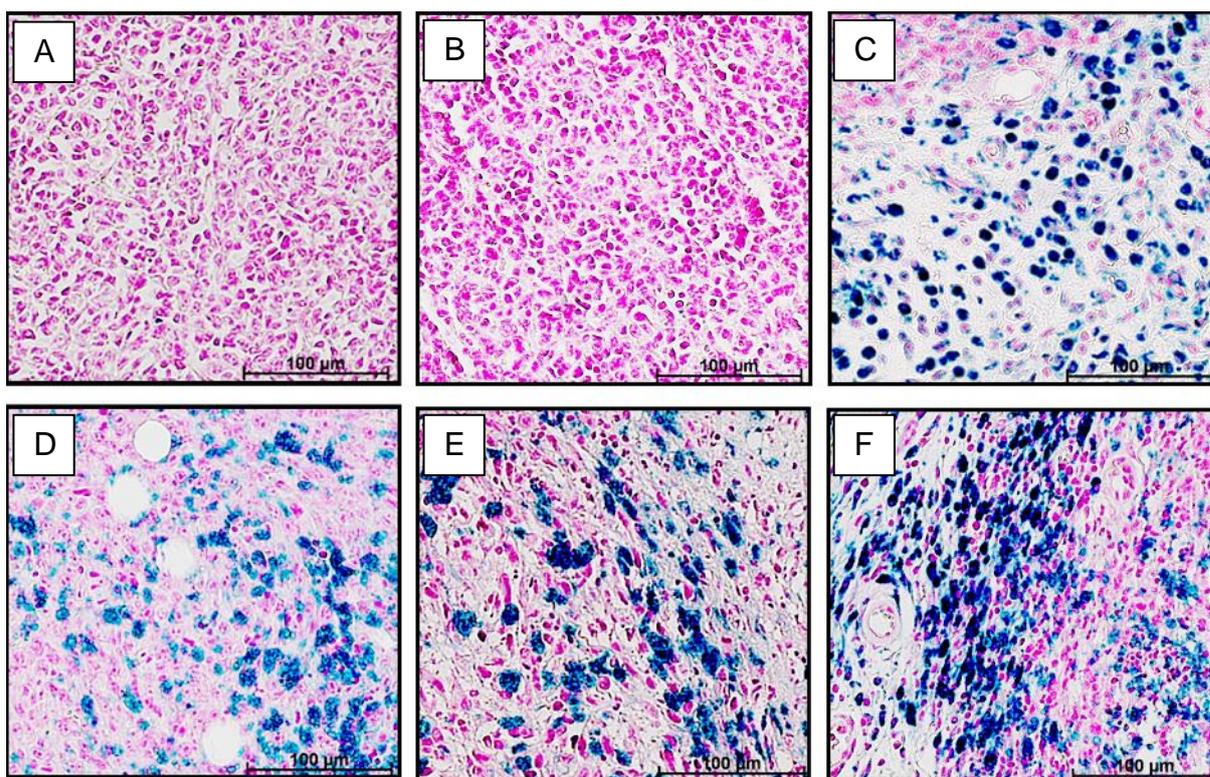


Figura 32: Fotomicrografias de adenocarcinoma mamário, transplantado na mama de camundongos BALB/c submetidos a diferentes tratamentos. Coloração pelo método de Perls. Os tumores foram coletados após 22 dias da inoculação das células tumorais. Tumor de camundongos (A) do grupo controle; tratados com (B) Paclitaxel via intravenosa, mostrando ausência de coloração azul; (C) 50 μ L e (D) 100 μ L de NCMagh-SE via intratumoral; Paclitaxel (10 mg/Kg) via intravenosa combinado com (E) 50 μ L e (F) 100 μ L de NCMagh-SE via intratumoral. (C a F) mostram pigmento azul, confirmando a presença de ferro decorrente da administração de NCMagh-SE.

5.3.1.8. Análise histológica dos órgãos

A análise dos órgãos dos animais dos grupos controle tratado com solução salina ou tratados somente com NCMagh-SE, nas doses de 50 μ L e 100 μ L, foi realizada para avaliar a toxicidade de NCMagh-SE, a presença de aglomerados de partículas magnéticas e a ocorrência de metástases.

Não foram encontradas alterações nos órgãos (fígado, pulmões, baço, coração, rins e cérebro) de nenhum animal avaliado, mesmo após o tratamento com NCMagh-SE (Figura 33). Não foram identificados, também, aglomerados marrons indicativos da presença de nanopartículas magnéticas e nem ocorrência de metástases.

Os cortes de fígado (Figura 33-A) de todos os animais apresentavam parênquima preservado, com hepatócitos de tamanho normal, núcleo e citoplasma bem definidos e cápsula de tecido conjuntivo íntegra. Foram observados escassos infiltrados inflamatórios, mas estes estavam presentes também nos animais do grupo controle tratado com solução salina.

As análises histológicas dos pulmões (Figura 33-B) mostraram bronquíolos e capilares com características padrões e alvéolos delimitados por septos de aspecto normal.

Embora alguns animais, inclusive dos animais controle tratado com salina, tenham apresentado aumento no tamanho do baço, não foram verificadas alterações na histologia deste órgão (Figura 33-C). As áreas de polpa branca e polpa vermelha eram bem delimitadas, com células de megacariócitos e células parenquimais bem preservadas. Foram observados também a presença de aglomerados marrons em quantidades iguais entre os grupos controle tratado com salina e tratados com NCMagh-SE, sugerindo que estes aglomerados eram decorrentes da presença de ferro endógeno.

O coração (Figura 33-D) também apresentava aspecto normal nas análises macro e microscópicas. Não foram encontrados processos inflamatórios ou necrose tecidual em nenhuma lâmina analisada.

Assim como o coração, os rins apresentavam aspecto normal, tendo sido visualizadas, nos cortes histológicos, a presença de cápsula de tecido conjuntivo, córtex e medula renal com morfologia padrão (Figura 33-E).

O cérebro também apresentava características normais, com neurônios apresentando núcleo redondo e nucléolo visível. Foram identificadas, também, células da glia com aspecto normal, identificadas pelo morfologia do núcleo (Figura 33-F).

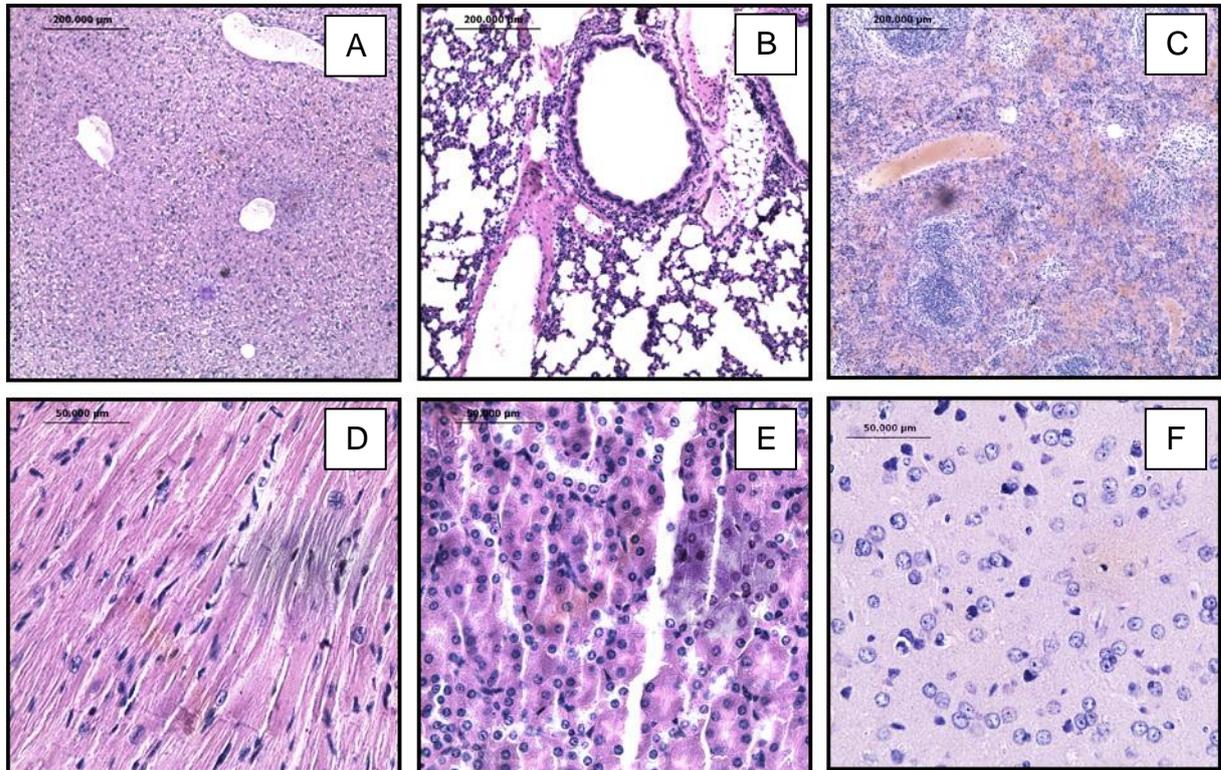


Figura 33: Fotomicrografia dos órgãos dos animais tratados com 100 µL de NCMagh-SE. O tratamento não alterou a histologia dos órgãos, em comparação com o grupo controle tratado com solução salina ou tratado com 50 µL de NCMagh-SE. Não foi identificada a ocorrência de metástase, nem presença de aglomerados amarronzados decorrentes da presença de ferro. (A) Fígado; (B) pulmão; (C) baço; (D) coração; (E) rim; (F) cérebro.

5.3.2. Etapa 2 - Avaliação da toxicidade e do efeito antitumoral do tratamento concomitante com nanocápsulas magnéticas de Selol (NCMagh-SE) e com o quimioterápico Paclitaxel, associado à exposição ao campo magnético alternado

Com base nos resultados da histopatologia dos tumores dos animais tratados na Etapa 1, decidiu-se avaliar os efeitos antitumorais do tratamento combinado de 100 µL de NCMagh-SE e Paclitaxel, associado à exposição ao campo magnético alternado.

Esta etapa representa um teste piloto, em que os animais foram submetidos a diferentes tratamentos (n = 3), conforme especificado na Figura 9, dos Materiais e Métodos.

5.3.2.1. Avaliação clínica dos animais

Não foram observadas alterações comportamentais e clínicas como diarreia, queda de pêlos e atividade motora diminuída ao longo de todo o experimento (22 dias), em todos os grupos estudados.

5.3.2.2. Peso dos animais

Os animais foram pesados nos dias da inoculação do tumor, dos tratamentos e da eutanásia. Não foram verificadas mudanças significativas no peso corporal dos animais, em nenhum dos grupos de tratamento, ao longo do experimento (Figura 34).

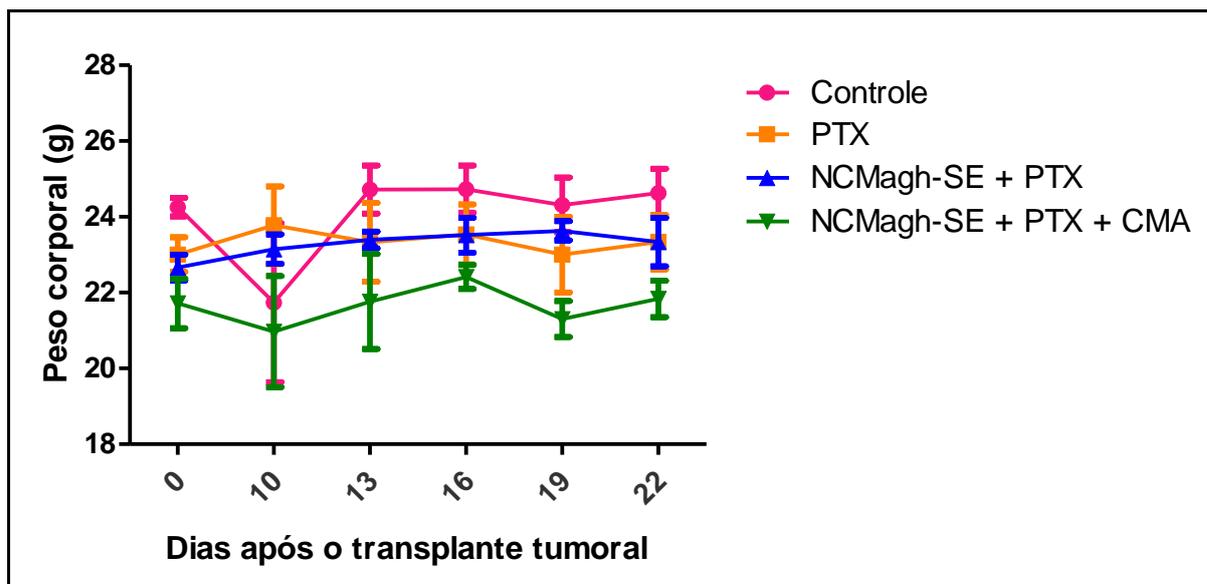


Figura 34: Média do peso corporal de camundongos ao longo de todo o período experimental. PTX - tratamento com Paclitaxel (10mg/Kg); NCMagh-SE - nanocápsulas magnéticas de Selol; CMA - campo magnético alternado. Os dados correspondem à média \pm EPM.

5.3.2.3. Análises hematológicas

Os resultados obtidos com as análises do hemograma dos camundongos portadores de tumor, submetidos a diferentes tipos de tratamento, estão apresentados nas Tabelas 7 e 8.

Não foi verificada nenhuma alteração estatisticamente significativa nas contagens global e diferencial de leucócitos entre os grupos estudados (Tabela 7). Ainda que os resultados não tenham sido significativos, foi observada leucopenia em todos os grupos de tratamento, em comparação com os valores de referência. Além disso, foi observada leve linfopenia em todos os grupos estudados, sendo mais intensa no grupo controle. Assim como na Etapa 1, foi observado aumento no percentual de monócitos + neutrófilos em todos os grupos de tratamento, porém de maneira menos intensa do que na etapa anterior. Foi identificada, também, diminuição intensa no percentual de eosinófilos nos animais do grupo controle, enquanto que os animais tratados apresentavam percentual de eosinófilos dentro dos valores de referência.

Tabela 7: Resultados do leucograma de camundongos BALB/c portadores de tumor, tratados com NCMagh-SE, Paclitaxel e campo magnético alternado.

Tratamento	Leucócitos ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	Linfócitos (%)	Monócito + Neutrófilos(%)	Eosinófilos (%)
Controle	10,87 \pm 0,77	46,53 \pm 3,07	53,23 \pm 8,99	0,23 \pm 0,08
PTX	10,43 \pm 0,92	57,83 \pm 3,85	39,67 \pm 4,59	2,5 \pm 1,33
NCMagh-SE 100μL + PTX	8,43 \pm 1,35	63,30 \pm 4,46	34,4 \pm 4,58	2,30 \pm 1,08
NCMagh-SE 100μL + PTX + CMA	6,73 \pm 0,86	61,60 \pm 0,57	35,10 \pm 1,06	3,30 \pm 0,94
Referência	12 a 13	65,9 a 77,9	16,7 a 19,6	2 a 2,7

Os dados correspondem à média \pm EPM. PTX - tratamento com Paclitaxel (10mg/Kg); NCMagh-SE - nanocápsulas magnéticas de Selol; CMA – campo magnético de frequência alternada. Os valores de referência correspondem a valores descritos por Vianna (2007).

Assim como na Etapa 1, na Etapa 2 foram verificadas poucas alterações nos padrões hematológicos em relação aos valores de referência, tendo sido mais evidentes a diminuição do hematócrito e o intenso aumento no número de plaquetas, em todos os grupos testados. Comparando-se os resultados entre os grupos estudados, não foi verificada diferença estatística em nenhum dos parâmetros avaliados (Tabela 8).

Tabela 8: Resultados dos exames hematológicos de camundongos BALB/c portadores de tumor, tratados com NCMagh-SE, Paclitaxel e campo magnético alternado.

Tratamento	Eritrócitos ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	Hemoglobina (g/dL)	Hematócrito (%)	MCV(fl)	MCH (pg)	MCHC (g/dL)	RDW %	Plaquetas ($\times 10^3/\mu\text{L}$)
Controle	9,28 \pm 0,10	13,53 \pm 0,13	32,63 \pm 0,20	35,17 \pm 0,16	14,60 \pm 0,09	41,47 \pm 0,17	15,30 \pm 0,10	867,67 \pm 17,39
PTX	9,10 \pm 0,08	13,33 \pm 0,08	32,60 \pm 0,24	35,83 \pm 0,05	14,63 \pm 0,05	40,90 \pm 0,12	15,10 \pm 0,13	857,00 \pm 34,59
NCMagh-SE 100μL + PTX	9,17 \pm 0,13	13,30 \pm 0,12	32,63 \pm 0,42	35,60 \pm 0,07	14,50 \pm 0,09	40,80 \pm 0,20	15,80 \pm 0,25	987,33 \pm 40,36
NCMagh-SE 100μL + PTX + CMA	7,76 \pm 0,75	11,17 \pm 1,00	27,83 \pm 2,71	35,83 \pm 0,05	14,47 \pm 0,13	40,33 \pm 0,42	15,50 \pm 0,39	632,67 \pm 134,40
Referência	7,30 a 10,50	12,00 a 15,00	35,00 a 50,00	-	-	-	-	497

Os dados correspondem à média \pm EPM. PTX - tratamento com Paclitaxel (10mg/Kg); NCMagh-SE - nanocápsulas magnéticas de Selol; CMA - campo magnético de frequência alternada. Os valores de referência correspondem a valores descritos por Vianna (2007).

5.3.2.4. Análises bioquímicas

Não houve diferença estatística entre os grupos de tratamento, em nenhum dos parâmetros analisados no soro dos camundongos. Os dados estão apresentados na Tabela 9.

Tabela 9: Resultados das dosagens bioquímicas no soro de camundongos BALB/c portadores de tumor, tratados com NCMagh-SE, Paclitaxel e campo magnético alternado.

Tratamento	Uréia (mg/dL)	Creatinina (mg/dL)	Bilirrubina Total (mg/dL)	Bilirrubina Direta (mg/dL)	Bilirrubina Indireta (mg/dL)	Fosfatase Alcalina (UI/L)	GGT (UI/L)	ALT (UI/L)	AST (UI/L)
Controle	55,67 ± 2,91	0,10 ± 0,00	0,04 ± 0,01	0,04 ± 0,01	0,01 ± 0,00	65,33 ± 2,85	1,00 ± 0,58	21,33 ± 2,73	81,33 ± 10,41
PTX	47,67 ± 2,34	0,03 ± 0,03	0,04 ± 0,00	0,03 ± 0,00	0,01 ± 0,00	72,00 ± 7,82	1,33 ± 0,33	24,00 ± 1,73	125,67 ± 31,24
NCMagh-SE 100µL + PTX	49,33 ± 3,93	0,10 ± 0,00	0,05 ± 0,00	0,04 ± 0,00	0,01 ± 0,00	80,00 ± 5,01	1,33 ± 0,33	27,00 ± 3,22	75,67 ± 6,90
NCMagh-SE 100µL + PTX + CMA	46,67 ± 1,45	0,10 ± 0,06	0,04 ± 0,01	0,03 ± 0,01	0,01 ± 0,00	69,67 ± 4,81	1,00 ± 0,58	23,67 ± 0,88	83,67 ± 7,18

Os dados correspondem à média ± EPM. PTX - Paclitaxel (10mg/Kg). NCMagh-SE - nanocápsulas magnéticas de Selol; GGT – gama-glutamil transferase; ALT – alanina transaminase; AST – aspartato transaminase.

5.3.2.5. Análise genotóxica

A avaliação do potencial genotóxico dos diferentes tratamentos, foi realizada por meio da análise de fragmentação do DNA de células da medula óssea.

Como pode ser observado na Figura 35, o percentual de DNA fragmentado nos animais tratados somente com Paclitaxel (21,1% \pm 0,7) foi maior em comparação a todos os outros grupos, ainda que não tenha sido significativo ($p=0,055$ em relação ao grupo controle). Porém, foi observada diminuição neste percentual quando o tratamento com Paclitaxel era combinado com a administração intratumoral de 100 μ L de NCMagh-SE (17,4% \pm 0,7). Diminuiu ainda mais quando os animais eram também expostos ao campo magnético de frequência alternada (13,1% \pm 2,3).

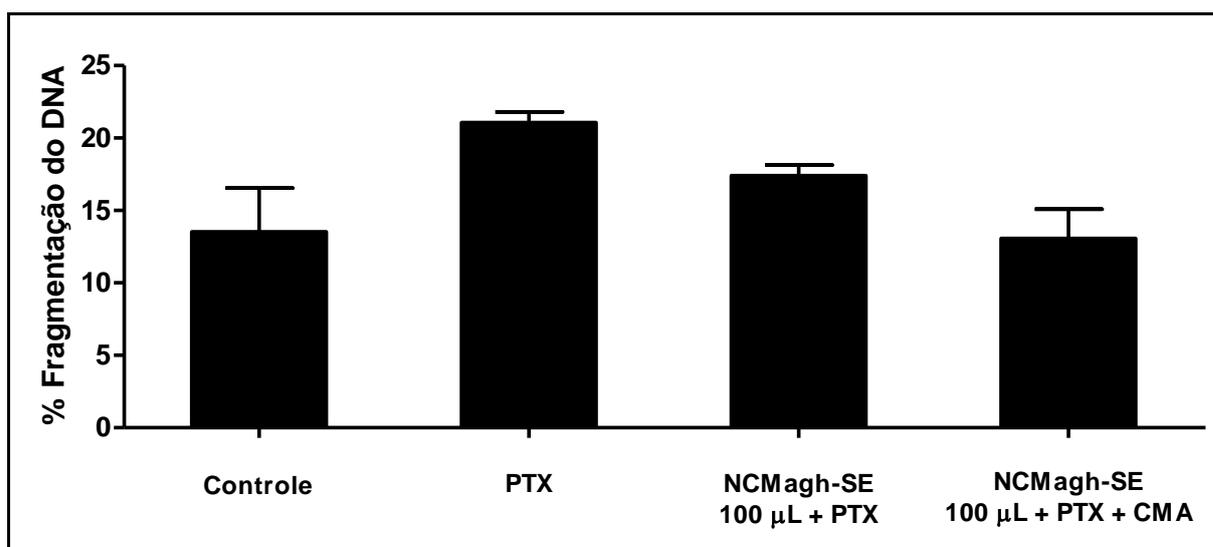


Figura 35: Efeito de diferentes tratamentos sobre a fragmentação do DNA, em células da medula óssea de camundongos portadores de adenocarcinoma mamário. PTX - tratamento com Paclitaxel (10mg/Kg); NCMagh-SE - nanocápsulas magnéticas de Selol; CMA - campo magnético de frequência alternada. Os dados correspondem à média \pm EPM.

5.3.2.6. Volume e peso dos tumores

O tratamento com NCMagh-SE diminuiu o volume (Figura 36) e o peso (Figura 37) do tumor, embora as alterações não tenham sido significativas estatisticamente. A diminuição do volume e do peso tumoral foi ainda mais evidente nos animais

tratados com NCMagh-SE e expostos ao campo magnético de frequência alternada. Os animais deste grupo apresentaram volume e peso tumoral aproximadamente 70% e 55% menor, respectivamente, do que o grupo controle tratado com solução salina.

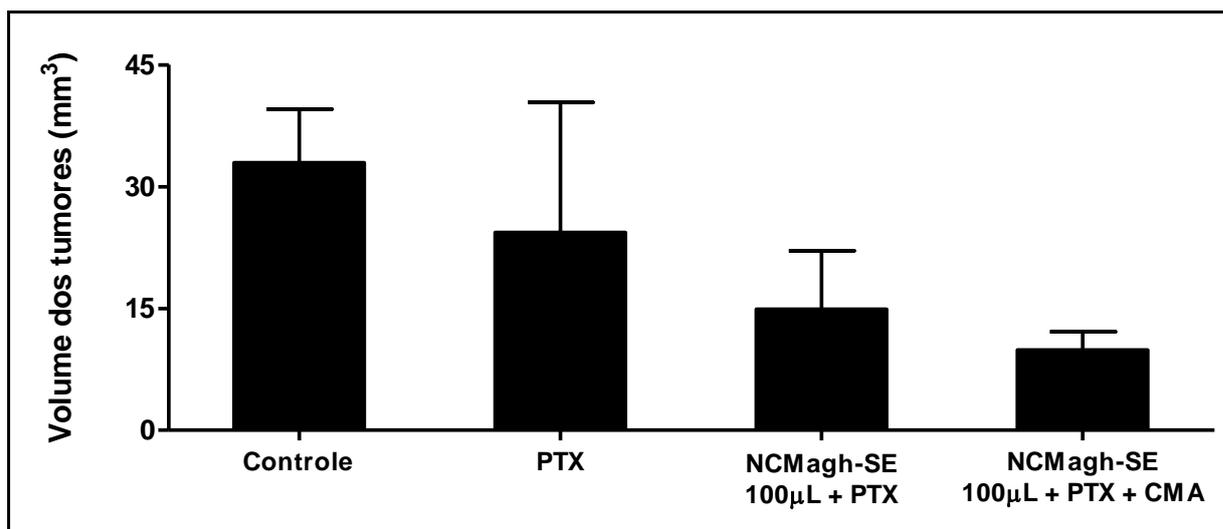


Figura 36: Avaliação do volume (mm³) dos tumores coletados dos camundongos, após 22 dias da inoculação das células tumorais. PTX - tratamento com Paclitaxel (10mg/Kg); NCMagh-SE - nanocápsulas magnéticas de Selol; CMA - campo magnético de frequência alternada. As barras correspondem à média \pm EPM.

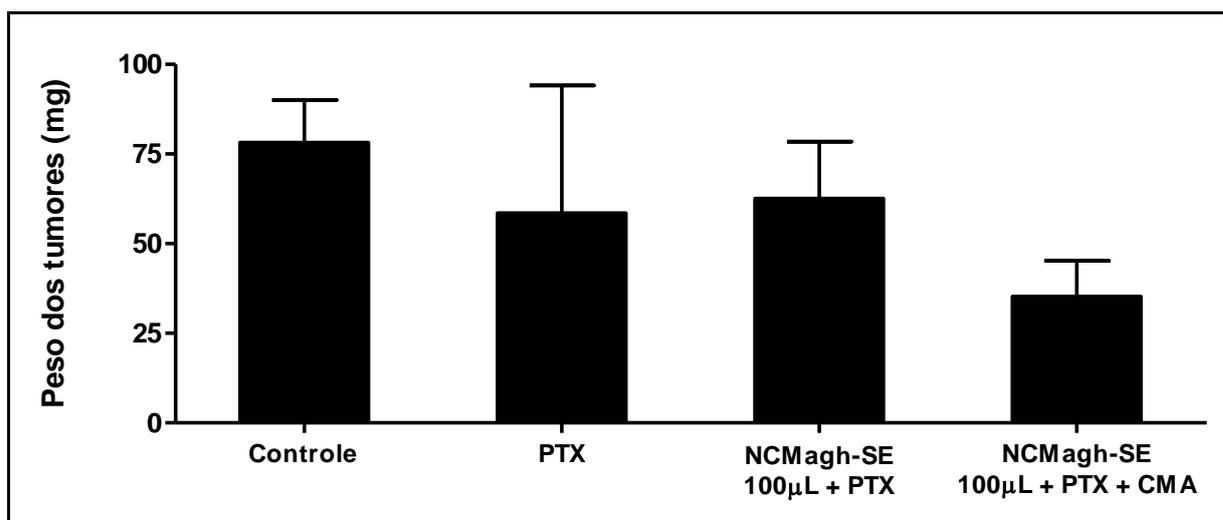


Figura 37: Avaliação do peso (mg) dos tumores coletados dos camundongos, após 22 dias da inoculação das células tumorais. PTX - tratamento com Paclitaxel (10mg/Kg); NCMagh-SE - nanocápsulas magnéticas de Selol; CMA - campo magnético de frequência alternada. As barras correspondem à média \pm EPM.

5.3.2.7. Análises macroscópicas dos tumores

Assim como na Etapa 1, todos os animais desenvolveram tumor na glândula mamária, após inoculação das células 4T1. A Figura 38 apresenta imagens ilustrativas dos tumores em cada um dos grupos experimentais, mostrando que os animais tratados com NCMagh-SE em conjunto com Paclitaxel e expostos ao campo magnético de frequência alternada (Figura 38-D) apresentavam tumores menores em comparação com os animais dos grupo controle (Figura 38-A), Paclitaxel (Figura 38-B), e tratado com NCMagh-SE associado com Paclitaxel porém sem exposição ao campo magnético alternado (Figura 38-C). Além disso, ao exame macroscópico, é possível verificar a presença de áreas amarronzadas nos tumores dos animais tratados com a amostra NCMagh-SE (Figura 38 - C e D).

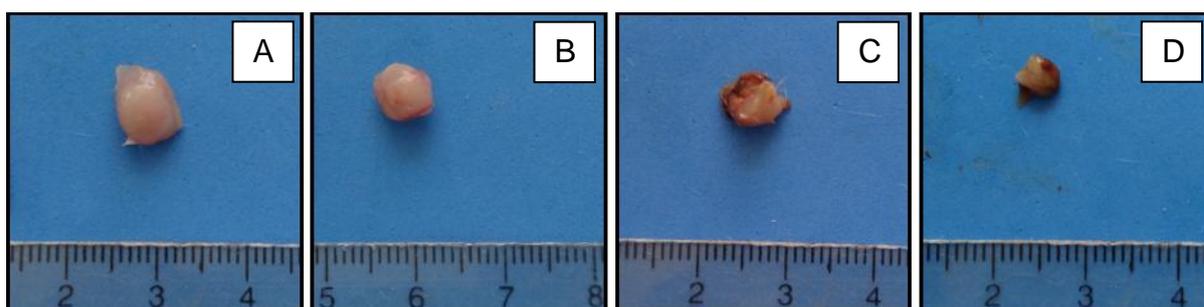


Figura 38: Fotografias de adenocarcinomas mamários, coletados após 22 dias da inoculação do tumor, em animais submetidos a diferentes tratamentos. Tumor de camundongos (A) do grupo controle; tratados com (B) Paclitaxel (10 mg/Kg); (C) 100 μ L de NCMagh-SE e Paclitaxel via intratumoral; (D) 100 μ L de NCMagh-SE e Paclitaxel via intratumoral, associado à exposição ao campo magnético de frequência alternada.

6. DISCUSSÃO

Nesta pesquisa, uma nova amostra composta por nanocápsulas magnéticas de Selol (NCMagh-SE) foi caracterizada e a sua toxicidade, *in vitro* e *in vivo*, foi avaliada, assim como a sua eficácia como agente antitumoral para tratamento do câncer de mama experimental.

Considerando que tanto o Selol quanto as nanopartículas magnéticas podem apresentar efeito antitumoral, pressupõe-se que o co-encapsulamento de ambos em um sistema carreador represente uma formulação com potencial para o tratamento do câncer, especialmente quando associada ao tratamento quimioterápico e à magnetohipertermia.

6.1. CONSIDERAÇÕES SOBRE A AMOSTRA NCMagh-SE E SEUS CONTROLES (NCMagh e NCSE)

Diversos nanomateriais têm sido desenvolvidos para aplicações biomédicas, tanto para diagnóstico, quanto para o tratamento de várias doenças (PRADAN *et al.*, 2010; ESTEVANATO *et al.*, 2011; CONDE; DORIA; BAPTISTA, 2012). Dentre estes nanomateriais, podem ser incluídas as nanocápsulas magnéticas, que além de serem úteis sistemas carreadores de fármacos (DANHIER *et al.*, 2012), também podem ser utilizados para aplicação da técnica de magnetohipertermia (PRADHAN *et al.*, 2010; KULSHRESTHA *et al.*, 2012), assim como serem utilizados nos exames de imagem (COLOMBO *et al.*, 2012).

As características físico-químicas dos nanossistemas, como a composição química do núcleo e da cobertura, o tamanho e as cargas de superfície influenciam os seus efeitos biológicos e a sua biodistribuição (DOBROVOSKAIA; MCNEIL, 2007; ACHARYA; SAHOO, 2011). Por exemplo, nanoestruturas com diâmetro maior que 300 nm e menor que 70 nm são rapidamente depuradas da corrente sanguínea por células do sistema fagocitário mononuclear, limitando a sua distribuição e a sua chegada ao local de interesse (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003). Geralmente as nanopartículas poliméricas, como as nanocápsulas, apresentam diâmetros entre 100

e 300 nm. Nesta pesquisa, foram utilizadas nanocápsulas magnéticas de Selol (NCMagh-SE) apresentando diâmetro médio de 235,8 nm nas análises por MET e diâmetro hidrodinâmico de 244,1 nm nas análises por DLS. Estas características, permitem que este material permaneça por mais tempo na circulação. É importante ressaltar, que a amostra NCMagh-SE apresentou um índice de polidispersividade (PDI) relativamente baixo, de 0,23, considerado satisfatório para uma população de partículas monodispersas. O PDI abaixo de 0,3 é fundamental para evitar embolia e para aumentar a taxa de aquecimento no caso da magnetohipertermia (KHANDHAR *et al.*, 2011, 2012).

O tamanho das NPM também pode influenciar a sua resposta ao campo magnético. NPM com diâmetro variando entre 6 e 10 nm, por exemplo, apresentam alta susceptibilidade magnética (HEATH; DAVIS, 2008). Objetivando a indução da magnetohipertermia, nanopartículas de maghemita com diâmetro médio de 10 nm, de acordo com as observações por MET, foram utilizadas na síntese das nanocápsulas magnéticas testadas neste trabalho. As mesmas nanopartículas de maghemita utilizadas na síntese das nanocápsulas magnéticas (NCMagh-SE e NCMagh) foram também utilizadas para desenvolver polímeros de albumina magnéticos, que apresentaram alta susceptibilidade magnética (FIGUEIREDO, 2009; LACAVA, 2010), biocompatibilidade *in vivo* (ESTEVANATO *et al.*, 2011) e foram capazes de induzir necrose tumoral em camundongos submetidos ao campo magnético alternado (PORTILHO *et al.*, 2011).

Nas análises por DLS, foi verificado um pequeno aumento no diâmetro hidrodinâmico de NCMagh-SE ($244,1 \pm 2,3$ nm), que continha nanopartículas de maghemita e Selol, em comparação à amostra de NCSE ($212,5 \pm 3,2$ nm), que continha apenas Selol. De acordo com Schaffazick *et al.* (2003), o encapsulamento de nanopartículas ou de fármacos pode ou não alterar o diâmetro médio das nanocápsulas. Já o diâmetro hidrodinâmico encontrado para a amostra NCMagh ($948,5 \pm 109,2$ nm), foi consideravelmente superior aos encontrados para as amostras NCMagh-SE e NCSE. Este aumento provavelmente ocorreu devido à agregação de NCMagh, como evidenciado pelas análises ao MET, possivelmente mediada pelas NPM na superfície externa das nanocápsulas, indicando a instabilidade desta amostra.

A estabilidade de nanomateriais também pode ser avaliada por meio da medição do potencial zeta. Quanto mais alto o valor do potencial zeta, em módulo, maior é a estabilidade físico-química da amostra (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003). O baixo valor de potencial zeta da amostra NCMagh (-11,7 mV), em comparação com NCMagh-SE (20,1 mV) e NCSE (-28,6 mV), corroboram com os resultados encontrados nas análises por MET e DLS, sugerindo que a baixa estabilidade de NCMagh induziu à agregação das nanocápsulas.

Vale ressaltar que a tendência à agregação e sedimentação das nanopartículas pode ser determinada pelas mudanças na distribuição de tamanho das partículas (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003). Falqueiro *et al.* (2011), verificou que o armazenamento de NCMagh-SE, por 3 meses, a 4°C, não alterou o tamanho das nanocápsulas e nem o potencial zeta das amostras, nas análises realizadas por DLS e zeta sizer, respectivamente.

As análises do potencial zeta também são utilizadas para determinação da carga das amostras e revelaram que NCMagh-SE apresenta carga positiva, enquanto que NCMagh e NCSE apresentam carga negativa, usualmente observada nas formulações de PLGA (DANHIER *et al.*, 2012). Uma vez que o Selol apresenta carga positiva (SUCHOCKI *et al.*, 2007) e nanopartículas preparadas em pH ácido também apresentam carga positiva (MORAIS *et al.*, 2001), a co-encapsulação de Selol e maghemita sobrepôs a carga negativa do PLGA. Mura *et al.* (2011) sintetizou nanopartículas catiônicas de PLGA, utilizando um composto com vários grupamentos amina livres e, após ligação com PLGA, alguns grupamentos permaneceram livres, conferindo carga positiva às nanopartículas poliméricas. As análises ao MET, sugerem que a presença de Selol aumenta o encapsulamento das nanopartículas de maghemita, em comparação com a amostra NCMagh-SE, provavelmente devido a ligações químicas entre o Selol, o PLGA e as nanopartículas de maghemita.

As cargas de superfície também têm importante influência na interação das nanopartículas com as células. As nanopartículas catiônicas são mais interiorizadas pelas células, do que partículas aniônicas, uma vez que promovem maior interação com as células, que apresentam membrana carregada negativamente (MATSUOKA *et al.*, 2004; DANHIER *et al.*, 2012).

6.2. CONSIDERAÇÕES SOBRE OS TESTES *IN VITRO*

Os estudos *in vitro* foram realizados utilizando-se células de adenocarcinoma mamário murino (4T1) e humano (MCF-7) e células normais de mama (MCF-10A), para avaliação da citotoxicidade de NCMagh-SE e seus controles. Este foi o primeiro estudo *in vitro*, utilizando materiais à base de Selol, em que foi comparado o efeito em células tumorais e normais.

A linhagem 4T1, um modelo de adenocarcinoma mamário derivado de tumor espontâneo em camundongos BALB/c, é um excelente modelo para estudos comparativos *in vitro* e *in vivo*, uma vez que pode ser cultivada *in vitro* e é facilmente transplantável *in vivo* (PULASKI; OSTRAND-ROSENBERG, 2001; CARNEIRO *et al.*, 2011). Desta forma, a linhagem 4T1 foi escolhida para comparação do tratamento com NCMagh-SE em cultura de células e em camundongos portadores de tumor.

Foram avaliados, também, os efeitos de NCMagh-SE em células MCF-7, para comparação entre linhagem murina e humana. Células da linhagem MCF-7 são originárias de efusão pleural de carcinoma ductal invasivo (SOULE *et al.*, 1973).

Para comparação dos efeitos citotóxicos entre células normais e tumorais de mama, foram utilizadas células da linhagem MCF-10A, um modelo de células normais do epitélio mamário humano. Estas células foram isoladas a partir de doença fibrocística da mama e imortalizadas espontaneamente (SOULE *et al.*, 1990).

As doses de NCMagh-SE utilizadas na avaliação da citotoxicidade pelo método do MTT, foi determinada baseando-se nos estudos de Suchocki *et al.* (2007), que mostrou que o IC₅₀ de células leucêmicas humanas (HL-60), após 72 horas de exposição ao Selol livre, era de aproximadamente 400 µg/mL de Selol. Considerando que a incorporação de nanopartículas magnéticas pode aumentar a citotoxicidade de NCMagh-se e que a viabilidade celular pode ser reduzida ainda mais sob ação do campo magnético alterado, foram selecionadas outras quatro concentrações abaixo do valor de IC₅₀ encontrado por Suchocki *et al.*, (2007).

Os estudos *in vitro* mostraram que NCMagh-SE induz toxicidade dose e tempo dependente. Os resultados encontrados estão de acordo com estudos prévios, que mostraram que nanopartículas de selênio foram citotóxicas para células de carcinoma mamário humano, das linhagens MDA-MB-31 (LUO *et al.*, 2012) e

MCF-7 (YANG *et al.*, 2012); células de carcinoma cervical humano (HeLa) (LUO *et al.*, 2012); células de melanoma (A375) (LUO *et al.*, 2012); e células de carcinoma hepático humano (Bel7402) (TAN *et al.*, 2009). A citotoxicidade de NCMagh-SE, de maneira dose dependente, também foi verificada por Falqueiro *et al.* (2011), em células de melanoma humano, da linhagem B16-F10.

A citotoxicidade induzida por NCMagh-SE foi dependente, também, da linhagem celular. A exposição por 48 horas às concentrações mais baixas de NCMagh-SE [25 µg/mL de Selol + $1,25 \times 10^9$ partículas/mL (1X) e 50 µg/mL de Selol + $2,5 \times 10^9$ partículas/mL (2X)], diminuiu significativamente a viabilidade das células tumorais de mama (4T1 e MCF-7), em aproximadamente 38%, porém não alterou estatisticamente a viabilidade das células normais (MCF-10A). A maior sensibilidade das células neoplásicas ao tratamento com NCMagh-SE, em relação às células normais, também foi demonstrada pelo valor do IC₅₀. Porém a sensibilidade das células normais à exposição a NCMagh-SE aumenta consideravelmente com o decorrer do tempo. Em pesquisas anteriores foi verificado que nanopartículas de selênio apresentaram maior toxicidade a células tumorais do que a células normais. Chen *et al.* (2008), por exemplo, mostraram que células de melanoma (A375), de carcinomas hepatocelular (HepG2), mamário (MCF-7) e nasofaríngeo (CNE2) foram no mínimo quatro vezes mais sensíveis à exposição por 72 horas a nanopartículas de selênio, do que células normais de fibroblasto (Hs68). Yang *et al.* (2012), também verificaram que células das linhagens A375, MCF-7, MCG-63 (osteosarcoma) e HeLa-229 (carcinoma cervical humano) apresentavam IC₅₀ em média cinco vezes menor do que de células renais normais de humanos (linhagem HK-2).

Nesta pesquisa, as amostras controle, NCMagh e NCSE, reduziram a viabilidade das células tumorais (4T1 e MCF-7) em todas as concentrações avaliadas, mostrando o efeito citotóxico e intrínscico do Selol e das NPM como agentes antitumorais. Vale ressaltar que o efeito antiproliferativo de NCMagh-SE, principalmente na linhagem MCF-7, foi mais intenso do que o induzido pelo quimioterápico Paclitaxel, utilizado no tratamento do câncer de mama. Entretanto, em relação às células normais (MCF-10A), o tratamento com NCSE foi citotóxico apenas após 48 horas de exposição às concentrações mais altas [200 µg/mL (8X) e 400 µg/mL (16X) de Selol], indicando que apenas em excesso e períodos prolongados, o selênio é tóxico para as células normais. Além disso, NCMagh foi

mais citotóxico às células normais do que NCMagh-SE, sugerindo que o Selol pode induzir um efeito protetor às células normais.

A citotoxicidade de nanocápsulas de PLGA vazias não foi avaliada no nosso estudo, porém foi verificado por Falqueiro *et al.* (2011), responsáveis pela síntese das amostras NCMagh-SE, NCMagh e NCSE utilizadas nesta pesquisa, que nanocápsulas vazias não induzem citotoxicidade às células de melanoma. Segundo Danhier *et al.* (2012), o PLGA é um dos melhores polímeros biodegradáveis, uma vez que sua hidrólise produz ácido láctico e ácido glicólico, que são facilmente metabolizados pelo organismo, induzindo mínima toxicidade sistêmica.

Em geral, as células neoplásicas apresentam metabolismo mais rápido do que as células normais, demandando maior quantidade de nutrientes, como ferro, que pode ser evidenciado pela presença de maior quantidade de receptores de transferrina nestas células (KWOK; RICHARDSON, 2002). Isso pode explicar as evidências obtidas nas análises de microscopia de luz, após a coloração de Perls, em que NCMagh-SE é mais captado pelas células tumorais do que pela células normais, resultando na maior toxicidade às células tumorais verificada pelos testes colorimétricos do MTT. Além disso, a membrana das células tumorais é mais permeável, o que permite maior internalização de NCMagh-SE pelas células das linhagens 4T1 e MCF-7. Nenhuma alteração morfológica foi observada, possivelmente porque as análises foram realizadas somente nas células aderidas às placas, uma vez que são realizadas diversas lavagens para retirada da amostra da placa, o que promove a retirada das células mortas, bem como das células que apresentam aderência diminuída. Vale ressaltar que foram observadas menor quantidade de células, principalmente das tumorais, que estavam aderidas às placas, com o aumento da concentração de amostra utilizada.

A indução de apoptose em células neoplásicas é um importante foco das pesquisas com novas drogas quimioterápicas (LU *et al.*, 2011) e já foi descrita como um importante mecanismo de ação antitumoral de compostos de selênio (LU *et al.*, 1994; LI *et al.*, 2007; SHANG *et al.*, 2011). A marcação celular por Anexina-V é um indicativo da exposição de fosfatidilserina na membrana plasmática, um evento relacionado à apoptose (CARNEIRO *et al.*, 2011). O tratamento com NCMagh-SE (2X e 8X) aumentou, de maneira dose dependente, o percentual de células marcadas positivamente para Anexina-V. Estes resultados estão de acordo com Suchocki *et al.*

(2007) que observaram que o Selol induz apoptose de células leucêmicas humanas. Embora Valdiglesias *et al.* (2010) relate que a indução de apoptose por compostos de selênio pode estar relacionada à alterações no ciclo celular, Suchocki *et al.* (2007) verificou que o tratamento com Selol livre não interfere no ciclo celular de células leucêmicas humanas.

A fragmentação do DNA é também um importante marcador da apoptose. O aumento na fragmentação do DNA foi observado após o tratamento de células tumorais com NCMagh-SE, corroborando com os resultados encontrados na análise da exposição de fosfatidilserina. A indução de fragmentação do DNA também foi descrita por Suchocki *et al.* (2007), avaliando os efeitos de Selol em células leucêmicas humanas.

Considerando que as amostras magnéticas também podem ser utilizadas para aplicação da magnetohipertermia, as células tratadas com NCMagh-SE também foram expostas ao campo magnético alternado e o efeito citotóxico deste tratamento foi avaliado. A metodologia empregada foi baseada em experimentos *in vitro* anteriores, utilizando o mesmo equipamento gerador de campo magnético usado neste estudo (SIMIONI *et al.*, 2007; FALQUEIRO *et al.*, 2012). Nossos resultados demonstraram que a exposição ao campo magnético reduziu a viabilidade das células neoplásicas de maneira dependente da quantidade de NCMagh-SE administrada. O campo magnético alternado foi fundamental para redução na viabilidade das células 4T1, previamente incubadas por 4 horas com NCMagh-SE. Enquanto que as células da linhagem MCF-7 tiveram sua viabilidade reduzida após o tratamento com NCMagh-SE, independente da exposição ao campo magnético. Porém, sob ação do campo magnético, a viabilidade celular foi ainda menor, atingindo 48,22% de células viáveis. O aumento da temperatura induzido pela exposição ao campo magnético alternado pode aumentar a permeabilidade da membrana, aumentando assim a internalização dos nanossistemas e, conseqüentemente, o efeito antitumoral. Além disso, como o PLGA é termosensível, o aumento da temperatura pode aumentar a liberação do Selol e das nanopartículas de maghemita das nanocápsulas de PLGA, diminuindo ainda mais a viabilidade celular.

Diferentemente dos nossos resultados, Falqueiro *et al.* (2012), mostrou que a exposição por 3 horas, à concentração de 100 µg/mL + 5×10^{12} partículas/mL de

NCMagh-SE, não alterou a viabilidade de células de melanoma murino (B16-F10) e de carcinoma de células escamosas oral (OSCC), expostas ou não ao campo magnético, embora o número de nanopartículas de maghemita tenha sido maior (5×10^{12} partículas/mL) do que o empregado no nosso estudo (5×10^9 partículas/mL), evidenciando as diferenças na sensibilidade entre os tipos celulares. No estudo de Falqueiro *et al.* (2012), a amostra NCMagh-SE, associada ou não ao campo magnético, foi citotóxica às células de melanoma e às células de carcinoma bucal, apenas em concentrações mais altas do que as avaliadas nesta pesquisa, mostrando a maior sensibilidade das células tumorais de mama ao tratamento com NCMagh-SE. Como esperado, a aplicação do campo magnético sozinho não foi citotóxico, mostrando que a presença de nanopartículas magnéticas é essencial para aumento da temperatura induzido pelo campo magnético de frequência alternada.

6.3. CONSIDERAÇÕES SOBRE OS TESTES *IN VIVO*

Os testes *in vitro* foram realizados em camundongos da linhagem BALB/c portadores de tumor. Para indução do tumor, células de adenocarcinoma mamário murino, linhagem 4T1, foram transplantadas seguindo o protocolo estabelecido por Carneiro (2011). Esta linhagem celular apresenta várias características que a tornam interessante para estudos *in vivo*. Primeiramente, as células são facilmente transplantáveis para a glândula mamária, crescendo ortotopicamente. Segundo, é um dos poucos modelos experimentais capazes de desenvolver metástases nos mesmos locais afetados pelo câncer de mama em humanos, incluindo linfonodos, fígado, pulmões, cérebro e ossos. Além disso, permite a comparação entre os estudos *in vitro* e *in vivo* (PULASKI; OSTRAND-ROSENBERG, 2001).

O transplante ortotópico das células da linhagem 4T1 foi realizado de maneira adequada, como confirmado por análises histológicas, que demonstraram a invasão do tecido mamário normal (ductos e tecido adiposo, principalmente), por células neoplásicas. Diferentemente das induções subcutâneas, o transplante e o estudo de tumores ortotópicos reproduzem o local de desenvolvimento inicial dos tumores humanos e podem induzir metástases nos mesmos locais em que se desenvolvem

nos cânceres humanos (BIBBY, 2004). Kuo *et al.* (1993) mostraram a efetividade da cisplatina no tratamento do modelo *in vivo* de câncer de pulmão de pequenas células (SCLC) que, porém, não era eficiente quando a indução tumoral era realizada via subcutânea.

Considerando que diversos estudos já demonstraram o potencial do uso de compostos de selênio como agente antitumoral (BROZMANOVÁ *et al.*, 2010; LUO *et al.*, 2012; YAZDI *et al.*, 2012), inclusive do Selol, em estudos *in vitro* (SUCHOCKI *et al.*, 2007; DUDKIEWICZ-WILCZYNSHA *et al.*, 2011), um dos objetivos desta pesquisa foi avaliar o efeito antitumoral e a toxicidade de Selol encapsulado na amostra NCMagh-SE, uma vez que, em excesso, compostos de selênio podem ter efeito contrário, induzindo o processo de carcinogênese e provendo danos ao DNA (LUO *et al.*, 2012).

Além disso, já tendo sido observado que compostos de selênio podem aumentar a eficácia terapêutica de alguns quimioterápicos, uma vez que protege o tecido normal contra a toxicidade destes medicamentos (LI *et al.*, 2007; CHEN; WONG; ZHENG, 2009; SONG *et al.*, 2009), além de potencializar o efeito antitumoral (VADGAMA *et al.*, 2000; LI *et al.*, 2007, 2009; TAN *et al.*, 2009), outro objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito antitumoral de NCMagh-SE, em combinação com o quimioterápico Paclitaxel.

O Paclitaxel é um quimioterápico utilizado no tratamento do câncer de mama metastático e de ovário. É um representante dos taxanos, extraído da planta *Taxus brevifolia*. O mecanismo de ação do Paclitaxel envolve o bloqueio da formação do fuso mitótico, bloqueando assim o ciclo celular e, conseqüentemente, impedido a divisão celular e a proliferação das células tumorais (SINGLA; GARG; AGGARWAL, 2002; DANHIER *et al.*, 2009; JAVEED *et al.*, 2009). Dentre as reações adversas induzidas por este quimioterápico, podemos citar a diminuição no número total de leucócitos, neutrófilos e plaquetas. A dose de Paclitaxel utilizada nos nossos estudos *in vivo* (10 mg/Kg), foi baseada em testes prévios em camundongos (SOMA *et al.*, 2009; HUANG *et al.*, 2010).

Nesta pesquisa, a aplicação de NCMagh-SE foi realizada via intratumoral, descrita em vários estudos (HILGER *et al.*, 2001; RICHTER *et al.*, 2010; DUTZ *et al.*, 2011; CHEN *et al.*, 2012). A administração intratumoral aumenta a concentração da droga no local de interesse, além de minimizar os danos aos tecidos normais.

Os experimentos *in vivo* foram divididos em duas etapas. Na Etapa 1, foram avaliados os efeitos induzidos pelo tratamento com NCMagh-SE, associado ou não ao tratamento com o quimioterápico Paclitaxel. Enquanto que na Etapa 2, foram avaliados os efeitos induzidos pelo tratamento com NCMagh-SE combinado ao tratamento com Paclitaxel e à exposição ao campo magnético alternado.

6.3.1. Considerações sobre os resultados encontrados na Etapa 1

A avaliação da toxicidade e do efeito antitumoral de NCMagh-SE, associado ou não ao tratamento com Paclitaxel, foi realizada nesta etapa. Para verificação dos efeitos da dose de NCMagh-SE, os animais foram tratados com 50 μ L (0,5 mg de Selol + $2,5 \times 10^{10}$ partículas) ou 100 μ L (1 mg de Selol + 5×10^{10} partículas) de NCMagh-SE, baseando-se nos resultados obtidos por Jaztrzebski *et al.* (1995). Estes autores testaram diversas concentrações de Selol, administrado via oral, subcutânea ou intraperitoneal em ratos, e verificaram que a DL_{50} era de 100 mg/Kg quando o Selol era administrado oralmente. Porém, testes realizados com até 100 mg/Kg via intraperitoneal e com até 500 mg/Kg via subcutânea não permitiram determinar a DL_{50} do Selol, devido à sua baixa toxicidade. Baseando-se nestes resultados, optou-se por utilizar a quantidade máxima de amostra que era possível administrar via intratumoral, sem que a mesma extravasasse. Desta forma, os animais foram tratados com 100 μ L de NCMagh-SE e, para avaliar o efeito da dose no tratamento, avaliamos também o efeito antitumoral e a toxicidade quando o tratamento era realizado com 50 μ L de amostra.

Os animais de todos os grupos experimentais, inclusive os tratados com Paclitaxel, não apresentaram qualquer alteração clínica ou comportamental, como alteração no peso corporal, queda de pêlo, diarreia e letargia, ao longo de todo o experimento. Esses resultados estão de acordo com Li *et al.* (2009), que verificaram que compostos orgânicos de selênio não são tóxicos a camundongos na dose diária de até 200 μ g. Como a amostra de NCMagh-SE é preparada com Selol contendo 5% de selênio na sua composição, os animais foram tratados com 25 μ g ou 50 μ g de selênio a cada três dias, quando receberam NCMagh-SE via intratumoral nas doses de 50 μ L ou 100 μ L, respectivamente.

A toxicidade de diversas substâncias pode ser avaliada por meio de análises hematológicas, bioquímicas, histológicas, dentre outras. O hemograma é um dos exames mais utilizados para avaliação dos leucócitos, eritrócitos e plaquetas, como forma de identificar processos inflamatórios e alérgicos, por exemplo (PORTILHO, 2011).

O leucograma é a parte do hemograma que avalia os leucócitos, sendo os linfócitos, a população celular mais freqüente no sangue periférico de camundongos (PORTILHO, 2011). O tratamento com NCMagh-SE, associado ou não ao tratamento combinado com Paclitaxel (10 mg/Kg) injetado via intravenosa, não alterou significativamente o leucograma dos animais em relação ao grupo controle tratado com salina, e nem entre os grupos de tratamento. Entretanto, em comparação com os valores de referência citados por Vianna (2007), houve intensa leucocitose em todos os animais analisados, assim como inversão na proporção de linfócitos e monócitos/neutrófilos. O aumento de leucócitos em todos os animais provavelmente foi em decorrência da própria existência do tumor ou devido aos processos inflamatórios envolvidos nesta doença. Carneiro (2011) também verificou intensa leucocitose em camundongos BALB/c portadores de adenocarcinoma mamário induzido com células 4T1, tanto em animais controle que não receberam nenhum tratamento, quanto em animais tratados com amostras baseadas em citrato de ródio. Este aumento no número de leucócitos, observado por Carneiro *et al.* (2011), assim como no nosso estudo, foi acompanhado pela diminuição no número de linfócitos e aumento no número de monócitos/neutrófilos. Resultados similares também foram encontrados por Portilho (2011) em camundongos portadores de carcinoma mamário de Ehrlich. A diminuição de linfócitos parece estar relacionada ao aumento do estresse oxidativo que ocorre em uma grande variedade de tumores, em decorrência da diminuição de enzimas antioxidantes (AMES; SHIGENAGA; HAGEN, 1993; DURSUN *et al.*, 2006).

Embora não tenham ocorrido alterações estatisticamente significantes no percentual de eosinófilos, entre os grupos de tratamentos, foi observado aumento desta população celular nos animais tratados com NCMagh-SE e/ou Paclitaxel, em relação aos valores de referência; enquanto os animais do grupo controle permaneceram com níveis de eosinófilos de acordo com os valores de referência. Com base nestes resultados, a administração de NCMagh-SE pode estar

relacionada ao aparecimento de reações alérgicas. A ocorrência de reações de hipersensibilidade decorrentes da administração de Paclitaxel, já é bem estabelecida e ocorre devido, principalmente, ao solvente Cremophor®, existente na composição deste quimioterápico. O aumento no percentual de eosinófilos no sangue e no tecido tumoral tem sido associado tanto a um bom prognóstico (ALI; KAUR; PATEL, 2000; CORMIER *et al.*, 2006), quanto a um prognóstico ruim por estar relacionada ao desenvolvimento de metástases (MAN *et al.*, 2011).

A análise do eritrograma é também um importante meio de avaliar a toxicidade do tratamento. A avaliação, em conjunto, do número de eritrócitos, da quantidade de hemoglobina e do hematócrito, são utilizados para verificar a ocorrência de anemia. O hematócrito corresponde ao percentual de sangue que é ocupado pelas hemácias, enquanto que a hemoglobina, é utilizada para verificar o transporte de oxigênio. Estes três parâmetros são utilizados para calcular os valores de VCM, HCM, MCHC e RDW. O VCM (volume corpuscular médio) resulta da divisão do hematócrito pelo número total de eritrócitos e indica o volume das hemácias. Este dado ajuda a diferenciar os vários tipos de anemia. O HCM (hemoglobina corpuscular média) é calculado dividindo-se a concentração de hemoglobina pelo número total de eritrócitos e indica o peso da hemoglobina em cada hemácia. O CHCM (concentração de hemoglobina corpuscular média) é calculado dividindo-se a concentração de hemoglobina pelo hematócrito e avalia a concentração de hemoglobina dentro da hemácia. Assim como VCM, o HCM e o CHCM são utilizados para diferenciar os tipos de anemia. O RDW (variação da distribuição do tamanho dos eritrócitos), avalia a diferença de tamanho entre as hemácias e, quando elevado, sugere alterações na morfologia das hemácias (ZAGO; FALCÃO; PASQUINI, 2004).

Em relação à análise do eritrograma, não foram observadas alterações significativas nos parâmetros analisados, tanto em relação ao grupo controle, quanto nas comparações realizadas entre os grupos estudados, exceto no percentual de hematócrito do grupo tratado com 50 µL em relação ao grupo tratado com 100 µL de NCMagh-SE, associado ao tratamento com Paclitaxel. Estes resultados estão de acordo com Carneiro (2011) que não verificou diminuição no número de eritrócitos de camundongos portadores de tumor da linhagem 4T1. Comparando-se os resultados encontrados com os valores de referências (Vianna, 2007), foi observada

diminuição do número de eritrócitos, do hematócrito e da quantidade de hemoglobina nos animais tratados com 100 µL de NCMagh-SE, combinado ao tratamento com Paclitaxel, ainda que não significativa em relação ao grupo controle. A diminuição destes três parâmetros indica a ocorrência de anemia neste grupo. A diminuição não significativa do hematócrito foi observada em todos os grupos estudados, mas mesmo que a diferença fosse significativa, alteração apenas deste parâmetro não é indicativo de anemia.

As plaquetas são células responsáveis pelo início do processo de coagulação. No nosso estudo, com exceção do grupo controle tratado com salina, todos os outros apresentaram aumento no número de plaquetas, embora este não tenha sido significativo nas comparações entre os grupos, incluindo o controle tratado com salina. Estes resultados foram diferentes do esperado, uma vez que o tratamento com o quimioterápico Paclitaxel induz diminuição no número de plaquetas e que compostos de selênio estão relacionados à modulação do processo de coagulação (MARKOVIC et al., 2011). A plaquetocitose observada também não está relacionada ao desenvolvimento do tumor, uma vez que os camundongos do grupo controle apresentavam número de plaquetas dentro dos valores de referência, e Carneiro (2011) também não verificou aumento no número de plaquetas em animais portadores de adenocarcinoma mamário da linhagem 4T1. Porém, em outros estudos envolvendo o uso de nanopartículas magnéticas, foi observado aumento no número de megacariócitos, células precursoras de plaquetas. Dessa forma, o aumento no número de megacariócitos pode induzir plaquetocitose. Entretanto, na literatura, há divergências em relação aos valores de referência de índices hematológicos e bioquímicos para camundongos, uma vez que os dados costumam ser generalizados para as diferentes linhagens de animais. Considerando os valores de referência de Fox *et al.* (2006), que define como normal o número de plaquetas entre 900×10^3 a 1600×10^3 plaquetas/µL, os valores encontrados nos animais tratados com NCMagh-SE e/ou Paclitaxel, estariam dentro da normalidade.

Os parâmetros bioquímicos também foram estudados na Etapa 1. A função renal foi avaliada por meio das dosagens de bilirrubina (total e frações) e uréia, e para avaliação da função hepática, foram realizadas as dosagens de aspartato transaminases (AST) e de alanina transaminases (ALT).

A bilirrubina, direta ou indireta, é um pigmento produzido pela degradação da hemoglobina. A bilirrubina indireta não é solúvel em água e é transportada no sangue ligada à albumina. As células do fígado interiorizam esta bilirrubina que é, então, conjugada com ácido glucurônico, produzindo bilirrubina conjugada, solúvel em água. A bilirrubina direta corresponde à bilirrubina conjugada e à bilirrubina total. A dosagem indireta mede a bilirrubina não conjugada, por meio do cálculo da diferença entre bilirrubina total e bilirrubina direta (FOX, 2006; PORTILHO, 2011). Neste trabalho foi verificado aumento significativo somente da dosagem de bilirrubina direta, nos grupos tratados com 100 μ L de NCMagh-SE e em todos os grupos tratados com Paclitaxel. O aumento de bilirrubina direta pode estar associado ao aumento na quantidade de ácido glicólico, um dos produtos do metabolismo do PLGA. Os tratamentos não induziram alteração nos níveis de uréia no soro, outro parâmetro para avaliar a função renal.

Estudos com animais mostram que o fígado é o maior alvo da toxicidade causada pelo excesso de selênio; entretanto, em nosso estudo, não foram observadas alterações nos níveis de AST e ALT, sugerindo que a função hepática estava preservada. Diferentemente dos nossos resultados, Zhang *et al* (2008) verificaram que o tratamento de camundongos, via oral, com Se-metil-seleno-L-cisteína ou com nanopartículas de selênio, na concentração de 5 mg/Kg diariamente, por sete dias, aumentou os níveis de AST e ALT no soro, sendo que a hepatotoxicidade foi menor nos animais tratados com nanopartículas de selênio. Em nosso estudo, os animais foram tratados com uma quantidade menor de selênio, de aproximadamente 2 mg/kg e 4 mg/Kg, a cada três dias, nos animais tratados com 50 μ L e 100 μ L de NCMagh-SE, respectivamente, o que poderia explicar a diferença observada.

O efeito antitumoral do tratamento com NCMagh-SE, associado ou não ao tratamento com Paclitaxel, não induziu diferenças significativas no peso e no volume dos tumores. Interessantemente, ainda que não significativo, foi observado aumento no volume e no peso dos animais tratados somente com NCMagh-SE. Portilho (2011) também verificou aumento no volume tumoral de camundongos portadores de tumor de Ehrlich, tratados com nanoesferas magnéticas de albumina e submetidos à terapia fotodinâmica, porém o aumento foi devido ao edema decorrente do processo inflamatório.

Ao exame macroscópico do tumor, foi observado maior acúmulo de amostra nos animais que receberam 100 μ L de NCMagh-SE. Embora o cálculo do volume tumoral, baseado na fórmula de Yazdi *et al.* (2012), não tenha mostrado redução significativa no volume do tumor, aparentemente, os animais tratados com 100 μ L NCMagh-SE, associado ao Paclitaxel, apresentavam volume menor, porém disforme, enquanto que os animais do grupo controle apresentaram tumor em formato oval. Desta forma, a utilização de outros métodos podem ser mais úteis na avaliação do volume tumoral, do que o cálculo baseado em fórmulas matemáticas.

Como esperado, as análises histológicas dos tumores mostraram maior acúmulo de aglomerados de coloração marrom, decorrentes do tratamento com NCMagh-SE, nos grupos tratados com 100 μ L de NCMagh-SE. Interessantemente, quando o tratamento era associado à administração intravenosa de Paclitaxel, havia maior acúmulo de aglomerados marrons no tumor. O acúmulo de aglomerados de nanopartículas de ferro foi confirmado pela coloração de Perls, em que foi possível visualizar vários aglomerados de coloração azul.

Nos animais controle praticamente não foram encontradas células em necrose e nos animais tratados somente com Paclitaxel, raras regiões de necrose estavam presentes. Por outro lado, extensas regiões de necrose tumoral foram observadas nos animais tratados com NCMagh-SE, principalmente quando este tratamento era associado à administração de Paclitaxel. O grupo tratado com 100 μ L de NCMagh-SE e Paclitaxel apresentou extensas áreas de necrose tumoral, inclusive tendo sido observados aglomerados de coloração marrom nestas áreas. Neste grupo também foi observada fibrose, que pode estar relacionada aos processos inflamatórios resultantes da cicatrização, após destruição tecidual, com substituição por tecido conjuntivo (CARNEIRO, 2011).

Vale ressaltar que o tratamento somente com Paclitaxel, um quimioterápico utilizado no tratamento do câncer de mama, induziu pouca necrose em comparação com o tratamento associado a NCMagh-SE. O tratamento combinado aumentou o efeito antitumoral em comparação aos tratamentos realizados somente com Paclitaxel ou com NCMagh-SE. Já foi descrito na literatura que compostos de selênio podem aumentar o efeito antitumoral de quimioterápicos (VADGAMA *et al.*, 2000; LI *et al.*, 2007, 2009). Li *et al.* (2009) mostraram que o tratamento combinado com metilselenocisteína e tamoxifeno inibiu o crescimento tumoral em camundongos

nude, portadores de carcinoma mamário induzido com células MCF-7, de maneira mais intensa do que quando o tratamento era realizado somente com um dos dois compostos.

Levando-se em consideração que em várias amostras magnéticas investigadas, as nanopartículas magnéticas tendem a se acumular preferencialmente no fígado, pulmões e baço (GARCIA, 2002; SADEGHIANI, 2004; BRUGIN, 2007; PORTILHO, 2007); que o adecarcinoma mamário induzido por células da linhagem 4T1 tende a desenvolver metástases no fígado, pulmões e cérebro, dentre outros órgãos (PULASKI; OSTRAND-ROSENBERG, 2001); que o tratamento com o quimioterápico Paclitaxel pode levar a alterações cardíacas; e que o selênio induz citotoxicidade principalmente no fígado, rins e pulmões (DISKIN *et al.*, 1979; ZHANG; WANG; XU, 2008); os órgãos fígado, pulmões, baço, coração, rins e cérebro foram avaliados para verificação de alterações histológicas induzidas pelos tratamentos, assim como para verificar a presença de aglomerados de NPM e de ocorrência de metástases. Não foi verificada qualquer alteração nos grupos controle ou tratados com NCMagh-SE. Os cortes dos órgãos dos animais submetidos ao tratamento combinado com Paclitaxel ainda estão em análise.

6.3.2. Considerações sobre os resultados encontrados na Etapa 2

Considerando que as amostras magnéticas podem ser utilizadas para promoção da magnetohipertermia como método de tratamento do câncer (ITO *et al.*, 2003; PORTILHO *et al.*, 2011; COLOMBO *et al.*, 2012), foi avaliado também o efeito antitumoral do tratamento com NCMagh-SE associado à exposição ao campo magnético de frequência alternada.

Baseando-se nos resultados da Etapa 1, na Etapa 2 os camundongos foram tratados com 100 µL de NCMagh-SE, associado ao Paclitaxel, uma vez que este tratamento foi o que induziu maior necrose tumoral, ainda que não tenha sido observada redução significativa no volume e no tamanho do tumor. Nesta etapa, a administração de Paclitaxel foi realizada via intratumoral, devido às dificuldades encontradas para aplicação intravenosa na Etapa 1. A administração intratumoral de

quimioterápicos e de seu efeito promissor já foram previamente relatados (CHEN *et al.*, 2012).

As análises hematológicas mostraram que, diferentemente da Etapa 1, não foi observada leucocitose. Os camundongos do grupo controle e tratados somente com Paclitaxel, apresentavam número de leucócitos dentro dos valores de referência (Vianna, 2007); enquanto que os tratados com NCMagh-SE, associado ou não ao Paclitaxel, apresentaram leucopenia. O percentual de linfócito também foi maior do que na Etapa 1, ainda que estivessem abaixo dos valores de referência. Assim como na Etapa 1, os valores de neutrófilos também estavam aumentados em todos os grupos de tratamento, porém o percentual era menor na Etapa 2. A contagem de eosinófilos permaneceu dentro dos valores de referência em todos os grupos, exceto no grupo controle, que apresentou eosinopenia. Estas diferenças nos padrões celulares sanguíneos entre as etapas experimentais, principalmente nos animais tratados com solução salina, possivelmente ocorreu devido ao crescimento tumoral ter sido menor na Etapa 2.

Apesar de Yazdi *et al.* (2012) terem verificado que o tratamento com nanopartículas de selênio, de camundongos portadores de carcinoma mamário induzido com células da linhagem 4T1, aumenta a concentração de citocinas pró-inflamatórias como Interferon- γ (IFN- γ) e fator de necrose tumoral (TNF- α) e de interleucina-12 (IL-12), não foram verificadas alterações nas populações leucocitárias após o tratamento com NCMagh-SE em relação aos outros grupos portadores de tumor.

Análises do eritrograma e da contagem de plaquetas dos animais da Etapa 2, não mostraram qualquer diferença significativa entre os diferentes grupos de tratamento e foram correspondentes aos valores encontrados na Etapa 1. As únicas diferenças foram no aumento de plaquetas nos animais controles tratados com salina da Etapa 2, e nos valores de eritrócitos e hemoglobina, que apresentaram-se dentro dos valores de referência para todos os grupos avaliados. Assim como na Etapa 1, todos os tratamentos induziram redução no valor do hematócrito, porém a análise deste parâmetro isoladamente não é indicativo de anemia.

Também não foram verificadas alterações nos exames bioquímicos realizados na Etapa 2, mostrando que os tratamentos não induziram alteração na função hepática e renal. Nesta etapa, além dos testes bioquímicos realizados na Etapa 1,

foram ainda dosadas creatinina, para avaliação da função renal, e fosfatase alcalina e gama-glutamil transferase (GGT), para avaliação da função hepática. Os resultados da Etapa 2 foram equivalentes aos da Etapa 1, exceto em relação aos níveis de ALT no soro sanguíneo de todos os animais da Etapa 2, que estavam aumentados.

De maneira geral, as drogas quimioterápicas interagem com o material genético das células, induzindo danos principalmente nas células com rápida proliferação celular, sejam tumorais ou normais, como as da pele e da medula óssea. Com o objetivo de se investigar o potencial genotóxico de NCMagh-SE, o percentual de fragmentação do DNA foi avaliado em células da medula óssea. Ainda que não tenham sido verificadas diferenças significativas entre os diferentes grupos experimentais, o tratamento somente com Paclitaxel aumentou em aproximadamente 60% o percentual de fragmentação do DNA, como esperado, uma vez que este quimioterápico é um agente que induz processo de morte celular por apoptose (AU *et al.*, 1999; BRANHAM *et al.*, 2004). Já o tratamento com NCMagh-SE associado ao Paclitaxel, diminui o percentual de fragmentação do DNA em relação ao tratamento somente com Paclitaxel, sugerindo que a amostra NCMagh-SE pode proteger as células normais da toxicidade induzida pelo Paclitaxel.

A magnetohipertermia tem sido vista como uma metodologia promissora para tratamento do câncer (DUTZ *et al.*, 2011), uma vez que o aumento de temperatura pode induzir morte preferencial das células tumorais, com menos efeito nas células normais. Além disso, o aumento na temperatura também promove a desestabilização do PLGA, aumentando a liberação de Selol e de nanopartículas de maghemita no local de interesse. Ainda que não tenham sido observadas diferenças estatísticas no volume e no peso dos tumores dos diferentes grupos experimentais, foi evidente a diminuição desses parâmetros nos animais tratados com a combinação de NCMagh-SE e Paclitaxel, em relação ao grupo controle e em relação aos animais tratados somente com o quimioterápico Paclitaxel. O volume diminuiu ainda mais quando os animais foram expostos por 10 minutos ao campo magnético alternado. Apesar das diferenças no volume e no peso tumoral entre os grupos de tratamento não terem sido estatisticamente significativas, os resultados apresentam importância biológica, sendo fundamental a realização de mais experimentos para complementar os dados obtidos. De acordo com os protocolos clínicos, uma

resposta parcial, que promove redução em mais de 50% no tumor, é importante para continuação do tratamento. No nosso estudo, foi observada redução de aproximadamente 70% no volume do tumor e de 55% no peso do tumor dos animais tratados com combinação de NCMagh-SE, Paclitaxel e campo magnético alternado, em comparação com o grupo controle.

Portilho *et al.* (2011), utilizando o mesmo equipamento gerador de campo eletromagnético deste estudo, verificou aumento expressivo na necrose tumoral, de aproximadamente 100%, quando camundongos portadores de tumor sólido de Ehrlich eram tratados com polímeros de albumina magnéticos e expostos ao campo magnético alternado duas vezes ao dia, durante três dias consecutivos, validando o equipamento utilizado. Entretanto, o efeito antitumoral é dependente da amostra e das condições utilizadas nos procedimentos. Barbosa (2008), por exemplo, verificou resultados antitumorais pouco expressivos quando camundongos portadores de tumor ascítico de Ehrlich eram tratados com magnetolipossomos à base de ferrita de cobalto e expostos ao campo magnético. Por outro lado, Sadeghiani (2008), ao tratar camundongos portadores de tumor sólido de Ehrlich com nanopartículas de magnetita recobertas com ácido poliaspártico, seguido de exposição ao campo magnético alternado, observou necrose em cerca de 33% do tumor. Vale ressaltar que o efeito antitumoral mais expressivo foi o encontrado por Portilho (2011), em que foram utilizados polímeros de albumina magnéticos preparados com o mesmo fluido iônico utilizado para síntese de NCMagh-SE.

Hilger *et al.* (2001) mostraram que tumores com volume de até 300mm³ podem ser aquecidos de maneira eficiente por meio da técnica de magnetohipertermia. Embora a temperatura não tenha sido medida durante os nossos experimentos, a média do volume dos tumores do grupo tratado com NCMagh-Se e exposto ao campo magnético era de 12mm³. Quanto menor o tumor, mais efetivo pode ser o tratamento antitumoral. O maior efeito antitumoral observado na Etapa 2 em relação à Etapa 1, pode ter sido devido ao menor volume tumoral dos animais do grupo 2. Embora o procedimento de indução tumoral tenha ocorrido da mesma forma nas duas etapas, é possível que o lote de células utilizado na etapa 1 estivesse menos agressivo. É sabido que os processos de congelamento e descongelamento de células, bem como o número de passagens realizadas, podem alterar o padrão de crescimento das células.

7. CONCLUSÕES

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

- Nanocápsulas magnéticas de Selol (NCMagh-SE) apresentam tamanho próximo a 235 nm, distribuídas de maneira monodispersa e com carga de superfície positiva;
- O tratamento com NCMagh-SE induz citotoxicidade em células de adenocarcinoma mamário murino (4T1), humano (MCF-7) e em células normais de mama humano (MCF-10A), de maneira dose e tempo dependente;
- Concentrações mais baixas de NCMagh-SE, de 25 µg/mL de Selol + $1,25 \times 10^9$ partículas/mL (1X) e 50 µg/mL de Selol + $2,5 \times 10^9$ partículas/mL (2X), reduziram significativamente a viabilidade das células tumorais, sem efeito nas células normais, mostrando que NCMagh-SE é tóxico principalmente às células tumorais;
- O tratamento das células normais de mama (MCF-10A) com NCMagh-SE, principalmente nas concentrações mais altas, foi menos citotóxico do que com NCMagh, mostrando que o Selol protegeu as células dos efeitos tóxicos induzidos pelo tratamento com nanocápsulas contendo apenas as nanopartículas magnéticas;
- O Selol apresenta, de maneira intrínseca, propriedade antitumoral contra células neoplásicas de mama (4T1 e MCF-7), como observado pelo tratamento desta linhagem com NCSE;
- NCMagh-SE, NCMagh e NCSE induzem morte celular por apoptose e fragmentação do DNA *in vitro*;
- A toxicidade *in vitro* de NCMagh-SE é aumentada quando as células são expostas ao campo magnético de frequência alternada, sendo que o efeito antitumoral é dependente da concentração de nanopartículas magnéticas administrada e da linhagem celular;
- O modelo de indução tumoral, injetando-se células da linhagem 4T1 na mama de camundongos BALB/c, mostrou-se adequado e confirmou o crescimento ortotópico do tumor, uma vez que foi observada a invasão de células tumorais no tecido mamário normal;

- NCMagh-SE não induziu toxicidade relevante em camundongos BALB/c portadores de carcinoma mamário;
- O efeito antitumoral de NCMagh-SE foi dose dependente, como demonstrado nas análises do volume tumoral e nas análises histológicas do tumor, utilizando 50 μ L (0,5 mg de Selol + $2,5 \times 10^{10}$ partículas) ou 100 μ L (1 mg de Selol + 5×10^{10} partículas) de amostra;
- O tratamento combinado de NCMagh-SE com o quimioterápico Paclitaxel potencializou o efeito antitumoral do quimioterápico, evidenciado pela maior ocorrência de necrose tecidual, mostrando que NCMagh-SE pode apresentar um efeito sinérgico com o tratamento quimioterápico;
- O efeito antitumoral do tratamento combinado de NCMagh-SE e Paclitaxel, foi ainda maior quando os camundongos eram também expostos por 10 minutos ao campo magnético de frequência alternada, mostrando que NCMagh-SE tem potencial para ser utilizado na promoção da magnetohipertermia;
- O campo magnético de frequência alternada não aumentou a toxicidade sistêmica induzida pelo tratamento.
- A combinação de NCMagh-SE, Paclitaxel e campo magnético alternado induziu resposta clínica parcial de mais de 50%, sendo considerada promissora para o tratamento do câncer.

Portanto, pode-se concluir que o tratamento com NCMagh-SE, principalmente quando associado ao tratamento quimioterápico com Paclitaxel e com a exposição ao campo magnético alternado, apresenta efeito antitumoral, com baixa toxicidade sistêmica, sendo um potencial agente para tratamento do câncer de mama.

8. PERSPECTIVAS

Em nosso estudo, o tratamento *in vivo* combinado com NCMagh-SE, Paclitaxel e campo magnético apresentou efeito antitumoral importante e promissor, ainda que os resultados relatados sejam referentes a um teste piloto. Dessa forma, experimentos complementares estão sendo programados, para avaliação do efeito antitumoral de maneira mais consistente, incluindo as análises histológicas dos tumores e estudos da biodistribuição de NCMagh-SE.

Outras análises, como as dos cortes histológicos dos órgãos dos animais tratados, na Etapa 1, com NCMagh-SE associado ao Paclitaxel; do percentual de necrose tumoral, por meio da avaliação morfométrica; e da proliferação das células tumorais, por meio de técnicas de imunohistoquímica, serão concluídas em breve, evidenciando, com mais detalhes, os efeitos da nova terapia proposta neste trabalho.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDULKAREEM, I. H.; ZURMI, I. B. Review of hormonal treatment of breast cancer. **Niger J Clin Pract**, v. 15, n. 1, p. 9-14, 2012.
- ACHARYA, S.; SAHOO, S. K. PLGA nanoparticles containing various anticancer agents and tumor delivery by EPR effect. **Adv Drug Deliv Rev**, v. 63, n. 3, p. 170-183, 2011.
- AHMADIAN, S.; BARAR, J.; SAEI, A. A.; FAKHREE, M. A.; OMIDI, Y. Cellular toxicity of nanogenomedicine in MCF-7 cell line: MTT assay. **J Vis Exp**, v. 26, p. xxx, 2009.
- ALI, S.; KAUR, J.; PATEL, K. D. Intercellular cell adhesion molecule-1, vascular cell adhesion molecule-1, and regulated on activation normal T cell expressed and secreted are expressed by human breast carcinoma cells and support eosinophil adhesion and activation. **Am J Pathol**, v. 157, n. 1, p. 313-321, 2000.
- AMES, B. N.; SHIGENAGA, M. K.; HAGEN, I. M. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. **PNAS**, v. 90, n. 17, p. 7915-7922, 1993.
- ANKAMWAR, B.; LAI, T. C.; HUANG, J. H.; LIU, R. S.; HSIAO, M.; CHEN, C. H.; HWU, Y. K. Biocompatibility of Fe₃O₄ nanoparticles evaluated by in vitro cytotoxicity assays using normal, glia and breast cancer cells. **Nanotoxicology**, v. 21, n. 7, p. 075102, 2010.
- AU, J. L.; KUMAR, R. R.; LI, D.; WIENTJES, M. G. Kinetics of hallmark biochemical changes in paclitaxel-induced apoptosis. **AAPS PharmSci**, v. 1, n. 3, p. E.8, 1999.
- BARBOSA, L. S. **Estudo dos processos de magnetohipertermia e terapia fotodinâmica mediados por magnetolipossomas fotossensibilizados em camundongos**. Tese de Doutorado do Programa de Pós-graduação em Patologia Molecular. Universidade de Brasília, Brasília, 2008.
- BEE, A.; MASSART R.; NEVEU, S. Synthesis of very fine maghemite particles. **J Magn Magn Mater**, v. 149, n. 1-2, p. 6-9, 1995.
- BERTHO, A. L.; SANTIAGO, M. A.; COUTINHO, S. G. Flow cytometry in the study of cell death. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 95, n. 3, p. 429-433, 2000.
- BIBBY, M. C. Orthotopic models of cancer for preclinical drug evaluation: advantages and disadvantages. **Eur J Cancer**, v. 40, n. 6, p. 852-857, 2004.
- BRANHAM, M. T.; NADIN, S. B.; VARGAS-ROIG, L. M.; CIOCCA, D. R. DNA damage induced by paclitaxel and DNA repair capability of peripheral blood lymphocytes as evaluated by the alkaline comet assay. **Mutat Res**, v. 560, n. 1, p. 11-17, 2004.

BRASIL. Instituto Nacional de Câncer. **Estimativa 2012: incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA, 2011. 118 p.

BRASIL. Instituto Nacional de Câncer. **Programa Nacional de Controle do Câncer de Mama**. Disponível em: www.inca.gov.br. Acesso em maio de 2012.

BRASIL. Instituto Nacional de Câncer. **TNM: classificação de tumores malignos**. 6 ed. Rio de Janeiro: INCA, 2004. 254 p.

BROZMANOVÁ, J.; MÁNIKOVÁ, D.; VICKOVÁ, D.; CHOVANEC, M. Selenium: a double-edged sword for defense and offence in cancer. **Arch Toxicol**, v. 84, n. 12, p. 919-938, 2010.

BRUGIN, A. **Avaliação da biocompatibilidade/toxicidade de fluido magnético composto de nanopartículas de maghemita recobertas com citrato em camundongos fêmeas Swiss**. Dissertação de mestrado do programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular. Universidade de Brasília, Brasília, 2007.

CARNEIRO, M. L. B. **Efeitos biológicos de citrato de ródio II livre e de sua associação a nanopartículas magnéticas e a magnetolipossomas em células de carcinoma mamário: estudos *in vitro* e *in vivo***. Tese de doutorado do programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular. Universidade de Brasília, Brasília, 2011.

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

CHEN, J.; LU, S.; XU, W.; ZHANG, L.; GUO, Q. Co-encapsulation of magnetic Fe₃O₄ nanoparticles and doxorubicin into biodegradable PLGA nanocarriers for intratumoral drug delivery. **Int J Nanomedicine**, v. 7, p. 1697-1708, 2012.

CHEN, T.; WONG, Y. S.; ZHENG, W.; BAI, Y.; HUANG, L. Selenium nanoparticles fabricated in Undaria pinnatifida polysaccharide solutions induce mitochondria-mediated apoptosis in A375 human melanoma cells. **Colloids Surf B Biointerfaces**, v. 67, n. 1, p. 26-31, 2008.

CHEN, T.; WONG, Y. S.; ZHENG, W. Induction of G1 cells cycle arrest and mitochondria-mediated apoptosis in MCF-7 human breast carcinoma cells by selenium-enriched Spirulina extract. **Biomed Pharmacother**, v. xxx, p. xxx, 2009.

CHERUKURI, P.; GLAZER, E. S.; CURLEY, S. A. Targeted hyperthermia using metal nanoparticles. **Adv Drug Deliv Rev**, v. 62, n. 3, p. 339-345, 2010.

COLE-EZEA, P.; SWAN, D.; SHANLEY, D.; HESKETH, J. Glutathione Peroxidase 4 has a major role in protecting mitochondria from oxidative damage and maintaining oxidative phosphorylation complexes in gut epithelial cells. **Free Radic Biol Med**, v. xxx, p. xxx, 2012.

COLOMBO, M.; CARREGAL-ROMERO, S.; CASULA, M. F.; GUTIÉRREZ, L.; MORALES, M. P.; BÖHM, I. B.; HEVERHAGEN, J. T. ; PROSPERI, D.; PARAK, W. J. Biological applications of magnetic nanoparticles. **Chem Soc Rev**, v. 41, n. 11, p. 4306-4334, 2012.

CONDE, J.; DORIA, G.; BAPTISTA, P. Noble metal nanoparticles applications in cancer. **J Drug Deliv**, v. xxx, p. 1-12, 2012.

CORMIER, S. A.; TARANOVA, A. G.; BEDIANT, C.; NQUYEN, T.; PROTHEROE, C.; PERO, R.; DIMINA, D.; OCHKUR, S. I. ; O'NEIL, K.; COLBERT, D.; LOMBARI, T. R.; CONSTANT S.; MCGARRY, M. P.; LEE, J. J.; LEE, N. A. Pivotal advance: eosinophil infiltration of solid tumors is an early and persistent inflammatory host response. **J Leukoc Biol**, v. 79, n. 6, p. 1131-1139, 2006.

CUNHA-AZEVEDO, E. P.; SILVA, J. R.; MARTINS, O. P.; SIQUEIRA-MOURA, M. P.; BOCCA, A. L.; FELIPE, M. S.; TEDESCO, A. C.; AZEVEDO, R. B. In vitro antifungal activity and toxicity of itraconazole in DMSA-PLGA nanoparticles. **J Nanosci Nanotechnol**, v. 11, n. 3, p. 2308-2314, 2011.

DANHIER, F.; ANSORENA, E.; SILVA, J. M.; COCO, R.; BRETON, A.; PRÉAT, V. PLGA-based nanoparticles: an overview of biomedical applications. **J Control Release**, v. xxx, p. xxx, 2012.

DANHIER, F.; LECOUTURIER, N.; VROMAN, B.; JÉRÔME, C.; MARCHAND-BRYNAERT, J.; FERON, O.; PRÉAT, V. Paclitaxel-loaded PEGylated PLGA-based nanoparticles: in vitro and in vivo evaluation. **J Control Release**, v. 133, n. 1, p. 11-17, 2009.

DAVARAN, S.; RASHIDI, M. R.; POURABBAS, B.; DADASHZADEH, M.; HAGHSHENAS, N. M. Adriamycin release from poly(lactide-coglycolide)-polyethylene glycol nanoparticles: synthesis, and in vitro characterization. **Int J Nanomedicine**, v. 1, n. 4, p. 535-539, 2006.

DISKIN, C. J.; TOMASSO, C. L.; ALPER, J. C.; GLASER, M. L.; FLIEGEL, S. E. Long-term selenium exposure. **Arch Intern Med**, v. 139, n. 7, p. 824-826, 1979.

DOBROVOLSKAIA, M. A.; MCNEIL, S. E. Immunological properties of engineered nanomaterials. **Nat Nanotechnol**, v. 2, n. 8, p. 469-478, 2007.

DUDKIEWICZ-WILCZYNSKA, J.; KSIAZEK, I.; NOWAK, K.; SUCHOCKI, P.; FLIS, S.; KILJAN, M.; ANUSZEWSKA, E. Study of the effect of Selol and sodium selenite on HeLa cells in vitro. **CHEMIK**, v. 65, n. 2, p. 105-114, 2011.

DURSUN, H.; BILICI, M.; UYANIK, A.; OKCU, N.; AKIÜZ, M. Antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation levels in erythrocytes of patients with oesophageal and gastric cancer. **J Int Med Res**, v. 34, n. 2, p. 193-199, 2006.

DUTZ, S.; KETTERING, M.; HILGER, I.; MÜLLER, R.; ZEISBERGER, M. Magnetic multicore nanoparticles for hyperthermia – influence of particle immobilization in

tumor tissue on magnetic properties. **Nanotechnology**, v. 22, n. 26, p. 265102, 2011.

ELSABAHY, M.; WOOLEY, K. L. Design of polymeric nanoparticles for biomedical delivery applications. **Chem Soc Rev**, v. 41, p. 2545-2561, 2012.

ESTEVANATO, L. L. C.; CINTRA, D.; BALDINI, N.; PORTILHO, F.; BARBOSA, L.; MARTINS, O.; LACAVALA, B.; MIRANDA-VILELA, A. L.; TEDESCO, A. C.; BÃO, S.; MORAIS, P. C.; LACAVALA, Z.G. Preliminary biocompatibility investigation of magnetic albumin nanosphere designed as a potential versatile drug delivery system. **Int J Nanomedicine**, v. 6, p. 1709-1717, 2011.

ESTEVANATO, L. L. C.; LACAVALA, L. M.; CARVALHO, L. C.; AZEVEDO, R. B.; SILVA, O.; PELEGRINI, F.; BÃO, S. N.; MORAIS, P. C.; LACAVALA, Z. G. Long-term biodistribution and biocompatibility investigation of dextran-coated magnetite nanoparticle using mice as the animal model. **J Biomed Nanotechnol**, v. 8, n. 2, p. 301-308, 2012.

FALQUEIRO, A. M.; PRIMO, F. L.; MORAIS, P. C.; MOSINIEWICZ-SZABLEWSKA, E. M.; SUCHOCKI, P.; TEDESCO, A. C. Selol-loaded magnetic nanocapsules: a new approach for hyperthermia cancer therapy. **J Appl Phys**, v. 109, p. 07B306, 2011.

FALQUEIRO, A. M.; SIQUEIRA-MOURA, M. P.; JARDIM, D. R.; PRIMO, F. L.; MORAIS, P. C.; MOSINIEWICZ-SZABLEWSKA, E.; SUCHOCKI, P.; TEDESCO, A.C. In vitro cytotoxicity of Selol-loaded magnetic nanocapsules against neoplastic cell lines under AC magnetic field activation. **J Appl Phys**, v. 111, p. 07B335, 2012.

FAROKHZAD, O. C.; LANGER, R. Impact of nanotechnology on drug delivery. **ACS Nano**, v. 3, n. 1, p. 16-20, 2009.

FENG, S. S.; CHIEN, S. Chemotherapeutic engineering: application and further development of chemical engineering principles for chemotherapy of cancer and other diseases. **Chem Eng Sci**, v. 58, p. 4087-4114, 2003.

FERNANDEZ-FERNANDEZ, A.; MANCHANDA, R.; MCGORON, A. J. Theranostic applications of nanomaterials in cancer: drug delivery, image-guided therapy, and multifunctional platforms. **Appl Biochem Biotechnol**, v. 165, p. 1628-1651, 2011.

FERREIRA, H. S.; RANGEL, M. C. Nanotecnologia: aspectos gerais e potencial de aplicação em catálise. **Quím Nova**, v. 32, n. 7, p. 1860-1870, 2009.

FIGUEIREDO, L. C. **Sistemas magnéticos nanoparticulados à base de maghemita**. 2009. Tese de doutorado do programa de Pós-Graduação do Instituto de Física. Universidade de Brasília, Brasília, 2009.

FITAK, B.; GRABOWSKI, M.; SUCHOCKI, P. **Patente (Pol. PI 176530) (Cl. A61K31/095)**, Varsóvia, Polônia, 30 Jun 1999.

FOX, J. G.; BARTHOLD, S. W.; DAVISON, M. T. NEWCOMER, C. E.; QUIMBY, F. W.; SMITH, A. L. **The mouse in biomedical research – normative biology, husbandry, and models**. Vol. III, 2 ed. California: Academic Press, 2006.

GAO, R.; ZHAO, L.; LIU, X.; ROWAN, B. G.; WABITSCH, M.; EDWARDS, D. P.; NISHI, Y.; YANASE, T.; YU, Q.; DONG, Y. Methylseleninic acid is a novel suppressor of aromatase expression. **J Endocrinol**, v. 212, n. 2, p. 199-205, 2012.

GARCIA, V. A. P. **Avaliação da biocompatibilidade/toxicidade e biodistribuição de fluido magnético estabilizado por ácido cítrico e de magnetolipossomas convencionais em camundongos**. Tese de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular. Universidade de Brasília, Brasília, 2002.

GORDON, R. T.; HINES, J. R.; GORDON, D. Intracellular hyperthermia. A biophysical approach to cancer treatment via intracellular temperature and biophysical alterations. **Med Hypotheses**, v. 5, n. 1, p. 83-102, 1979.

GRADISHAR, W. J.; TJULANDIN, S.; DAVIDSON, N.; SHAW, H.; DESAI, N.; BHAR, P.; HAWKINS, M.; O'SHAUGHNESSY, J. Phase III trial of nanoparticle albumin-bound paclitaxel compared with polyethylated castor oil-based paclitaxel in women with breast cancer. **J Clin Oncol**, v. 23, n. 31, p. 7794-7803, 2005.

GROBMYER, S. R.; MORSE, D. L.; FLETCHER, B.; GUTWEIN, L. G.; SHARMA, P.; KRISHNA, V.; FROST, S. C.; MOUDGIL, B. M.; BROWN, S. C. The promise of nanotechnology for solving clinical problems in breast cancer. **J Surg Oncol**, v. 103, n. 4, p. 317-325, 2011.

GUEDES, M. H. A.; GUEDES, M. E. A.; MORAIS, P. C.; SILVA, M. F.; SANTOS, T. S.; ALVES, J. P.; BERTELLI, C. E.; AZEVEDO, R. B.; LACAVAL, Z. G. M. Proposal of a magnetohyperthermia system: preliminary biological tests. **J Magn Magn Mater**, v. 272-276, p. 2406-2407, 2004.

GUEDES, M. H. A.; SADEGHIANI, N.; PEIXOTO, D. L. G.; COELHO, J. P.; BARBOSA, L. S.; AZEVEDO, R. B.; KUCKELHAUS, S.; SILVA, M. F.; MORAIS, P. C.; LACAVAL, Z. G. M.; Effects of AC magnetic field and carboxymethyl-dextran-coated magnetite nanoparticles on mice peritoneal cells. **J Magn Magn Mater**, v. 293, n. 1, p. 283-286, 2004.

GUNASEKERA, U. A.; PANKHURST, Q. A.; DOUCK, M. Imaging applications of nanotechnology in cancer. **Targ Oncol**, v. 4, p. 169-181, 2009.

GUPTA, A. K.; GUPTA, M. Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. **Biomaterials**, v. 26, n. 18, p. 3995-4021, 2005.

HARBECK, N. Breast cancer: Increasing therapy options for HER2-positive early breast cancer. **Nat Rev Clin Oncol**, v. 9, n. 1, p. 10-12, 2011.

HAWKES, W. C.; ALKAN, Z. Delayed cell cycle progression from SEPW1 depletion in p53-and p21-dependent in MCF-7 breast cancer cells. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 413, n. 1, p. 36-40, 2011.

HEATH, J. R.; DAVIS, M. E. Nanotechnology and cancer. **Annu Rev Med**, v. 59, p. 251-265, 2008.

HILDEBRANDT, B.; WUST, P.; AHLERS, O.; DIEING, A.; SREENIVASA, G.; KERNER, T.; FELIX, R.; RIESS, H. The cellular and molecular basis of hyperthermia. **Crit Rev Oncol Hematol**, v. 43, n. 1, p. 33-56, 2002.

HILGER, I.; ANDRA, W.; HERGT, R.; HIERGEIST, R.; SCHUBERT, H.; KAISER, W. A. Electromagnetic heating of breast tumors in interventional radiology: in vitro and in vivo studies in human cadavers and mice. **Radiology**, v. 218, n. 2, p. 570-575, 2001.

HUANG, Y.; CHEN, X. M.; ZHAO, B. X.; KE, X. Y.; ZHAO, B. J.; ZHAO, X.; WANG, Y.; ZHANG, X.; ZHANG, Q. Antiangiogenic activity of sterically stabilized liposomes containing paclitaxel (SLL-PTX): in vitro and in vivo. **AAPS PharmSciTech**, v. 11, n. 2, p. 752-759, 2010.

ITO, A.; TANAKA, K.; HONDA, H.; ABE, S.; YAMAGUCHI, H.; KOBAYASHI, T. Complete regression of mouse mammary carcinoma with a size greater than 15 mm by frequent repeated hyperthermia using magnetite nanoparticles. **J Biosci Bioeng**, v. 96, n. 4, p. 364-369, 2003.

JASTRZEBSKI, Z.; CZYZEWSKA-SZAFRAN, H.; FIJATEK, Z.; SUCHOCKI, P.; FITAK, B. A. Toxicity studies of a new selenium compound, Selol, in rats. **Drugs Exp Clin Res**, v. 21, n. 6, p. 217-220, 1995.

JASTRZEBSKI, Z.; CZYZEWSKA-SZAFRAN, H.; REMISZEWSKA, M.; FIJALEK, Z.; FITAK, B. A.; SUCHOCKI, P. Pharmacokinetics of Selol, a new agent containing selenium, in rats. **Drugs Expl Clin Res**, v. 23, n. 1, p. 7-11, 1997.

JAVEED, A.; ASHRAF, M.; RIAZ, A.; GHAFOR, A.; AFZAL, S.; MUKHTAR, M. M. Paclitaxel and immune system. **Eur J Pharm Sci**, v. 38, n. 4, p. 283-290, 2009.

JIA, Y.; YUAN, M.; YUAN, H.; HUANG, X.; SUI, X.; CUI, X.; TANG, F.; PENG J.; JIANG, C. Co-encapsulation of magnetic Fe(3)O(4) nanoparticles and doxorubicin into biodegradable PLGA nanocarriers for intratumoral drug delivery. **Int J Nanomedicine**, v. 7, p. 1697-1708, 2012.

JIANG, C.; JIANG, W.; IP, C.; GANTHER, H.; LU, J. Selenium-induced inhibition of angiogenesis in mammary cancer at chemopreventive levels of intake. **Mol Carcinog**, v 26, n. 4, p. 213-225, 1999.

JIN, C.; BAI, L.; WU, H.; SONG, W.; GUO, G.; DOU, K. Cytotoxicity of paclitaxel incorporated in PLGA nanoparticles on hypoxic human tumor cells. **Pharm Res**, v. 26, n. 7, p. 1776-1784, 2009.

KAWASHITA, M.; TANAKA, M.; KOKUBO, T.; INOUE, Y.; YAO, T.; HAMADA, S.; SHINJO, T. Preparation of ferrimagnetic magnetite microspheres for in situ hyperthermic treatment of cancer. **Biomaterials**, v. 26, n. 15, p. 2231-2238, 2005.

KHANDHAR, A. P.; FERGUSON, R. M.; KRISHNAN, K. M. Monodispersed magnetite nanoparticles optimized for magnetic fluid hyperthermia: implications in biological systems. **J Appl Phys**, v. 109, p. 07B310, 2011.

KHANDHAR, A. P.; FERGUSON, R. M.; SIMON, J. A.; KRISHNAN, K. M. Tailored magnetic nanoparticles for optimizing magnetic fluid hyperthermia. **J Biomed Mater Res A**, v. 100, n. 3, p. 728-737, 2012.

KOBAYASHI, T. Cancer hyperthermia using magnetic nanoparticles. **Biotechnol J**, v. 6, n. 11, p. 1342-1347, 2011.

KULSHRESTHA, P.; GOGOI, M.; BAHADUR, D.; BANERJEE, R. In vitro application of paclitaxel loaded magnetoliposomes for combined chemotherapy and hyperthermia. **Colloids Surf B Biointerfaces**, v. 96, p. 1-7, 2012.

KUMAR, C. S.; MOHAMMAD, F. Magnetic nanomaterials for hyperthermia-based therapy and controlled drug delivery. **Adv Drug Deliv Rev**, v. 63, n. 9, p. 789-808, 2011.

KUO, T. H.; KUBOTA, T.; WATANABE, M.; FURUKAWA, T.; KASE, S.; TANINO, H.; SAIKAWA, Y.; ISHIBIKI, K.; KITAJIMA, M.; HOFFMAN, R. M. Site-specific chemosensitivity of human small-cell lung carcinoma growing orthotopically compared to subcutaneously in SCID mice: the importance of orthotopic models to obtain relevant drug evaluation data. **Anticancer Res**, v. 13, n. 3, p. 627-630, 1993.

KWOK, J. C.; RICHARDSON, D. R. The iron metabolism of neoplastic cells: alterations that facilitate proliferation? **Crit Rev Oncol Hematol**, v. 42, n. 1, p. 65-78, 2002.

LACAVA, B. M. **Síntese de fluido magnético à base de maghemita para produção de nanocápsulas magnéticas de albumina bovina**. Dissertação de mestrado do programa de Pós-Graduação do Instituto de Química. Universidade de Brasília, Brasília, 2010.

LAURENT, S.; DUTZ, S.; HÄFELI, U. O.; MAHMOUDI, M. Magnetic fluid hyperthermia: focus on superparamagnetic iron oxide nanoparticles. **Adv Colloid Interface Sci**, v. 166, n. 1-2, p. 8-23, 2011.

LEE, B. L.; LIEDKE, P. E. R.; BARRIOS, C. H.; SIMON, S. D.; FINKELSTEIN, D. M.; GOSS, P. E. Breast cancer in Brazil: present status and future goals. **Lancet Oncol**, v. 13, n. 3, p. e95-e102, 2012.

LI, F.; SUN, J.; ZHU, H.; WEN, X.; LIN, C.; SHI, D. Preparation and characterization novel polymer-coated magnetic nanoparticles as carriers for doxorubicin. **Colloids Surf B Biointerfaces**, v. 88, n. 1, p. 58-62, 2011.

LI, S.; ZHOU, Y.; WANG, R.; ZHANG, H.; DONG, Y.; IP, C. Selenium sensitizes MCF-7 breast cancer cells to doxorubicin-induced apoptosis through modulation of phosphor-Akt and its downstream substrates. **Mol Cancer Ther**, v. 6, n. 3, p. 1031-1038, 2007.

LI, Z.; CARRIER, L. BELAME, A.; THIYAGARAJAH, A. V.; SALVO, V. A.; BUROW, M. E.; ROWAN, B. G. Combination of methylselenocysteine with tamoxifen inhibit MCF-7 breast cancer xenografts in nude mice through elevated apoptosis and reduced angiogenesis. **Breast Cancer Res Treat**, v. 118, p. 33-43, 2009.

LU, J.; KAECK, M.; JIANG, C.; WILSON, A. C.; THOMPSON, H. J. Selenite induction of DNA strand breaks and apoptosis in mouse leukemic L1210 cells. **Biochem Pharmacol**, v. 47, n. 9, p. 1531-1535, 1994.

LU, X.; QIAN, J.; ZHOU, H.; GAN, Q.; TANG, W.; LU, J.; YUAN, Y.; LIU, C. In vitro cytotoxicity and induction of apoptosis by silica nanoparticles in human HepG2 hepatoma cells. **Int J Nanomedicine**, v. 6, p. 1889-1901, 2011.

LUO, H.; WANG, F. BAI, Y.; CHEN, T.; ZHENG, W. Selenium nanoparticles inhibit the growth of HeLa and MDA-MB-231 cells through induction of S phase arrest. **Colloids Surf B Biointerfaces**, v. 94, p. 304-308, 2012.

MADANI, S. Y.; NADERI, N.; DISSANAYAKE, O.; TAN, A.; SEIFALIAN, A. M. A new era of cancer treatment: carbon nanotubes as drug delivery tools. **Int J Nanomedicine**, v. 6, p. 2963-2979, 2011.

MAEDA, H. The enhanced permeability and retention (EPR) effect in tumor vasculature: the key role of tumor-selective macromolecular drug targeting. **Adv Enzyme Regul**, v. 41, p. 189-207, 2001.

MALAS ORUÇ, O.; CAQLAYAN, B.; OCAL, Z.; OZKAN, A.; TORUN, E.; MAYADAQLI, A. Evaluation of pulmonary complications of radiotherapy in breast cancer patients. **J BUON**, v. 9, n. 4, p. 409-415, 2004.

MAN, Y. G. Leukocyte-mediated cell dissemination and metastasis: findings from multiple types of human tumors. **J Cell Biochem**, v. 112, n. 4, p. 1154-1167, 2011.

MANTHE, R. L.; FOY, S. P.; KRISHNAMURTHY, N.; SHARMA, B.; LABHASETWAR, V. Tumor ablation and nanotechnology. **Mol Pharm**, v. 7, n. 6, p. 1880-1898, 2010.

MARKOVIC, S. D.; DJACIC, S. D.; CVETKOVIC, D. M.; OBRADOVIC, A. D.; ZIZIC, J. B.; OGNJANOVIC, B. I.; STAJN, A. S. Effects of acute in vivo cisplatin and selenium treatment on hematological and oxidative stress parameters in red blood cells of rats. **Biol Trace Elem Res**, v. 142, p. 660-670, 2011.

MATSUOKA, F.; SHINKAI, M.; HONDA, H.; KUBO, T.; SUGITA, T.; KOBAYASHI, T. Hyperthermia using magnetite cationic liposomes for hamster osteosarcoma. **Biomagn Res Technol**, v. 2, p. 3, 2004.

MAUGHAN, K. L.; LUTTERBIE, M. A.; HAM, P. S. Treatment of breast cancer. **Am Fam Physician**, v. 81, n. 11, p. 1339-1346, 2010.

MAURO, M. O.; SARTORI, D.; OLIVEIRA, R. J.; ISHII, P. L.; MANTOVANI, M. S.; RIBEIRO, L. R. Activity of selenium on cell proliferation, cytotoxicity, and apoptosis and on the expression of CASP9, BCL-XL and APC in intestinal adenocarcinoma cells. **Mutat Res**, v. 715, n. 1-2, p. 7-12, 2011.

MCNEIL, S. E. Nanotechnology for the biologist. **J Leukoc Biol**, v. 78, n. 3, p. 585-594, 2005.

MIELE, E.; SPINELLI, G. P.; MIELE, E.; TOMAO, F.; TOMAO, S. Albumin-bound formulation of paclitaxel (Abraxane ABI-007) in the treatment of breast cancer. **Int J Nanomedicine**, v. 4, p. 99-105, 2009.

MISRA, R.; ACHARYA, S.; SAHOO, S. K. Cancer nanotechnology: application of nanotechnology in cancer therapy. **Drug Discov Today**, v. 15, n. 19-20, p. 842-850, 2010.

MOGHIMI, S. M.; HUNTER, A. C.; MURRAY, J. C. Nanomedicine: current status and future prospects. **FASEB J**, v. 19, n. 3, p. 311-330, 2005.

MONGE-FUENTES, V.; GARCIA, M. P.; TAVARES, M. C.; VALOIS, C. R.; LIMA, E. C.; TEIXEIRA, D. S.; MORAIS, P. C.; TOMAZ, C.; AZEVEDO, R. B. Biodistribution and biocompatibility of DMSA-stabilized maghemite magnetic nanoparticles in nonhuman primates (*Cebus spp.*). **Nanomedicine (Lond)**, v. 6, n. 9, p. 1529-1544, 2011.

MORAIS, P. C.; GARG, V. K.; OLIVEIRA, A. C.; SILVA, L. P.; AZEVEDO, R. B.; SILVA, A. M. L.; LIMA, E. C. D. Synthesis and characterization of size-controlled cobalt-ferrite-based ionic ferrofluids. **J Magn Magn Mater**, v. 225, n. 1-2, p. 37-40, 2001.

MORNET, S.; VASSEUR, S.; GRASSET, F.; DUGUET, E. Magnetic nanoparticle design for medical diagnosis and therapy. **J Mater Chem**, v. 14, p. 2161-2175, 2004.

MUECKE, R.; SCHOMBURG, L.; BUENTZEL, J.; KISTERS, K.; MICKE, O. Selenium or no selenium – that is the question in tumor patients: a new controversy. **Integr Cancer Ther**, v. 9, n. 2, p. 136-141, 2010.

MURA, S.; HILLAIREAU, H.; NICOLAS, J.; DROUMAGUET, B.; GUEUTIN, C.; ZANNA, S.; TSAPIS, N.; FATTAL, E. Influence of surface charge on the potential toxicity of PLGA nanoparticles towards Calu-3 cells. **Int J Nanomedicine**, v. 6, p. 2591-2605, 2011.

NAFISI, S.; MONTAZERI, M.; MANOUCHEHRI, F. The effect of Se salts on DNA structure. **J Photochem Photobiol B**, v. xxx, p. xxx, 2012.

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

NILSSON, G.; HOLMBERG, L.; GARMO, H.; DUVERNOY, O.; SJÖGREN, I.; LAQERQVIST, B.; BLOMQVIST, C. Distribution of coronary artery stenosis after radiation for breast cancer. **J Clin Oncol**, v. 30, n.4, p. 380-386, 2011.

NOVOTNY, L.; RAUKO, P.; KOMBIAN, S. B.; EDAFIOGHO, I. O. Selenium as a chemoprotective anti-cancer agent: reality or wishful thinking? **Neoplasma**, v. 57, n. 5, p. 383-391, 2010.

PANKHURST, Q. A.; CONNOLLY, J.; JONES, S. K.; DOBSON, J. Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine. **J Phys D: Appl Phys**, v. 36, p. R167-R181, 2003.

PARK, J.; FONG, P. M.; LU, J.; RUSSELL, K. S.; BOOTH, C. J.; SALTZMAN, W. M.; FAHMY, T. M. PEGylated PLGA nanoparticles for the improved delivery of doxorubicin. **Nanomedicine**, v. 5, n. 4, p. 410- 418, 2009.

PASSAMAN, L. J.; FARIAS, A. M.; TOMAZELLI, J. G.; ABREU, D. M.; DIAS, M. B.; ASSIS, M.; ALMEIDA, P. F.; SILVA, R. C.; SANTINI, L. A. SISMAMA – implementation of an information system for breast cancer early detection programs in Brazil. **Breast**, v. 20, n. 2, p. S35-S39, 2011.

PEGRAM, M.; LIAO, J. Trastuzumab treatment in multiple lines: current data and future directions. **Clin Breast Cancer**, v. 12, n. 1, p. 10-18, 2012.

PERES, C. M.; CURI, R. **Como cultivar células**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005. 283 p.

PIERCE, L. J. The use of radiotherapy after mastectomy: a review of the literature. **J Clin Oncol**, v. 23, n. 8, p. 1706-1717, 2005.

PORTILHO, F. A. **Avaliação da biocompatibilidade de fluido magnético à base de nanopartículas de maghemita recobertas por polifosfato em camundongos**. Dissertação de Mestrado do Programa de Pós-graduação em Patologia Molecular. Faculdade de Medicina. Universidade de Brasília, Brasília, 2007.

PORTILHO, F. A.; ESTEVANATO, L. L. C.; MIRANDA-VILELA, A. L.; ALMEIDA-SANTOS, M. F. M.; OLIVEIRA-CAVALCANTI, C. E.; LACAVAL, B. M.; SIMIONI, A. R.; A. C. TEDESCO, MORAIS, P. C.; LACAVAL, Z. G. M. Investigation of a magnetohyperthermia system efficacy. **J Appl Phys**, 109: 07B307, 2011.

PORTILHO, F. A. **O uso de nanoesferas de albumina na terapia fotodinâmica e magnetohipertermia do tumor de Ehrlich**. Tese de Doutorado do Programa de Pós-graduação em Patologia Molecular. Faculdade de Medicina. Universidade de Brasília, Brasília, 2011.

PRADHAN, P.; GIRI, J.; RIEKEN, F.; KOCH, C.; MYKHAYLYK, O.; DÖBLINGER, M.; BANERJEE, R.; BAHADUR, D.; PLANK, C. Targeted temperature sensitive magnetic liposomes for thermo-chemotherapy. **J Control Release**, v. 142, n. 1, p. 108-121, 2010.

PUHALLA, S.; BHATTACHARYA, S.; DAVIDSON, N. E. Hormonal therapy in breast cancer: A model disease for the personalization of cancer care. **Mol Oncol**, v. 6, n. 2, p. 222-236, 2012.

PULASKI, B. A.; OSTRAND-ROSENBERG, S. Mouse 4T1 breast tumor model. **Curr Protoc Immunol**, capítulo 20, 2001.

PURUSHOTHAM, A. D.; LEWISON, G.; SULLIVAN, R. The state of research and development in global cancer surgery. **Ann Surg**, v. 255, n. 3, p. 427-432, 2012.

RAYMAN, M. P. Selenium and human health. **Lancet**, v. 379, n. 9822, p. 1256-1268, 2012.

RICHTER, H.; KETTERING, M.; WIEKHORST, F.; STEINHOFF, U.; HILGER, I.; THRAHMS, L. Magnetorelaxometry for localization and quantification of magnetic nanoparticles for thermal ablation studies. **Phys Med Biol**, v. 55, p. 623-633, 2010.

RUITERKAMPP, J.; ERNST, M. F. The role of surgery in metastatic breast cancer. **Eur J Cancer**, v. 47, n. 3, p. S6-S22, 2011.

SADEGHIANI, N. **Avaliação dos efeitos de nanopartículas magnéticas recobertas com ácido poliaspártico no tumor sólido de Ehrlich na presença de campo magnético**. Tesde de doutorado do Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular. Universidade de Brasília, Brasília, 2008.

SADEGHIANI, N. **Avaliação in vivo da biocompatibilidade/toxicidade e biodistribuição de fluido mangético à base de nanopartículas de magnetita recobertas com ácido poliaspártico**. Dissertação de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular. Universidade de Brasília, Brasília, 2004.

SADEGHIANI, N.; BARBOSA, L. S.; GUEDES, M. H. A.; CHAVES, S. B.; SANTOS, J. G.; SILVA, O.; PELEGRINI, F.; AZEVEDO, R. B.; MORAIS, P. C.; LACAVAL, Z. G. M. Magnetic resonance of polyaspartic acid-coated magnetite nanoparticles administered in mice. **IEEE Trans Magn**, v. 41, n. 10, p. 4108-4110, 2005.

SAHOO, S. K.; PARVEEN, S. PANDA, J. J. The present and future of nanotechnology in human health care. **Nanomedicine**, v. 3, n. 1, p. 20-31, 2007.

SCHAFFAZICK, S. R.; GUTERRES, S. S.; FREITAS, L. L.; POHLMANN, A. R. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Quím Nova**, v. 26, n. 5, p. 726-737, 2003.

SCHNEIDER, U.; SUMILA, M.; ROBOTKA, J.; GRUBER, G.; MACK, A.; BESSERER, J. Dose-response relationship for breast cancer induction at radiotherapy dose. **Radiat Oncol**, v. 8, n. 6, p.67-74, 2011.

SHANG, D.; LI, Y.; WANG, C.; WANG, X.; YU, Z.; FU, X. A novel polysaccharide from Se-enriched *Ganoderma lucidum* induces apoptosis of human breast cancer cells. **Oncol Rep**, v. 25, n. 1 p. 267-272, 2011.

SIMIONI, A. R.; PRIMO, F. L.; RODRIGUES, M. M. A.; LACAVA, Z. G. M.; MORAIS, P. C.; TEDESCO, A. C. Preparation, characterization and in vitro toxicity test of magnetic nanoparticle-based drug delivery system to hyperthermia of biological tissues. **IEEE Trans Magn**, v. 43, n. 6, p. 2459-2461, 2007.

SINGLA, A. K.; GARG, A.; AGGARWAL, D. Paclitaxel and its formulations. **Int J Pharm**, v. 235, n. 1-2, p. 179-192, 2002.

SOMA, D.; KITAYAMA, J.; ISHIGAMI, H.; KAISAKI, S.; NAGAWA, H. Different tissue distribution of paclitaxel with intravenous and intraperitoneal administration. **J Surg Res**, v. 155, n. 1, p. 142-146, 2009.

SONG, H.; HUR, I.; PARK, H. J.; NAM, J.; PARK, G. B.; KONG, K. H.; HWANG, Y. M.; KIM, Y. S.; CHO, D. H.; LEE, W. J.; HUR, D. Y. Selenium inhibits metastasis of murine melanoma cells through the induction of cell cycle arrest and cell death. **Immune Netw**, v. 9, n. 6, p. 236-242, 2009.

SOULE, H. D.; MALONEY, T. M.; WOLMAN, S. R.; PETERSON, W. D.; BRENZ, R.; MCGRATH, C. M.; RUSSO, J.; PAULEY, R. J.; JONES, R. F.; BROOKS, S. C. Isolation and characterization of a spontaneously human breast epithelial cell line, MCF-10. **Cancer Res**, v. 50, n. 18, p. 6075-6086, 1990.

SOULE, H. D.; VAZGUEZ, J.; LONG, A.; ALBERT, S.; BRENNAN, M. A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. **J Natl Cancer Inst**, v. 51, n. 5, p. 1409-1416, 1973.

SPARANO, J. A.; MALIK, U.; RAJDEV, L.; SARTA, C.; HOPKINS, U.; WOLFF, A. C. Phase I trial of pegylated liposomal doxorubicin and docetaxel in advanced breast cancer. **J Clin Oncol**, v. 19, n. 12, p. 3117-3125, 2001.

STUCKEY, A. Breast cancer: epidemiology and risk factors. **Clin Obstet Gynecol**, v. 54, n. 1, p. 96-102, 2011.

SUCHOCKI, P.; MISIEWICZ, I.; SKUPINSKA, K.; WACLAWEK, K.; FIJALEK, Z.; KASPRZYCKA-GUTTMAN, T. The activity of Selol in multidrug-resistant and sensitive human leukemia cells. **Oncol Rep**, v. 18, p. 893-899, 2007.

TAN, L.; JIA, X.; JIANG, X.; ZHANG, Y.; TANG, H.; YAO, S. In vitro study on the individual and synergistic cytotoxicity of Adriamycin and selenium nanoparticles against Bel7402 cells with a quartz crystal microbalance. **Biosens Bioelectron**, v. 24, n. 7, p. 2268-2272, 2009.

TANAKA, T.; DECUZZI, P.; CRISTOFANILLI, M.; SAKAMOTO, J. H.; TASCOTTI, E.; ROBERTSON, F. M.; FERRARI, M. Nanotechnology for breast cancer therapy. **Biomed Microdevices**, v. 11, p. 49-63, 2009.

THRALL, M. A. Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária. São Paulo: Editora Rocca, 2007.

TORCHILIN, V. P. Targeted pharmaceutical nanocarriers for cancer therapy and imaging. **AAPS J**, v. 9, n. 2, p. E128-E147, 2007.

TRUFELLI, D. C.; MIRANDA, C.; SANTOS, M. B.; FRAILE, N. M.; PECORONI, P. G.; GONZAGA, F.; RIECHELMANN, R.; KALIKS, R.; DEL GIGLIO, A. Analysis of delays in diagnosis and treatment of breast cancer patients at a public hospital. **Rev Assoc Med Bras**, v. 54, n. 1, p. 72-76, 2008.

VADGAMA, J. V.; WU, Y.; SHEN, D.; HSIA, S.; BLOCK, J. Effect of selenium in combination with Adriamycin or Taxol on several different cancer cells. **Anticancer Res**, v. 20, n. 3A, p. 1391-1414, 2000.

VALDIGLESIAS, V.; PÁSARO, E.; MÉNDEZ, J.; LAFFON, B. In vitro evaluation of selenium genotoxic, cytotoxic, and protective effects: a review. **Arch Toxicol**, v. 84, n. 5, p. 337-351, 2010.

VALOIS, C. R.; BRAZ, J. M.; NUNES, E. S.; VINOLO, M. A.; LIMA, E. C.; CURI, R.; KUEBLER, W. M.; AZEVEDO, R. B. The effect of DMSA-functionalized magnetic nanoparticles on transendothelial migration of monocytes in the murine lung via a beta2 integrin-dependent pathway. **Biomaterials**, v. 31, n. 2, p. 366-374, 2010.

VEKARIYA, K. K.; KAUR, J.; TIKOO, K. ER α signaling imparts chemotherapeutic selectivity to selenium nanoparticles in breast cancer. **Nanomedicine**, v. xxx, p. xxx, 2011.

VIANNA, F. A. B. **Guia terapêutico veterinário**. 2 ed. Lagoa Santa: Editora Cem., 2007. 462 p.

WANG, H.; ZHAO, Y.; WU, Y.; HU, Y. L.; NAN, K.; NIE, G.; CHEN, H. Enhanced anti-tumor efficacy by co-delivery of doxorubicin and paclitaxel with amphiphilic methoxy PEG-PLGA copolymer nanoparticles. **Biomaterials**, v. 32, n. 32, p. 8281-8290, 2011.

YANG, F.; TANG, Q.; ZHONG, X.; BAI, Y.; CHEN, T.; ZHANG, Y.; LI, Y.; ZHENG, W. Surface decoration by Spirulina polysaccharide enhances the cellular uptake and anticancer efficacy of selenium nanoparticles. **Int J Nanomedicine**, v. 7, p. 835-844, 2012.

YAZDI, M. H.; MAHDAVI, M.; VARASTEHRMORADI, B.; FARAMARZI, M. A.; SHAHVERDI, A. R. The immunostimulatory effect of biogenic selenium nanoparticles on the 4T1 breast cancer model: an in vivo study. **Biol Trace Elem Res**, v. xxx, p. xxx, 2012.

YIGIT, M. V.; MOORE, A.; MEDAROVA, Z. Magnetic nanoparticles for cancer diagnosis and therapy. **Pharm Res**, v. 29, n. 5, p. 1180-1188, 2012.

YOO, D.; LEE, J. H.; SHIN, T. H.; CHEON, J. Theranostic magnetic nanoparticles. **Acc Chem Res**, v. 44, n. 10, p. 863-874, 2011.

ZAGO, M. A.; FALCÃO, R. P.; PASQUINI, R. **Hematologia – fundamentos e prática**. São Paulo: Editora Atheneu, 2004.

ZHANG, J.; WANG, X.; XU, T. Elemental selenium at nano size (Nano-Se) as a potential chemopreventive agent with reduced risk of selenium toxicity: comparison with se-methylselenocysteine in mice. **Toxicol Sci**, v. 101, n. 1, p. 22-31, 2008.

ZHAO, Q.; WANG, L.; CHENG, R.; MAO, L.; ARNOLD, R. D.; HOWERTH E. W.; CHEN, Z. G.; PLATT, S. Magnetic nanoparticle-based hyperthermia for head & neck cancer in mouse models. **Theranostics**, v. 2, p. 113-121, 2012.