



Universidade de Brasília

Instituto de Ciências Biológicas

Programa de Pós-Graduação em Nanociência e Nanobiotecnologia

**NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS RECOBERTAS COM
FERRITINA: TOXICIDADE, BIODISTRIBUIÇÃO E PAPEL NO
TRATAMENTO DE ADENOCARCINOMA MAMÁRIO DE EHRlich**

Brasília, DF

2018

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NANOCIÊNCIA E NANOBIOTECNOLOGIA

DANYELLE ASSIS FERREIRA

**NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS RECOBERTAS COM
FERRITINA: TOXICIDADE, BIODISTRIBUIÇÃO E PAPEL NO
TRATAMENTO DE ADENOCARCINOMA MAMÁRIO DE EHRlich**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação em Nanociência e Nanobiotecnologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, como requisito para obtenção do Título de Mestre em Nanociência e Nanobiotecnologia.

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

Brasília, 2018

*À minha família, meu exemplo de superação,
dedicação e persistência.
E a todos os professores que fizeram parte da minha
jornada até aqui.*

AGRADECIMENTOS

À Deus pela dádiva da vida e por todas as bênçãos em minha vida.

À minha orientadora Dra. Zulmira Lacava, por ter me aceitado de braços abertos com todo seu carinho, sabedoria e generosidade, e que se tornou minha inspiração de pesquisadora, professora e como pessoa! Não importava o dia ou a hora, sempre esteve presente para me ajudar e tirar dúvidas, fosse em reuniões em sua casa, na UnB, por Skype ou por e-mail, sempre deu um jeito e nunca se ausentou quando precisei.

À Maria Luiza, minha co-orientadora não oficial, por toda sua ajuda, conversas, planejamento de experimentos, por ter me ensinado estatística, algo que pensei que nunca seria capaz de entender, pelos dias de experimentos que se estenderam até a noite, por sempre me socorrer nos momentos de desespero, esse trabalho não teria sido concluído sem sua ajuda.

Ao professor Dr. Claudio Sangregorio e o Dr. Andrea Guerrini, por terem cedido o material de estudo deste trabalho.

À professora Dra. Fabiana Pirani por ter aceitado participar desse projeto mesmo com o pouco tempo e a quantidade enorme de material para analisar, e por todo seu carinho, atenção e sabedoria!

Ao professor Dr. Marcelo Souza por toda sua ajuda e disposição no ICP e nos cálculos.

Ao professor Dr. Cesar Grisolia, por toda disposição e suporte para utilização do microscópio de fluorescência.

Ao professor Dr. Ricardo Bentes por todo seu suporte no laboratório.

Ao professor Dr. Andris Bakuzis por disponibilizar o equipamento Magnetherm.

À dona Zélia por toda sua simpatia, carinho, ajuda e disposição para o funcionamento de tudo no laboratório, sua presença foi essencial para que fosse possível realizar os experimentos deste trabalho.

Ao Fred, por todas suas conversas sobre tudo, por sua participação ativa no desenvolvimento desse trabalho, na histologia e no planejamento, por ter topado entrar nesse projeto meio louco (com 3 mil lâminas, né?!), e pelos finais de semana e noites para poder concluir tudo a tempo. À Sarah (e a calça manchada) por ter ajudado e por todas as conversas e saídas para comer depois de um dia de trabalho.

À Alessandra, minha “*pupila*”, por querer ser minha estagiária e tentar aprender algo comigo, mas acabou se tornando minha amiga e companheira, que me ajudou em tudo, não importava a hora estava sempre ali presente e me ajudando, além de ter despertado em mim a vontade de ensinar.

À Maria, minha companheira de mestrado que passou todos os momentos ao meu lado, agradeço por todas as conversas, saídas, açaí, aquela amiga e confidente de todas as horas.

À Amanda, por todas as conversas, desespero e risadas e que mesmo em suas férias não deixou de me ajudar!

Ao Gabriel, Khellida e Willie por todas as conversas, risadas, ajuda e, principalmente, pelo mutirão da eutanásia!

À Laise por todas as conversas e desabafos, por ter me ensinado sobre esse mundo da nanobiotecnologia e experimentação animal.

Ao Léo pela diversidade de nossas conversas, pela confidencialidade, pela ajuda e todo apoio.

Ao Alisson por todo o ensinamento, divisão do microscópio e paciência.

E à todas as pessoas do laboratório que não mencionei, mas que contribuíram de alguma forma.

Ao meu amado pai, Wellington Luis, por sempre ter me compreendido e me incentivado, por todas as comidas deliciosas feitas para me animar, quem sempre se desdobrou em mil para conseguir me levar e acompanhar durante todas as idas a Goiânia. À minha amada mãe, Claudia Maria, por todo o suporte e companheirismo, principalmente, durante a etapa de escrever a dissertação, por sempre me ajudar. Ao meu amado irmão, Diogo (*aka* Gororobas), meu eterno modelo, exemplo e inspiração de vida e dedicação, o gênio da informática que me socorreu em tudo desde sempre! À Talita por desenhar a figura utilizada neste trabalho.

Aos meus amados avós e tias por todo o carinho, amor, dedicação e compreensão. Por sempre me darem força e coragem durante toda a vida, sem vocês eu não teria conseguido. Sempre minha maior torcida!

À Nanda, meu eterno “*Teukie*”, meu braço direito e esquerdo, minha companheira durante os finais de semana na UnB, a pessoa que nunca me permitiu desistir, minha confidente e conselheira, a pessoa que permitiu que eu terminasse essa jornada com sanidade.

À Lorena, Dani e Eduarda por me tirarem dessa dura rotina de pós-graduanda e me darem dias de leveza e de muitas risadas, comida e jogos!

À FAPDF e CNPq pelo apoio financeiro.

“Porque eu sou do tamanho do que vejo

E não do tamanho da minha altura”

(Fernando Pessoa)

“Ele não sabia que era impossível. Foi lá e fez”

(Jean Cocteau)

RESUMO

O câncer é definido como um conjunto de doenças caracterizadas por desordens celulares decorrentes de múltiplas alterações genéticas que acarretam desequilíbrio na proliferação e morte celular. O câncer de mama é a causa mais comum de morte por câncer entre as mulheres, representando cerca de 25% do total de neoplasias no mundo. Em geral, as terapias convencionais apresentam pouca seletividade para o tecido tumoral, o que diminui sua eficácia e aumenta os efeitos adversos. Em acordo com a necessidade de novas terapias que superem essas limitações, a nanobiotecnologia vem fornecendo novas formas de diagnóstico e de terapia, entre as quais as que usam nanopartículas magnéticas. O objetivo deste trabalho foi desenvolver um tratamento para o câncer de mama utilizando a magnetohipertermia mediada por uma nova amostra de nanopartículas magnéticas à base de magnetita recobertas com ferritina (NPM-HFn). Testes de toxicidade de NPM-HFn em camundongos Swiss. Testes cometa e do micronúcleo mostraram ausência de citotoxicidade e de genotoxicidade. Análises hematológicas e bioquímicas não apresentaram alterações severas, enquanto a avaliação histopatológica não evidenciou alterações relevantes nos órgãos. Avaliação da biodistribuição da NPM-HFn por ICP-OES e coloração de Perls de tecidos mostraram tendência das NPM a se acumularem principalmente no fígado e baço, às vezes no pulmão e, quando pertinente, no tumor. Testes preliminares da eficácia por meio da análise ex vivo do tumor mostraram que os grupos tratados com a administração endovenosa e intratumoral da NPM-HFn seguida pela exposição ao campo magnético alternado foram eficazes na redução de 89% e 88% do tumor, respectivamente. Entretanto, enquanto o tratamento intratumoral facilitou a ocorrência de metástase, o tratamento endovenoso evitou sua ocorrência. Portanto, com este trabalho, foi possível desenvolver um método bastante eficaz para o tratamento do tumor de mama, utilizando a magnetohipertermia mediada por amostra biocompatível de nanopartículas magnéticas à base de magnetita recobertas com ferritina.

Palavras-chaves: câncer de mama, nanopartículas magnéticas, magnetohipertermia, toxicidade.

ABSTRACT

Cancer is defined as a set of diseases characterized by cellular disorders due to genetic multiplicity that lead to an imbalance in cell proliferation and death. Breast cancer is the most common cause of cancer death among women and represents about 25% of the total number of neoplasms worldwide. Conventional therapies are not completely selective for tumor tissue, which decreases its efficacy and increases adverse effects. New therapies that overcome these limitations are demanded. Accordingly, nanobiotechnology has been providing new diagnosis and therapy platforms, including those using magnetic nanoparticles. The aim of this work was to develop a treatment for breast cancer using magnetohyperthermia mediated by a new sample of magnetic nanoparticles based on ferritin-coated magnetite (NPM-HFn). Toxicity tests using NPM-HFn were performed in Swiss mice. Comet and micronuclei assays showed absence of cytotoxicity and genotoxicity; Hematological and biochemical evaluation did not present severe alterations while the histopathological evaluation indicated no significant changes. Biodistribution studies of NPM-HFn accessed through ICP-OES and Perls staining of tissues showed a tendency to NPMs accumulation in the liver and spleen, sometimes in the lung and in the tumor. To evaluate the efficacy of the treatments preliminary histopathological evaluations of the tumor showed that the group treated with intravenous and intratumoral administration of NPM-HFn followed by exposure to the alternating magnetic field were effective in reducing 89% and 88% of the tumor, respectively. However, while the intratumoral treatment facilitated the occurrence of metastasis, the intravenous treatment prevented its occurrence. Therefore, with this work, it was possible to develop a quite efficacious method for the treatment of breast cancer, using magnetohyperthermia mediated by a biocompatible magnetic sample composed by nanoparticles based on ferritin-coated magnetite.

Keywords: breast cancer, magnetic nanoparticles, magneto hyperthermia, toxicity.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - ESQUEMA GERAL DO METABOLISMO DO FERRO.	7
FIGURA 2 - DIAGRAMA DE FITA DA SUPERFÍCIE EXTERIOR E DA CAVIDADE INTERNA DA FERRITINA (ADAPTADO DE UCHIDA <i>ET AL.</i> , 2010).	8
FIGURA 3 - ESQUEMA DOS MECANISMOS DE FORMAÇÃO DE MICRONÚCLEO.	12
FIGURA 4 - MICROFOTOGRAFIA DE FLUORESCÊNCIA DO NUCLEOIDE NO TESTE COMETA.	13
FIGURA 5 - FIGURA ILUSTRATIVA DA NPM-HFN.	19
FIGURA 6 - ADMINISTRAÇÃO DA NPM-HFN POR VIA INTRAPERITONEAL.	21
FIGURA 7 - DELINEAMENTO EXPERIMENTAL DOS GRUPOS C1, C2 E C3. ONDE FORAM ADMINISTRADOS A AMOSTRA NPM-HFN POR VIA INTRAPERITONEAL DURANTE 8 DIAS CONSECUTIVOS E 24H APÓS A ÚLTIMA ADMINISTRAÇÃO FOI FEITA A EUTANÁSIA, COLETA DO SANGUE, DOS ÓRGÃOS E DAS CÉLULAS DA MEDULA DOS ANIMAIS (ADAPTADO DE GUERRINI, 2017).	22
FIGURA 8 - ESQUEMA MOSTRANDO TODOS OS GRUPOS EXPERIMENTAIS.	29
FIGURA 9 - DELINEAMENTO EXPERIMENTAL DOS GRUPOS T-NP(EV)-AFM E T-NP(IT)-AFM, ONDE FORAM ADMINISTRADAS 5 DOSES DA NPM-HFN E FORAM EXPOSTOS POR 10 DIAS AO CAMPO MAGNÉTICO ALTERNADO DURANTE 30 MINUTOS.	31
FIGURA 10 - FOTO DA CAUDA DO ANIMAL LOGO APÓS A ADMINISTRAÇÃO ENDOVENOSA DE 80 μ L DA NPM-HFN. SETA MOSTRA O LOCAL DE ADMINISTRAÇÃO.	32
FIGURA 11 - ÁREA DO TUMOR (MM^2) NA PAREDE ABDOMINAL DEMARCADA POR LINHA AMARELA NO PROGRAMA IMAGE J.	34
FIGURA 12 - ÁREA DA NECROSE DO TUMOR (MM^2) NO LINFONODO DEMARCADA POR LINHA AMARELA NO PROGRAMA IMAGE J.	34
FIGURA 13 - IMAGEM DO GEL DE AGAROSE APÓS A COLORAÇÃO COM KUMASI BLUE.	37
FIGURA 14 - IMAGEM DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO DAS NPM E DISTRIBUIÇÃO DOS DIÂMETROS CORRESPONDENTES, OBTIDA ATRAVÉS DA ESTATÍSTICA DA CONTAGEM DE 1200 NANOPARTÍCULAS.	38
FIGURA 15 - DIFRAÇÃO DE RAIOS X (DRX) DA NPM. AS BARRAS VERMELHAS REPRESENTAM O PADRÃO DA MAGNETITA (FONTE: GUERRINI, 2017).	38
FIGURA 16 - DISTRIBUIÇÃO DO DIÂMETRO DAS AMOSTRAS ATRAVÉS DO DLS.	39
FIGURA 17 - CURVA DE AQUECIMENTO DA AMOSTRA NPM-HFN EXPOSTA AO CAMPO MAGNÉTICO ALTERNADO NA FREQUÊNCIA DE 332,3 KHZ, 228 V E CAMPO MAGNÉTICO DE 342,75 G, DURANTE 30 MIN.	40
FIGURA 18 - VARIAÇÃO DO PESO CORPORAL EM FUNÇÃO DO TEMPO.	41
FIGURA 19 - RAÇÃO CONSUMIDA POR GRUPO EXPERIMENTAL.	42
FIGURA 20 - RESULTADO DO TESTE COMETA.	43
FIGURA 21 - (A) PESO ABSOLUTO DO BAÇO, FÍGADO, PULMÃO, RINS E CÉREBRO.	47
FIGURA 22 - FOTOMICROGRAFIA DE CORTES HISTOLÓGICOS DO BAÇO DE CAMUNDONGOS SWISS CORADOS POR PERLS.	50
FIGURA 23 - FOTOMICROGRAFIA DE CORTES HISTOLÓGICOS DO FÍGADO DE CAMUNDONGOS SWISS CORADOS POR PERLS.	51
FIGURA 24 - FOTOMICROGRAFIA DE CORTES HISTOLÓGICOS DO PULMÃO DE CAMUNDONGOS SWISS.	52
FIGURA 25 - ANÁLISE DE BIODISTRIBUIÇÃO <i>EX VIVO</i> DA NPM-HFN NO (A) RIM, CÉREBRO, PULMÃO, FÍGADO, BAÇO E (B) SANGUE APÓS O TRATAMENTO COM NPM-HFN ADMINISTRADA VIA INTRAPERITONEAL POR 8 DIAS CONSECUTIVOS.	54
FIGURA 26 - FOTO MOSTRANDO O ACÚMULO DA NPM-HFN NA VEIA CAUDAL DO CAMUNDONGO. FOTO TIRADA NO 32º DIA.	55
FIGURA 27 - VARIAÇÃO DO PESO CORPORAL (A) SUBGRUPO DE 2 DIAS E (B) SUBGRUPO DE 28 DIAS DURANTE E APÓS AS 5 ADMINISTRAÇÕES DA NPM-HFN.	56

FIGURA 28 - VARIAÇÃO DO VOLUME TUMORAL <i>IN VIVO</i> UTILIZANDO UM PAQUÍMETRO DIGITAL (A) SUBGRUPO DE 2 DIAS E (B) SUBGRUPO DE 28 DIAS DURANTE E APÓS AS 5 ADMINISTRAÇÕES DA NPM-HFN.	58
FIGURA 29 - VOLUME TUMORAL E DA ÁREA DE NECROSE NO TUMOR <i>EX VIVO</i> (A) SUBGRUPO DE 2 DIAS E (B) SUBGRUPO DE 28 DIAS APÓS AS 5 ADMINISTRAÇÕES DA NPM-HFN.....	60
FIGURA 30 - PESO ABSOLUTO DO BAÇO, FÍGADO, PULMÃO, RINS, CÉREBRO E TUMOR NO SUBGRUPO 2 (A) E NO SUBGRUPO 28 (B) APÓS AS 5 ADMINISTRAÇÕES DA NPM-HFN. OS VALORES DE P DO PULMÃO NO SUBGRUPO 2 FORAM GERADOS USANDO ONE-WAY ANOVA COM PÓS-TESTE TUKEY, E OS DEMAIS VALORES FORAM GERADOS UTILIZANDO O TESTE KRUSKAL-WALLIS. ENQUANTO O VALOR DE P DO BAÇO, FÍGADO E RINS NO SUBGRUPO 28 FORAM GERADOS USANDO ONE-WAY ANOVA COM PÓS-TESTE TUKEY, OS DEMAIS VALORES FORAM GERADOS UTILIZANDO O TESTE KRUSKAL-WALLIS. * SIGNIFICA P < 0,05.	67
FIGURA 31 - PESO RELATIVO DO BAÇO, FÍGADO, PULMÃO, RINS, CÉREBRO E TUMOR NO SUBGRUPO 2 (A) E NO SUBGRUPO 28 (B) APÓS AS 5 ADMINISTRAÇÕES DA NPM-HFN..	68
FIGURA 32 – NECROSE E COMPROMETIMENTO DO LINFONODO SUBILÍACO DIREITO POR MICROMETÁSTASE APÓS AS 5 ADMINISTRAÇÕES DA NPM-HFN.	70
FIGURA 33 - FOTOMICROGRAFIA DE CORTES HISTOLÓGICOS DO BAÇO DE CAMUNDONGOS SWISS APÓS AS 5 ADMINISTRAÇÕES DA NPM-HFN CORADOS POR PERLS DO SUBGRUPO 2.....	72
FIGURA 34 - FOTOMICROGRAFIA DE CORTES HISTOLÓGICOS DA MAMA/TUMOR DE CAMUNDONGOS SWISS APÓS AS 5 ADMINISTRAÇÕES DA NPM-HFN CORADOS POR PERLS DO SUBGRUPO 2.	73
FIGURA 35 - FOTOMICROGRAFIA DE CORTES HISTOLÓGICOS DO LINFONODO DE CAMUNDONGOS SWISS APÓS AS 5 ADMINISTRAÇÕES DA NPM-HFN CORADOS POR PERLS DO SUBGRUPO 2.	74
FIGURA 36 - FOTOMICROGRAFIA DE CORTES HISTOLÓGICOS DO FÍGADO DE CAMUNDONGOS SWISS APÓS AS 5 ADMINISTRAÇÕES DA NPM-HFN CORADOS POR PERLS DO SUBGRUPO 2.....	75
FIGURA 37 - FOTOMICROGRAFIA DE CORTES HISTOLÓGICOS DO BAÇO DE CAMUNDONGOS SWISS APÓS AS 5 ADMINISTRAÇÕES DA NPM-HFN CORADOS POR PERLS DO SUBGRUPO 28.....	77
FIGURA 38 - FOTOMICROGRAFIA DE CORTES HISTOLÓGICOS DA MAMA/TUMOR DE CAMUNDONGOS SWISS APÓS AS 5 ADMINISTRAÇÕES DA NPM-HFN CORADOS POR PERLS DO SUBGRUPO 28.	78
FIGURA 39 - FOTOMICROGRAFIA DE CORTES HISTOLÓGICOS DA MAMA/TUMOR DE CAMUNDONGOS SWISS APÓS AS 5 ADMINISTRAÇÕES DA NPM-HFN CORADOS POR PERLS DO SUBGRUPO 28.	79
FIGURA 40 - FOTOMICROGRAFIA DE CORTES HISTOLÓGICOS DO FÍGADO DE CAMUNDONGOS SWISS APÓS AS 5 ADMINISTRAÇÕES DA NPM-HFN CORADOS POR PERLS DO SUBGRUPO 28.....	80
FIGURA 41 - FOTOMICROGRAFIA DO BAÇO EM CTR (A), NP(EV) (B), T-CTR (C) T-NP(IT) (D), T-NP(EV)AFM (E), T-NP(IT)AFM (F), T-AFM (G) E T-NP(EV) (H). HIPERPLASIA LINFOIDE (*) E HEMATOPOIESE (SETA LARANJA). A, B, C, D, E, F, G E H	82
FIGURA 42 - FOTOMICROGRAFIA DO CÉREBRO EM CTR (A), NP(EV) (B), T-CTR (C) T-NP(IT) (D), T-NP(EV)AFM (E), T-NP(IT)AFM (F), T-AFM (G) E T-NP(EV) (H).....	83
FIGURA 43 - FOTOMICROGRAFIA DO FÍGADO. HEMATOPOIESE (*) EM CTR (A), NP(EV) (B), T-CTR (C) T-NP(IT) (D), T-NP(EV)AFM (E), T-NP(IT)AFM (F), T-AFM (G) E T-NP(EV) (H). INFLAMAÇÃO AGUDA (SETA LARANJA) EM T-NP(EV)AFM (E). A, B, C, D, F, G E H (HE, 100X);	84
FIGURA 44 - FOTOMICROGRAFIA DO LINFONODO EM CTR (A), NP(EV) (B), T-CTR (C) T-NP(IT) (D), T-NP(EV)AFM (E), T-NP(IT)AFM (F), T-AFM (G) E T-NP(EV) (H).....	85
FIGURA 45 - FOTOMICROGRAFIA DO PULMÃO. CONGESTÃO (*) EM CTR (A), NP(EV) (B), T-CTR (C) T-NP(IT) (D), T-NP(EV)AFM (E), T-NP(IT)AFM (F), T-AFM (G) E T-NP(EV) (H).	86
FIGURA 46 - FOTOMICROGRAFIA DO RIM EM CTR (A), NP(EV) (B), T-CTR (C) T-NP(IT) (D), T-NP(EV)AFM (E), T-NP(IT)AFM (F), T-AFM (G) E T-NP(EV) (H).....	87
FIGURA 47 - FOTOMICROGRAFIA DO TUMOR NA MAMA EM CTR-2 (A), NP(EV)-28 (B), T-CTR-28 (C) T-NP(IT)-28 (D), T-NP(EV)AFM-28 (E), T-NP(IT)AFM-2 (F), T-AFM-2 (G) E T-NP(EV)-28 (H). ...	88
FIGURA 48 - - FOTOMICROGRAFIA DO BAÇO EM CP (A), C1 (B), C2(C) E C3(D).	132
FIGURA 49 - FOTOMICROGRAFIA DO CÉREBRO EM CP (A), C1 (B), C2(C) E C3(D).....	133
FIGURA 50 - FOTOMICROGRAFIA DO FÍGADO EM CP (A), C1 (B), C2(C) E C3(D)..	134

FIGURA 51 - FOTOMICROGRAFIA DO LINFONODO NORMAL EM CP (A), C1 (B) E C2 (C). EM D (C3).	135
FIGURA 52 - FOTOMICROGRAFIA DO PULMÃO EM CP (A), C1 (B), C2(B) E C3(D).....	136
FIGURA 53 - FOTOMICROGRAFIA DO RIM EM CP (A), C1 (B), C2(B) E C3(D)	137

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – PROTOCOLO PARA COLORAÇÃO COM PERLS.	27
TABELA 2 – PROTOCOLO UTILIZADO NO TRATAMENTO; DETALHES SOBRE A ADMINISTRAÇÃO DA NPM-HFN E DO SORO FISIOLÓGICO NOS ANIMAIS CONTROLE.	31
TABELA 3 - RESULTADOS DO TESTE DO MICRÔNÚCLEO (MN) EM CAMUNDONGOS SWISS FÊMEAS APÓS O TRATAMENTO COM NPM-HFN ADMINISTRADA VIA INTRAPERITONEAL POR 8 DIAS CONSECUTIVOS.....	42
TABELA 4 - ANÁLISES HEMATOLÓGICAS DE CAMUNDONGOS SWISS FÊMEAS SAUDÁVEIS APÓS O TRATAMENTO COM NPM-HFN ADMINISTRADA VIA INTRAPERITONEAL POR 8 DIAS CONSECUTIVOS.....	44
TABELA 5 - RESULTADOS DAS DOSAGENS BIOQUÍMICAS DE CAMUNDONGOS SWISS FÊMEAS SAUDÁVEIS APÓS O TRATAMENTO COM NPM-HFN ADMINISTRADA VIA INTRAPERITONEAL POR 8 DIAS CONSECUTIVOS.....	45
TABELA 6 - PRESENÇA DE FERRO OBSERVADA NA ANÁLISE POR PERLS APÓS O TRATAMENTO COM NPM-HFN ADMINISTRADA VIA INTRAPERITONEAL POR 8 DIAS CONSECUTIVOS.	49
TABELA 7 - ANÁLISES HEMATOLÓGICAS DE CAMUNDONGOS SWISS FÊMEAS APÓS AS 5 ADMINISTRAÇÕES DA NPM-HFN.	61
TABELA 8 - ANÁLISES HEMATOLÓGICAS DE CAMUNDONGOS SWISS FÊMEAS APÓS AS 5 ADMINISTRAÇÕES DA NPM-HFN.	63
TABELA 9 - RESULTADOS DAS DOSAGENS BIOQUÍMICAS DE CAMUNDONGOS SWISS FÊMEAS APÓS AS 5 ADMINISTRAÇÕES DA NPM-HFN.....	65
TABELA 10 – PRESENÇA DE FERRO OBSERVADA NA ANÁLISE POR PERLS NO SUBGRUPO DE 2 DIAS APÓS AS 5 ADMINISTRAÇÕES DA NPM-HFN. AUSÊNCIA DE FERRO (-), POUCO FERRO (+), CONCENTRAÇÃO DE FERRO MEDIANA (++) , MUITO FERRO (+++).....	71
TABELA 11 - PRESENÇA DE FERRO OBSERVADA NA ANÁLISE POR PERLS NO SUBGRUPO DE 28 DIAS APÓS AS 5 ADMINISTRAÇÕES DA NPM-HFN. AUSÊNCIA DE FERRO (-), POUCO FERRO (+), CONCENTRAÇÃO DE FERRO MEDIANA (++) , MUITO FERRO (+++).....	76

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Abreviatura /Sigla	Significado
<	Menor
>	Maior
µm	Micrometro
µL	Microlitro
%EPC	Porcentagem de EPC
ALT	Alanina Aminotransferase
ANOVA	Análise de Variância
AST	Aspartato Aminotransferase
CMA	Campo magnético de frequência alternada
DLS	Espalhamento de luz dinâmico
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DRX	Difração de Raio X
EDTA	Etilenodiamino Tetra-acético
EPC	Eritrócito policromático
EPN	Eritrócito normocromático
ERO	Espécies reativas de oxigênio
FM	Fluido Magnético
GEM	Departamento de Genética e Morfologia
H&E	Hematoxilina e Eosina
HCT	Hematócrito
HF _n	Ferritina humana
HGB	Hemoglobina
IB	Instituto de Ciências Biológicas
ICCOM	Institute of Chemistry of OrganoMetallic Compounds
ICP-OES	Espectrometria de massa com fonte de plasma
LDH	Desidrogenase láctea
MCH	Hemoglobina Corpuscular Média
MCHC	Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média
MCV	Volume Corpuscular Médio

MET	Microscópio Eletrônico de Transmissão
ML	Mililitro
MHT	Magnetohipertermia
MG	Miligrama
MMS	MetilMetanoSulfonato
MN	Micronúcleo
NM	Nanômetro
NPM	Nanopartículas magnéticas
NPM-HFn	Nanopartículas magnéticas à base de magnetita recobertas com ferritina
OECD	Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBS	Cloreto de sódio tamponado com fosfato
PdI	Índice de Polidispersão
pH	Potencial de Hidrogênio
PLT	Plaquetas
RBC	Número total de células vermelhas
RPM	Rotação por minuto
SFB	Soro fetal bovino
SCGAE	<i>Single cell gel assay eletrophoresis</i>
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences
TAE	Tumor Ascítico de Ehrlich
WBC	Número total de células brancas
W-LCR	Razão porcentual de células brancas grandes
W-MCR	Razão porcentual de células brancas médias
W-SCR	Razão porcentual de células brancas pequenas

Sumário

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Câncer	1
1.2. Câncer de mama	1
1.3. Tratamentos convencionais	2
1.4. Nanotecnologia	3
1.5. Nanopartículas magnéticas	4
1.6. Magnetohipertermia	5
1.7. Metabolismo do ferro	6
1.8. Ferritina	8
1.9. Tumor de Ehrlich	10
1.10. Toxicidade	10
1.10.1. Teste de Micronúcleo	11
1.10.2. Teste Cometa	12
2. JUSTIFICATIVA	15
3. OBJETIVO GERAL	17
3.1. Objetivos específicos	17
4. MATERIAL E METODOLOGIA	19
4.1. Síntese do fluido magnético (FM) - NPM-HFn	19
4.2. Caracterização da amostra NPM-HFn	20
4.2.1. Caracterização física e magnética da amostra	20
4.2.2. Termometria <i>in vitro</i>	20
4.3. ANÁLISE DA TOXICIDADE E DA BIODISTRIBUIÇÃO DA NPM-HFn	20
4.3.1. Grupos experimentais	20
4.3.2. Delineamento experimental	21
4.3.3. Análises clínicas	23
4.3.4. Análises hematológica e bioquímica	23
4.3.5. Análise de genotoxicidade	24
4.3.5.1. Teste de micronúcleo	24
4.3.5.2. Teste cometa	24
4.3.6. Análise histopatológica	25
4.3.7. Análise da biodistribuição	26
4.3.7.1. Coloração de Perls	26
4.3.7.2. Espectrometria de Emissão Óptica com Plasma (ICP-OES)	27
4.4. EFICÁCIA DA NPM-HFn PARA O TRATAMENTO DE ADENOCARCINOMA MAMÁRIO DE EHRLICH	28
4.4.1. Grupos experimentais	28
4.4.2. Indução tumoral	30
4.4.3. Tratamento por Magnetohipertermia (MHT)	30
4.4.4. Avaliação do crescimento tumoral	32
4.4.5. Análise clínica	33
4.4.6. Análise hematológica e bioquímica	33
4.4.7. Análise histopatológica	34

4.4.8. Análise de biodistribuição	35
4.4.9. Análise estatística.....	35
5. RESULTADOS	37
5.1. SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA NPM-HFn	37
5.1.1. Avaliação da associação da ferritina à NPM	37
5.1.2. Caracterização da amostra NPM-HFn	38
5.1.3. Termometria in vitro	39
5.2 ANÁLISE DA TOXICIDADE DA NPM-HFn	40
5.2.1. Análise dos parâmetros clínicos	40
5.2.2. Análise genotóxica	42
5.2.2.1. Teste de micronúcleo	42
5.2.2.2. Teste cometa.....	43
5.2.3. Análise hematológica	44
5.2.4. Análise bioquímica	45
5.2.5. Análise dos órgãos.....	46
5.2.6. Análise histopatológica.....	47
5.2.7. Análise de biodistribuição	48
5.2.7.1. Análise histológica – coloração de Perls.....	48
5.2.7.2. ICP-OES.....	53
5.3. EFICÁCIA DA NPM-HFn NO TRATAMENTO DE ADENOCARCINOMA MAMÁRIO DE EHRLICH.....	54
5.3.1. Análise dos parâmetros clínicos	54
5.3.2. Volume tumoral.....	56
5.3.3. Análise hematológica	61
5.3.4. Análise bioquímica	64
5.3.5. Análise dos órgãos não alvo	66
5.3.6. Análise de biodistribuição	71
5.3.7. Análise histopatológica.....	81
6. DISCUSSÃO.....	90
6.1. Considerações sobre as características físico-químicas da NPM-HFn.....	90
6.2. Considerações sobre a toxicidade e biodistribuição da NPM-HFn	92
6.3. Considerações sobre a eficácia da NPM-HFn para o tratamento de adenocarcinoma mamário de Ehrlich	98
7. CONCLUSÃO	103
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	105
ANEXO 1: Comitê de ética.....	131
ANEXO 2: Fotomicrografia do baço em CP, C1, C2 e C3.....	132
ANEXO 3: Fotomicrografia do cérebro em CP, C1, C2 e C3	133
ANEXO 4: Fotomicrografia do fígado em CP (A), C1 (B), C2(C) e C3.....	134
ANEXO 5: Fotomicrografia do linfonodo normal em CP, C1, C2 e C3	135
ANEXO 6: Fotomicrografia do pulmão em CP, C1, C2 e C3	136
ANEXO 7: Fotomicrografia do rim em CP (A), C1 (B), C2(B) e C3	137

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. CÂNCER

O termo câncer refere-se a um conjunto de doenças que se caracterizam por proliferação e crescimento celular descontrolados. O câncer desenvolve-se devido às mutações de determinados genes que controlam a função celular. O risco de câncer é aumentado com as mutações genéticas, as quais podem ser hereditárias se a mutação estiver presente nas células germinativas ou reprodutivas, ou podem ser adquiridas durante a vida do indivíduo decorrentes de erros durante a divisão celular (mutação somática) (VECCHIO *et al.*, 2018). Neste segundo caso, pode ser causado por fatores externos relacionados ao meio ambiente, como agentes físicos (como radiação ultravioleta e ionizante), agentes químicos (como agentes do tabaco, excesso de álcool, arsênico) e agentes biológicos (como infecções por vírus ou bactérias). A carcinogênese pode também ser iniciada ou progredir devido à ação conjunta ou sequencial desses fatores (CHAMMAS, 2013; HANAHAN & WEINBERG, 2017).

O desenvolvimento do câncer ocorre em várias etapas, nas quais as células adquirem uma série de mutações que, eventualmente, as conduzem ao crescimento e divisões celulares desenfreadas, inibindo a diferenciação celular e escapando da morte celular. De acordo com o crescimento tumoral, a angiogênese pode ser estimulada, formando vasos sanguíneos que fornecem oxigênio e nutrientes às células tumorais. Ocasionalmente, as células tumorais invadem tecidos adjacentes, levando à metástase (WEINBERG, 2013).

A maioria dos cânceres humanos surge a partir dos tecidos epiteliais, sendo denominados carcinoma. Alguns tecidos epiteliais apresentam células especializadas que secretam substâncias nas cavidades ou ductos que eles revestem, e o tumor nesse tipo de tecido epitelial é denominado adenocarcinoma (WEINBERG, 2013).

O câncer pode levar a sérias complicações de saúde e muitas vezes até ao óbito, representando assim um problema de saúde pública mundial. A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que em 2015 no mundo tenham ocorrido mais de 8,8 milhões de mortes devido ao câncer (OMS, 2017).

1.2. CÂNCER DE MAMA

Excluindo o câncer de pele não melanoma, o câncer de mama é o tipo mais comum que acontece em mulheres em todo o mundo (OPAS, 2017). Em 2018 é esperado, no Brasil, cerca de 59.700 novos casos (INCA, 2018), e para 2030 é possível que ocorra a incidência de 27 milhões de casos, 17 milhões de mortes e 75 milhões de pessoas portando algum tipo de neoplasia maligna no mundo (OMS, 2013). Apenas na América Latina, é esperado o aumento de 46% de novos casos de câncer de mama neste mesmo ano (OPAS, 2017). O crescimento, tanto do número de novos casos, como de mortes causadas pelo câncer de mama decorre, em grande parte, do envelhecimento da população, do desenvolvimento de novas tecnologias que permitem a detecção e do registro de informações (BRASIL, 2011; STUCKEY, 2011; ABDULKAREEM, 2012). A prevenção e a descoberta do câncer em seu estágio inicial são os fatores de maior relevância para a redução do índice de mortalidade de pacientes (LIANG & YAGUANG, 2016).

Existem vários fatores associados ao aumento do risco de desenvolver câncer de mama. A hereditariedade é um fator que aumenta bastante o risco, especialmente, a herança de mutações nos genes BRCA1, BRCA2 e p53. Fatores reprodutivos relacionados ao estímulo do estrogênio endógeno, como menarca precoce, menopausa tardia, primeira gravidez após os 30 anos e a nuliparidade (não ter tido filhos) estão entre os fatores de maior importância no aumento do risco. O uso de hormônios exógenos, como o uso de contraceptivo orais e terapia de reposição hormonal, também é considerado fator de risco pela Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (IARC) da Organização Mundial da Saúde (OMS). Outro fator importante está relacionado ao ambiente e estilo de vida, como a ingestão de álcool, obesidade, sedentarismo e ao tabagismo (INCA, 2018; OMS, 2018).

1.3. TRATAMENTOS CONVENCIONAIS

Os procedimentos mais utilizados atualmente no combate ao câncer de mama são cirurgia, radioterapia, quimioterapia e imunoterapia, utilizadas independentemente ou, preferencialmente, em conjunto (CRICH, 2015). A cirurgia baseia-se na remoção do tumor com a finalidade de eliminar qualquer vestígio da neoplasia. Por muitas vezes, os procedimentos cirúrgicos falham devido à permanência de células tumorais que não foram removidas ou devido à existência de micrometástases que não tenham sido detectadas no momento da cirurgia (POHLMANN, 2004).

A radioterapia, por sua vez, consiste na utilização de um feixe de radiação ionizante com o objetivo de induzir a morte das células tumorais (MARKS *et al.*, 1991; MACHADO, 2000; RANG *et al.*, 2004). Ainda que as células tumorais sejam mais vulneráveis a essa radiação, as células normais também são afetadas, assim levando a diversos efeitos adversos (MALAS *et al.*, 2004; PIERCE, 2005; NILSSON *et al.*, 2011).

Já a quimioterapia antineoplásica utiliza substâncias químicas que, pela falta de especificidade, danificam a função e a proliferação celular, tanto das células tumorais quanto das células saudáveis, causando assim, efeitos colaterais indesejáveis (BROWN & GIACCIA, 1998; CHUNFU *et al.*, 2004). Além disso, existe a possibilidade de o tumor criar resistência a essas drogas (MISRA *et al.*, 2010).

A imunoterapia consiste na estimulação do sistema imunitário do próprio paciente para que combata as células tumorais, evitando que as mesmas escapem do seu controle (ROSENBERG *et al.*, 2004; MELLMAN *et al.*, 2011). As alterações genéticas e epigenéticas comuns nas células tumorais permite que o sistema imune consiga distinguir as células tumorais das células saudáveis (PARDOLL, 2012). Progressos importantes têm sido atingidos com essa terapia. Em 2013 foi aprovado nos EUA um conjugado droga-anticorpo, que trata câncer de mama com poucos efeitos colaterais (CAVALLÉ; PUNTES, 2015).

Ainda que a imunoterapia represente um grande avanço no tratamento do câncer, a falta de especificidade e os efeitos adversos causados pelos tratamentos convencionais, demanda pela busca de novas modalidades de tratamento para o câncer. Os avanços na área de Nanobiotecnologia têm resultado no desenvolvimento de novas terapias, contribuindo para superar/minimizar essas limitações dos tratamentos tradicionais de câncer (PANKHURST *et al.*, 2003). O uso de nanopartículas como um instrumento biomédico em diagnóstico, entrega seletiva de fármaco e em terapia de doenças tem sido promissor (MANDAL & CHAUDHURI, 2016).

1.4. NANOTECNOLOGIA

A nanotecnologia refere-se à aplicação da Nanociência, o estudo de nanomateriais. O termo nanomaterial foi descrito como “material com alguma dimensão externa em nanoescala ou estrutura interna ou com superfície em nanoescala” pela Organização Internacional de Normalização (GOLBAMAKI *et al.*, 2015). O termo nanoescala corresponde, segundo as versões mais aceitas, à escala de 1 nm até 100 nm. As nanopartículas representam uma subcategoria dos nanomateriais, e são definidas como partículas que possuem as três dimensões externas na escala nanométrica (GOLBAMAKI *et al.*, 2015).

As propriedades físico-químicas conferidas aos materiais na escala nanométrica são diferenciadas das propriedades do material de origem devido ao seu tamanho, área superficial e estrutura (GLEITER, 2000). O interesse na utilização desses nanomateriais tem crescido, pois eles prometem melhora no desempenho e novas funcionalidades, como, por exemplo, entrega de fármacos especificamente para o alvo, diminuição do consumo de energia, diminuição da poluição ambiental (KARLSSON, 2010), entre muitas outras. Já foram caracterizados vários tipos de

nanopartículas para uso no tratamento de câncer, como por exemplo lipossomas, nanoemulsões, nanocápsulas, micelas, nanopartículas poliméricas, nanopartículas de ouro, nanopartículas de prata, nanopartículas magnéticas, dentre outras (YU *et al.*, 2012). Dados evidenciam que a nanotecnologia já fez progresso significativo no diagnóstico e tratamento do câncer, particularmente pelo emprego de nanopartículas magnéticas (NEUWELT *et al.*, 2004; LEE *et al.*, 2007; SUN *et al.*, 2008).

1.5. NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS

Nanopartículas magnéticas (NPM) dispersas em líquidos carreadores orgânicos ou inorgânicos constituem suspensões coloidais estáveis conhecidas como fluidos magnéticos (FM) (ROSENWEIG, 1985).

A capacidade desses fluidos magnéticos de serem usados como ferramenta para diagnóstico, carreador de fármaco, gerador de calor, além da facilidade de chegar aos tecidos alvos pelo tamanho reduzido de suas NPM, podendo aumentar a eficácia terapêutica e diminuir os efeitos adversos indesejados, são algumas características que os tornam interessantes para o uso biomédico (KAFROUNI & SAVADOGO, 2016).

Grande variedade de fluidos magnéticos (FM) tem sido desenvolvida. Os fluidos magnéticos (FM) são coloides magnéticos de nanopartículas magnéticas monodomínio, também denominados ferrofluido, dispersos em um líquido carreador que pode ser polar ou apolar (TOURINHO *et al.*, 1998). As interações entre o fluido carreador e as nanopartículas magnéticas permitem que se comportem de maneira homogênea, ou seja, a suspensão é deslocada como um todo e não somente as nanopartículas são expostas ao campo magnético (LACAVA & MORAIS, 2012). O fluido magnético pode ser caracterizado como iônico ou surfactado dependendo da forma em que é estabilizado. Os FM iônicos possuem sua superfície carregada eletricamente para repelir eletrostaticamente a aproximação entre as partículas, enquanto que os FM surfactantes possuem uma camada molecular cobrindo sua superfície, o que causa repulsão estérica entre as partículas (MORAIS *et al.*, 2006).

O revestimento das nanopartículas magnéticas é recomendado para evitar aglomeração e garantir a estabilidade coloidal do fluido. Em particular, o grupo do laboratório NanoGem da UnB já investigou diversos tipos de fluidos magnéticos contendo NPM recobertas com diferentes coberturas estabilizantes, entre as quais: citrato (BRUGIN, 2007; ROMERO, 2015; NEVES *et al.*, 2017), polifosfato (PORTILHO, 2007), ácido poliaspártico (SADEGHIANI, 2008), albumina bovina (LACAVA, 2009), albumina (ESTEVANATO *et al.*, 2011, 2012), dextrana

(ESTEVEANATO *et al.*, 2012; MIRANDA-VILELA *et al.*, 2013, 2014), ácido dimercapto-succínico (CAMPOS DA PAZ, 2012), bicamada de ácido láurico e selol (AVELINO, 2013).

Entre os inúmeros nanomateriais magnéticos existem as estruturas do tipo casca núcleo (do inglês *core shell*) que vêm sendo alvo de interesse, principalmente por sua ampla área de atuação: como sensor, em reações catalíticas, em diagnósticos e tratamentos de doenças e entrega seletiva de fármacos (SON *et al.*, 2005; SEO *et al.*, 2006; HUANG & HAINFELD, 2013; MANDAL *et al.*, 2013). Este tipo de estrutura *core shell* consiste em um núcleo ou matéria em seu interior e uma casca ou envoltório, na parte externa (MANDAL & CHAUDHURI, 2016).

1.6. MAGNETOHIPERTERMIA

Os FM têm sido empregados na técnica de hipertermia, também chamada de magnetohipertermia (MHT) (ITO, 2006). A MHT consiste no aumento da temperatura na região afetada, visando destruir as células tumorais (MANTHE *et al.*, 2010). É bem estabelecido que o aumento da temperatura na faixa de 42°C a 46°C é menos tolerado pelas células tumorais do que pelas células saudáveis e, desta forma, o calor é efetivo em diminuir a viabilidade celular do tumor (TORCHILIN, 2007; ANKAMWAR *et al.*, 2010).

Busch (1866) foi o primeiro a reportar um caso em que a temperatura elevada poderia destruir especificamente o tecido tumoral, ao mesmo tempo em que era tolerado pelo tecido saudável. Outros estudos reportaram que febre alta regredia o tumor, gerando grande interesse em descobrir formas artificiais de induzir o aumento da temperatura em pacientes oncológicos (STROHBEHN & DOUPLE, 1984). Mas foi apenas no século passado que o calor começou a ser utilizado como uma ferramenta terapêutica contra o câncer. Apesar de não ter ocorrido mudanças no uso terapêutico do calor em células tumorais, o método de entrega e de gerar calor tem sofrido muitos avanços. O mais recente é o emprego de nanopartículas magnéticas para gerar hipertermia (SANZ *et al.*, 2017). O uso da MHT baseia-se na exposição do FM a um campo magnético alternado de baixa frequência (de 100 kHz a 1000 kHz) resultando no aumento da temperatura devido à conversão da energia magnética em calor (GOYA *et al.*, 2008; YANG & CHANG, 2016).

Resultados promissores após uso da MHT já foram demonstrados para o tratamento de vários tipos de câncer, incluindo tumor bucal (CANDIDO *et al.*, 2014) e tumor de mama (MIRANDA-VILELA *et al.*, 2013, 2014; ROMERO, 2015). Em estudo *in vivo* com camundongos, Romero (2015) obteve regressão completa do adenocarcinoma mamário de Ehrlich por meio do tratamento combinado da MHT realizada com NPM recobertas com citrato e quimioterapia com nanocápsulas de Selol. Estes e outros estudos de tratamento do câncer por MHT têm revelado benefícios em relação às terapias clássicas, como maior especificidade e menos efeitos colaterais

indesejáveis. Estudos clínicos têm mostrado a eficácia da magnetohipertermia no tratamento de câncer (HERMAN *et al.*, 1988; KIDA *et al.*, 1990; VAN VULPEN *et al.*, 2004; JOHANNSEN *et al.*, 2005).

Em consonância, o presente trabalho estuda uma amostra de fluido magnético constituído por nanopartículas de magnetita recobertas por ferritina (estrutura *core shell*). Por serem constituídas de magnetita aumentarão a concentração de ferro no organismo e por estarem recobertas de ferritina poderão interferir no metabolismo do ferro.

1.7. METABOLISMO DO FERRO

O ferro é um mineral essencial para a homeostase celular, apresentando funções importantes para o transporte de oxigênio, metabolismo energético e síntese de DNA (WIJAYANTI *et al.*, 2004). Entretanto, por doar ou receber elétrons livres (TORTI & TORTI, 2013) pode participar da produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e assim ser tóxico para as células (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1984; THEIL, 1987; GANZ, 2008; MACKENZIE *et al.*, 2008), uma vez que as ERO podem lesionar proteínas, lipídeos e o DNA. É crucial, portanto, uma forte regulação da homeostase do ferro (BEAUMONT & VAULONT, 2006; DONOVAN *et al.*, 2006; GROTTTO, 2008).

O ferro presente no plasma, proveniente por exemplo, da alimentação, se liga à transferrina (Tf), uma glicoproteína de 80 KDa sintetizada e secretada pelo fígado que transporta e entrega o ferro para os tecidos periféricos (GROTTTO, 2008). A entrega do ferro é feita através do reconhecimento e ligação da Tf com o TfR1, o receptor de transferrina 1 que é expresso na superfície de quase todas as células. Esse complexo TfR1/Tf-(Fe³⁺)₂ é, então endocitado. Uma vez no endossoma, o Fe³⁺ é reduzido em Fe²⁺ pela ferredutase STEAP3, assim podendo sair do endossoma através do transportador transmembrana DMIT1 (MANZ *et al.*, 2016), que possui grande afinidade pelo Fe²⁺ (OHGAMI *et al.*, 2005). Já no citosol, o Fe é incorporado por moléculas que contenham ferro ou pela proteína de estoque de ferro, a ferritina, como demonstrado pela figura 1 (HARRISON & AROSIO, 1996). O ferro transportado pela Tf, que possui alta afinidade pelo Fe³⁺, tem sua reatividade atenuada, o que facilita a sua liberação para as células (Figura 1).

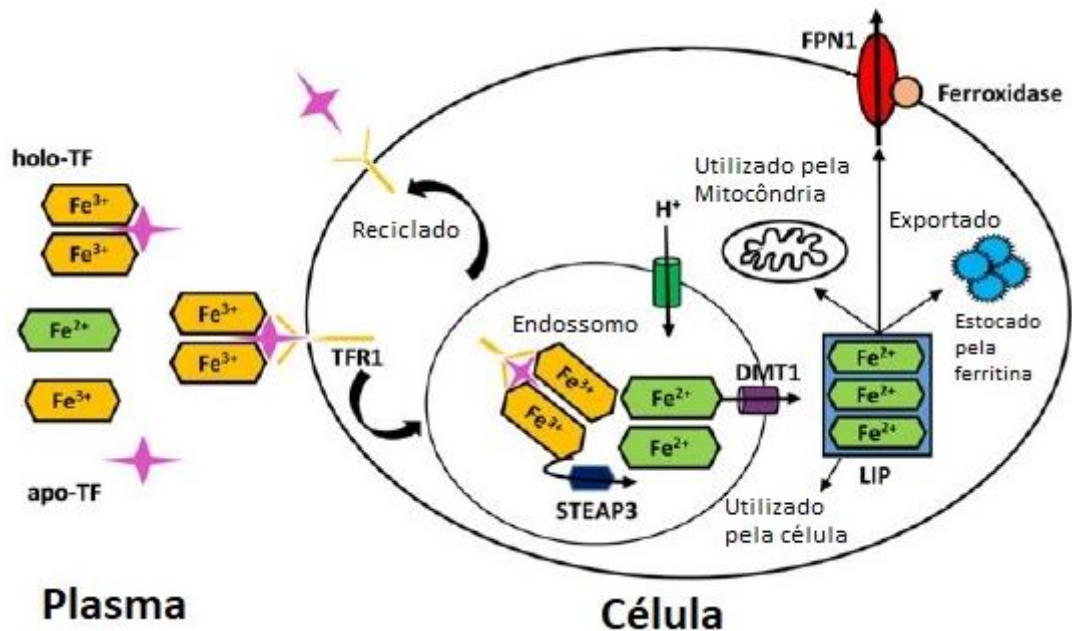


Figura 1 - Esquema geral do metabolismo do ferro. O ferro presente no plasma se liga a transferrina (apo-TF) circulante, formando o complexo transferrina-Fe³⁺ (holo-TF), que irá se ligar ao receptor de transferrina 1 (TFR1) sendo, então, endocitado e o ferro liberado da transferrina. A ferrirredutase (STEAP3) reduz o Fe³⁺ em Fe²⁺, que é transportado para o citosol pelo DMT1, assim, entrando no pool de ferro lábil intracelular (LIP). O LIP é utilizado de várias formas dependendo da necessidade celular e o excesso de ferro é estocado pela ferritina ou lançado para a circulação pela ferroportina (FPN1) associado a ferroxidase (Adaptado de MANZ *et al.*, 2016).

Foi reportado por vários estudos que a expressão de Tfr1, que é essencial para a interiorização de ferro e regulação do crescimento celular, é aumentada em células cancerosas, em comparação com as células normais (DANIELS *et al.*, 2006a; DANIELS *et al.*, 2006b). Também observaram que as células cancerosas conseguem aumentar o nível de ferro intracelular através do aumento da captação do ferro e, também, através do controle do nível de proteínas que estocam o ferro, como a ferritina. A ferritina estoca o excesso de ferro, permitindo que o ferro seja acumulado dentro da célula, enquanto previne o estresse oxidativo causado pelo excesso de ferro (MARCUS & ZINBERG, 1974; WEINSTEIN *et al.*, 1982; WEINSTEIN *et al.*, 1989; MANZ *et al.*, 2016). Foi observado que existe uma grande expressão de ferritina em células estromais presentes no microambiente tumoral no câncer de mama (ROSSIELLO *et al.*, 1984). Estas células estromais são macrófagos CD68+ infiltrados no tumor, os quais conseguem secretar ferritina. A ferritina secretada localmente no tumor aparenta contribuir para a proliferação celular das células cancerosas através de um mecanismo independente de ferro (ALKHATEEB *et al.*, 2013).

Quando o organismo apresenta deficiência de ferro, as proteínas reguladoras do ferro (IRP) se ligam aos elementos reguladores do ferro (IRE) presentes no mRNA da ferritina e da ferroportina (FPN-1) e, assim, reprimem a expressão da ferritina e da FPN-1, o que evita que o ferro seja eliminado da célula. Já em condições de excesso de ferro citossólico, ocorre a desestabilização dos IRPs evitando, assim, que eles se liguem aos IRE, o que resulta no aumento da síntese de ferritina e FPN-1. Além de minimizar os efeitos tóxicos do excesso de ferro, o

controle da importação, estocagem e efluxo do ferro, os IRP satisfazem as necessidades metabólicas do ferro (MANZ *et al.*, 2016).

1.8. FERRITINA

A ferritina é a principal proteína de estoque de ferro no organismo, acumulando uma alta concentração de ferro livre e, assim, impedindo a formação de ERO produzidos pelo excesso de ferro livre (HARRISON & AROSIO, 1996; AROSIO & LEVI, 2002; TORTI & TORTI, 2002). A apoferritina, que é a ferritina em sua forma livre de ferro, tem uma forma esférica e seu núcleo pode acomodar 4.500 átomos de Fe na forma de hidroxifosfato férrico. Esta proteína tem a capacidade de auto-organização e é composta por 24 subunidades (FORD *et al.*, 1984) que formam a estrutura de 12 nm de diâmetro da sua gaiola (*cage*) com a cavidade interior de 8 nm de diâmetro (Figura 2).

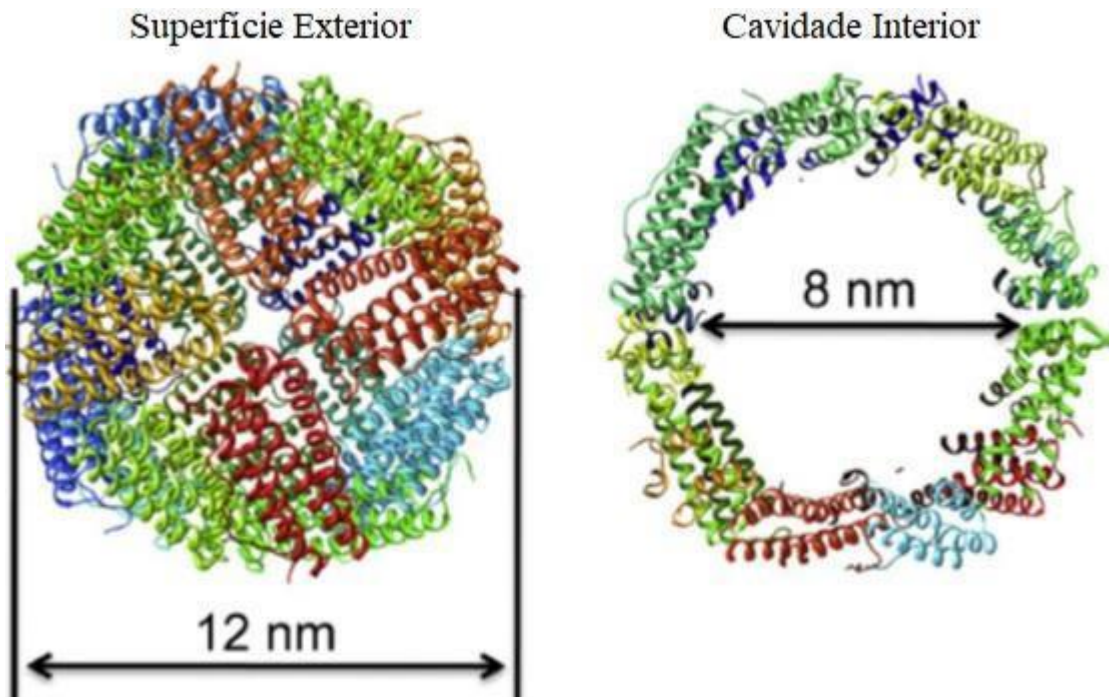


Figura 2 - Diagrama de fita da superfície exterior e da cavidade interna da Ferritina (Adaptado de UCHIDA *et al.*, 2010).

As subunidades da ferritina são divididas em dois tipos, cadeia leve (FLC) e cadeia pesada (FHC) (THEIL, 1987; AHN *et al.*, 2005). A razão entre L e H varia de acordo com a espécie, órgão e tipo de resposta inflamatória. A maior diferença entre a cadeia leve e a cadeia pesada está em sua função, enquanto a FHC oxida Fe^{2+} em Fe^{3+} e facilita o acúmulo de ferro na proteína (LEVI *et al.*, 1988), o ferro na FLC é estocado na forma de ferridrita, sua forma mineral, e promove a nucleação da ferridrita (FORD *et al.*, 1984; HARRISON & AROSIO, 1996). A ferritina pode

ser mais ácida ou mais básica dependendo da proporção de cadeia pesada e cadeia leve; se apresentar mais cadeia leve será mais básica, predominante em tecidos comprometidos com a estocagem de ferro, como o fígado e o baço, e se apresentar mais cadeia pesada será mais ácida, predominante no coração e eritrócitos (FAIRBANKS & BEUTLER, 2001; HOFFBRAND *et al.*, 2006).

Os elevados níveis de ferritina extracelular estão associados a condições patológicas, como inflamação, angiogênese e câncer, assim sendo considerado um bom marcador para essas condições (KNOVICH *et al.*, 2009; WANG *et al.*, 2010; MEYRON-HOLTZ *et al.*, 2011; FAN *et al.*, 2013). Foi observado que tanto a ferritina sérica quanto a ferritina tecidual são elevadas em pacientes com câncer de mama (KNOVICH *et al.*, 2009; WANG *et al.*, 2010; JEZEQUEL *et al.*, 2012).

Em 2010, Li e colaboradores reportaram que o receptor de transferrina 1 (TfR1), um receptor de superfície, é um receptor para a ferritina. A ligação com o TfR1 captura a ferritina em endossomos e lisossomos. Além disso, também foi demonstrado que o TfR1 é superexpresso em vários tipos de células cancerosas, e já tem sido usado como um marcador para o diagnóstico de câncer (LIANG *et al.*, 2014). Esta superexpressão permite o grande acúmulo de ferro necessário para o crescimento desenfreado das células cancerosas (FALVO *et al.*, 2013).

Por ser uma proteína natural de nosso organismo e estar presente no interior de nossas células e no nosso sangue, a ferritina apresenta alta biocompatibilidade, segurança e baixa imunogenicidade, uma vez que é composta por elementos não-tóxicos que não irão ativar respostas inflamatórias e imunológicas (ROMAGNANI, 2006). Seu diâmetro de 12 nm de superfície é um tamanho ideal para superar as barreiras fisiológicas do microambiente tumoral e conseguir penetrar no tecido tumoral (CHAUHAN *et al.*, 2012). As nanopartículas constituídas de ferritina humana (HF_n) são, em geral, estáveis e solúveis no sangue, características que as tornam favoráveis para serem utilizadas *in vivo*, especialmente em aplicações em humanos (MAKINO *et al.*, 2011; VALERO *et al.*, 2011; FAN *et al.*, 2012; KANG *et al.*, 2012; LI *et al.*, 2012; VANNUCCI *et al.*, 2012).

Vários estudos demonstraram com sucesso que a ferritina é eficaz no carreamento de vários tipos de fármaco, agentes de contraste e metais em seu interior, sugerindo que a HF_n seja um carreador universal de entrega seletiva para as células tumorais (CRICH *et al.*, 2006; UCHIDA *et al.*, 2009; LIN *et al.*, 2011; ZHEN *et al.*, 2013; LIANG *et al.*, 2014).

A arquitetura da HF_n pode ser quebrada em pH ácido e restaurada quase que completamente quando volta ao pH ideal de 7,4 (LIN *et al.*, 2011). A sua cavidade interior é um ótimo modelo para a síntese de nanopartículas cristalinas e monodispersas (MELDRUM *et al.*, 1992; WONG & MANN, 1996; KLEM *et al.*, 2008). Apresenta baixo custo de produção e

purificação por ser facilmente produzida e também de fácil reprodutibilidade, características almejadas para a produção em larga escala (UCHIDA *et al.*, 2006; FAN *et al.*, 2012; LIANG *et al.*, 2014).

Atualmente os estudos para o diagnóstico e para a terapia utilizando a ferritina, baseiam-se essencialmente na modificação da superfície da ferritina com o objetivo de reconhecer e se ligar especificamente ao alvo desejado (LIN *et al.*, 2011; LI *et al.*, 2012; FALVO *et al.*, 2013; ZHEN *et al.*, 2013a; ZHEN *et al.*, 2013b). Apesar dessas modificações aumentarem a especificidade, já foi evidenciado que a nanopartícula de ferritina possui propriedades intrínsecas de ser seletivamente direcionada a células tumorais (LIANG *et al.*, 2014). Fan e colaboradores (2012) utilizaram ferro encapsulado por nanopartícula de ferritina e demonstraram que essa NP tem especificidade para diversos tipos de células tumorais que expressam o Tfr1, incluindo o adenocarcinoma mamário, sem a adição de nenhum tipo de ligante em sua superfície. Além disso, essas modificações na superfície prejudicam as vantagens do uso da ferritina, como o direcionamento natural e específico para as células tumorais, a sua biocompatibilidade, o baixo custo de produção, sua alta pureza, baixa imunogenicidade e também já foi relatado que interfere no processo de auto-organização durante sua síntese, resultando em menor rendimento e baixa homogeneidade. Isso tudo dificulta sua entrada em fases de teste clínico (TANEICHI *et al.*, 2006; DEHAL *et al.*, 2010; LI *et al.*, 2012; JEON *et al.*, 2013; LIANG *et al.*, 2014).

1.9. TUMOR DE EHRLICH

O estudo da eficácia de novos tratamentos do câncer de mama, como os baseados na nanotecnologia, requer o uso de um modelo experimental apropriado. O tumor de Ehrlich é um adenocarcinoma mamário murino agressivo e espontâneo que possui uma característica interessante, pois quando inoculado intraperitonealmente, se desenvolve na forma ascítica (JAGANATHAN *et al.*, 2010) e, quando implantado pela via subcutânea, na forma sólida. Esse tumor se assemelha aos tumores humanos por apresentar características como a rápida proliferação, células indiferenciadas, malignidade e o ciclo de vida curto (PATT & STRAUBE, 1956). Além de ser de fácil transplantação, representa uma ferramenta eficiente para investigar fármacos anticancerígenos (AWARA *et al.*, 2004; ELMORSI *et al.*, 2013; KABEL *et al.*, 2015), inclusive novas formulações nanoestruturadas (MIRANDA-VILELA, 2013; ROMERO, 2015).

1.10. TOXICIDADE

Apesar de toda expectativa e interesse no desenvolvimento e na utilização de nanomateriais, existe um problema na perspectiva toxicológica: a exposição a longo prazo e o impacto na saúde humana ainda são pouco estudados e compreendidos (OBERDÖRSTER *et al.*, 2005; GWINN & VALLYATHAN, 2006; DUSINSKA *et al.*, 2011; HUBBS *et al.*, 2013). São as propriedades físico-químicas especiais que influenciam na forma de interação dessas nanopartículas com as células e, portanto, também na sua toxicidade. Por isso, é de essencial importância conhecer essas propriedades para desenvolver nanopartículas mais seguras (HUANG *et al.*, 2017).

O potencial tóxico das nanopartículas depende de características como tamanho, formato, carga da superfície, cobertura da superfície, solubilidade e aglomeração (MAGDOLENOVA *et al.*, 2014). A falta de informação sobre a toxicidade e a dúvida sobre a segurança no uso das nanopartículas são os principais obstáculos para a inovação e investimento na área de nanotecnologia (CARNEIRO *et al.*, 2013; MICHAEL, 2013; MIRANDA-VILELA *et al.*, 2014).

Os estudos sobre a toxicidade genética têm crescido, o que possibilitou o aumento do número de métodos tanto *in vitro* quanto *in vivo* para analisar os efeitos de agentes químicos nos mecanismos genéticos e os possíveis riscos ocasionados no organismo (KRISHNA & HAYASHI, 2000). Entre estes, dois testes comumente utilizados são o de micronúcleo e o do cometa.

1.10.1. Teste de Micronúcleo

Aberrações cromossômicas e mutações gênicas são aspectos principais da genotoxicidade induzida por produtos químicos (KASAMOTO *et al.*, 2013). Para detectar *in vivo* os danos induzidos em cromossomos ou no mecanismo mitótico de eritroblastos, é frequentemente utilizado o teste de micronúcleo em células da medula óssea ou células do sangue periférico de animais (OECD, 2016; BHAGAT, 2017).

O micronúcleo foi observado pela primeira vez em sangue de ratos e gatos por Howell e Jolly no final do século 19 (HAYASHI, 2016). Mas só foi em 1970 que Heddle e Schmid desenvolveram o teste de micronúcleo usando células eritropoiéticas da medula óssea e do sangue de hamsters. Eles observaram uma correlação entre a indução de aberração cromossômica e a indução de micronúcleo (KRISHNA & HAYASHI, 2000; HAYASHI, 2016).

Existem dois mecanismos conhecidos para a formação dos micronúcleos: clastogênese, ou quebra do cromossomo, e aneugênese, ou distúrbio no fuso mitótico (Figura 3) (BONASSI *et al.*, 2007; SAMANTA & DEY, 2012).

Com esses dois mecanismos, três formas diferentes de micronúcleos podem acontecer: fragmentos cromossômicos acêntricos, fragmentos acêntricos da cromátide ou a perda de um

cromossomo inteiro que não foi incluído no núcleo da célula filha por não ter se ligado corretamente ao fuso mitótico na anáfase. Eventualmente os fragmentos de cromossomo ou cromossomo deslocado são envolvidos por uma membrana, levando a uma estrutura morfológicamente semelhante ao núcleo, exceto pelo tamanho reduzido (FENECH *et al.*, 2011).

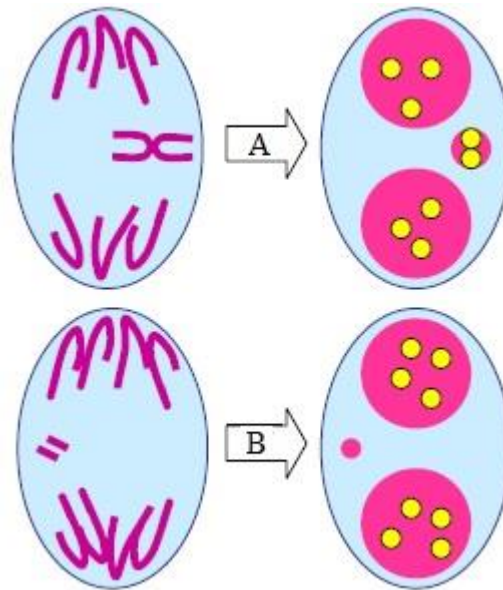


Figura 3 - Esquema dos mecanismos de formação de micronúcleo. (A) Micronúcleo formado pela perda de um cromossomo inteiro quando exposto a um agente aneugênico. (B) Micronúcleo formado pela perda de um fragmento do cromossomo quando exposto a um agente clastogênico (Adaptado de FENECH, 2011).

Em roedores adultos, o micronúcleo é formado no baço ou na medula óssea durante a eritropoiese. Os eritrócitos policromáticos (EPC), células basófilas que apresentam RNA no citoplasma, são formados quando os eritroblastos eliminam o núcleo 6 horas após a mitose. Quando as EPC passam pelo processo de maturação, os eritrócitos normocromáticos (ENC), células acidófilas, são formados (KRISHNA & HAYASHI, 2000). Uma grande frequência de micronúcleos em EPC indica dano no cromossomo (ESTEVANATO *et al.*, 2012a; MIRANDA-VILELA *et al.*, 2014; ARALDI *et al.*, 2015).

Apesar de todas as vantagens que o teste de micronúcleo oferece, esse teste possui limitações, como qualquer outro teste de genotoxicidade. Por isso a associação desse a outro teste de toxicidade, como o do Cometa, permite resultados mais relevantes (ARALDI *et al.*, 2015; HAYASHI, 2016; BHAGAT, 2017).

1.10.2. Teste Cometa

O teste cometa, também conhecido como “*single cell gel assay eletrophoresis*” (SCGE), é um método rápido, sensível e barato para mensurar o dano no DNA em células eucarióticas (LOVELL & OMORI, 2008; KOPPEN *et al.*, 2017). Esse teste foi desenvolvido por Östling e Johanson (1984) para detectar danos no DNA causados por radiação, e tem sofrido diversas modificações desde então. Foi nomeado teste cometa devido às imagens do experimento serem semelhantes à de um cometa (Figura 4); observou-se que a quantidade de DNA desprendido da cabeça do cometa (o nucleóide) estava correlacionada com a intensidade da radiação (ÖSTLING e JOHANSON, 1984). Singh e colaboradores (1988) desenvolveram o método alcalino (pH alcalino do tampão de eletroforese), que facilita a desnaturação e desenovelamento do DNA, e se tornou o método mais usado e recomendado por apresentar um grande espectro para detecção de danos (ARALDI *et al.*, 2015).

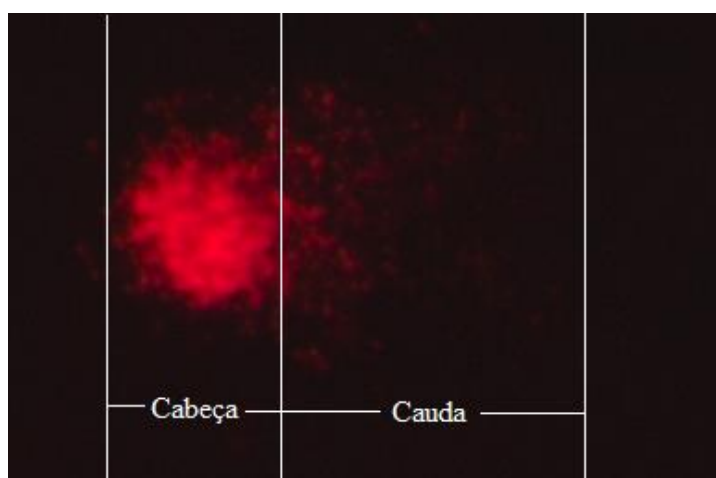


Figura 4 - Microfotografia de fluorescência do nucleóide no teste cometa. O DNA presente na cabeça do cometa está enovelado, enquanto que o DNA presente na cauda está fragmentado.

A formação característica do cometa se baseia na habilidade do DNA de migrar, no gel de eletroforese, em função do tamanho e do número de fragmentos ou quebras do DNA; assim, DNA com poucas quebras migram curtas distâncias a partir da cabeça do cometa, enquanto fragmentos pequenos formam a cauda do cometa. Esta, aumenta conforme a intensidade do dano (FAIRBAIRN *et al.*, 1995).

Uma vantagem desse teste é que pode ser realizado em qualquer tipo de população de células eucarióticas *in vivo*, *in vitro* e *ex vivo* (NAVARRETE *et al.*, 1997). Estudos utilizando o teste de micronúcleo e o teste cometa para avaliar o dano no DNA causado pela exposição a nanopartículas já foram relatados (BALASUBRAMANYAM, A. *et al.*, 2009; NAYA *et al.*, 2012; SONG *et al.*, 2012; MIRANDA-VILELA *et al.*, 2014; DUMALA *et al.*, 2017).

JUSTIFICATIVA

2. JUSTIFICATIVA

A elevada taxa de mortalidade por câncer de mama expõe a incessante necessidade de desenvolver terapias mais eficazes que apresentem baixa toxicidade às células normais e que acarretem o mínimo de efeitos adversos.

Nesse âmbito, a nanobiotecnologia vem fornecendo novas formas de terapia, entre as quais se encontra a magnetohipertermia que demanda o uso de nanopartículas magnéticas. Uma nova amostra de fluido magnético contendo nanopartículas magnéticas à base de magnetita recobertas com ferritina (NPM-HFn) reúne características interessantes do ponto de vista de aplicação biomédica. Células tumorais tendem a apresentar uma superexpressão de TFR1, receptor da ferritina, o que permitiria o direcionamento das nanopartículas para o tecido tumoral. A avaliação da capacidade terapêutica de NPM-HFn em tumor experimental de mama deve ser complementada com o imprescindível conhecimento da ação biológica (toxicidade e biodistribuição) desse novo material nanoestruturado. Em conjunto, os dados apresentados justificam a presente proposta.

OBJETIVOS

3. OBJETIVO GERAL

Avaliar a toxicidade e a biodistribuição de nanopartículas magnéticas à base de magnetita recobertas com ferritina (NPM-HFn) e investigar sua eficácia no tratamento de câncer de mama experimental.

3.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

3.1.1. Avaliar o potencial de aquecimento da NPM-HFn.

3.1.2. Avaliar clinicamente camundongos submetidos a injeções da NPM-HFn.

3.1.3. Analisar as alterações hematológicas e bioquímicas induzidas pela NPM-HFn.

3.1.4. Avaliar a citotoxicidade e a genotoxicidade da NPM-HFn em camundongos saudáveis.

3.1.5. Analisar a toxicidade por meio da histologia dos órgãos baço, cérebro, fígado, pulmão e rins.

3.1.6. Analisar a biodistribuição da NPM-HFn nos animais por meio de análises histológicas e espectroscópicas (ICP-OES).

3.1.7. Avaliar a regressão tumoral e a eficácia do tratamento com magnetohipertermia mediada por NPM-HFn, por meio de avaliações clínicas e histopatológicas.

MATERIAL E METODOLOGIA

4. MATERIAL E METODOLOGIA

4.1. SÍNTESE DO FLUIDO MAGNÉTICO (FM) - NPM-HFn

O fluido magnético NPM-HFn usado neste trabalho foi constituído por nanopartículas magnéticas de magnetita funcionalizadas com ferritina humana (HFn), como mostrado na figura 5. Essa amostra foi sintetizada e fornecida pelo grupo do Dr. Claudio Sangregorio, ICCOM - CNR, Universidade de Florença, Itália.

Primeiramente foi sintetizado o fluído magnético de magnetita (NPM) pela rota de decomposição térmica do ferro acetilacetonato ($\text{Fe}(\text{acac})_3$) descrita por Sun e Zeng (2004), modificando a composição da mistura de reação e a curva de aquecimento. Em seguida, foi feita a ligação com um ligante que permite a dispersão em água e expõe o grupo funcional que permite a ligação com a ferritina em sua superfície. Para isso, foi escolhido o ligante Ácido-3-aminopropilfosfonico (APPA), pois ele possui alta afinidade pelo óxido de ferro e proporciona uma ligação covalente estável na superfície da NPM.

Para a junção da ferritina à NPM coberta pelo APPA (NPM-APPA) foi utilizado o polietileno glicol (PEG) que se liga covalentemente de um lado ao grupo amino presente no NPM-APPA e do outro, ao grupo tiol (-SH) presente na superfície da HFn.

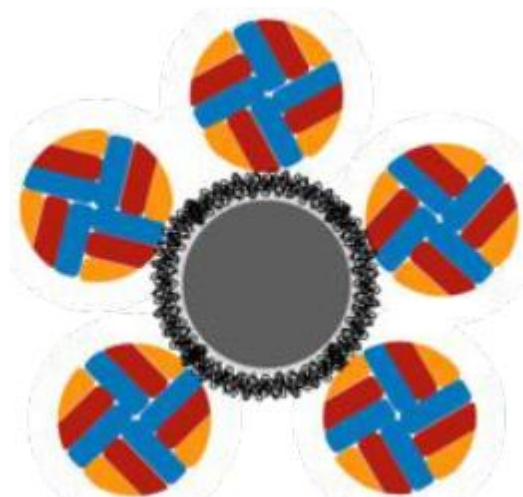


Figura 5 - Figura ilustrativa da NPM-HFn. O centro representa a nanopartícula de magnetita (NPM), a camada a seguir representa o ligante Ácido-3-aminopropilfosfonico (APPA), e os círculos externos representam a ferritina (HFn) (Fonte: GUERRINI, 2017).

Para confirmar a junção da ferritina com a NPM (NPM-HFn) foi realizada eletroforese em gel de agarose.

4.2. CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA NPM-HFn

4.2.1. CARACTERIZAÇÃO FÍSICA E MAGNÉTICA DA AMOSTRA

Para determinar o diâmetro físico e a morfologia das nanopartículas foram realizadas Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) e Espalhamento de luz dinâmico (DLS). Foi utilizada difração de raio X para confirmar se as nanopartículas sintetizadas possuíam a estrutura cristalina da magnetita. A carga de superfície foi avaliada utilizando o potencial zeta. Esses métodos de caracterização da amostra foram realizados pelo grupo do Dr. Claudio Sangregorio.

4.2.2. TERMOMETRIA IN VITRO

A capacidade de aquecimento da NPM-HFn a 10 mg/mL em cinco diferentes volumes (500 μ L, 100 μ L, 80 μ L, 60 μ L e 40 μ L) foi investigada por meio da exposição, *in vitro*, ao campo magnético gerado pelo equipamento Magnetherm (Nanotherics) operando com capacitor B22 e bobina de 17 voltas, frequência 332,3 kHz, 228 V e campo magnético de 342,75 G. Para acompanhar as curvas de aquecimento foi utilizado um termômetro digital MINIPA® 2 canais.

4.3. ANÁLISE DA TOXICIDADE E DA BIODISTRIBUIÇÃO DA NPM-HFn

4.3.1. GRUPOS EXPERIMENTAIS

Neste trabalho foram utilizados camundongos fêmeas da linhagem Swiss (*Mus musculus*) com 5 meses de idade e peso inicial de $42,03 \pm 2,39$ g, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Goiás (UFG). Os animais foram mantidos na sala de Manutenção de Animais do Laboratório NanoGEM, GEM, IB, UnB, durante todo o período experimental, sob condições controladas com ciclo circadiano automatizado (12/12 horas claro/escuro) e temperatura controlada de 22 ± 2 °C, recebendo água e ração comercial balanceada *ad libitum*. Durante os procedimentos experimentais, cada animal foi anestesiado com solução de ketamina (80 mg/Kg) e xilazina (10 mg/Kg) por via intraperitoneal, no quadrante lateral inferior esquerdo de acordo com o peso de cada animal na concentração de 4 mL/Kg do animal. A profundidade anestésica foi verificada por meio da ausência da retração da pata em resposta ao pinçamento. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética de Pesquisa em Animais (CEUA) do IB, UnB, UnBDoc n°: 29574/2016 (Anexo 1).

4.3.2. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Com o objetivo de avaliar a toxicidade e a genotoxicidade da NPM-HFn *in vivo*, foram utilizados 30 camundongos fêmeas, divididos aleatoriamente em 5 grupos (n = 6). A administração da NPM-HFn foi realizada por via intraperitoneal (Figura 6) durante 8 dias consecutivos. A dose administrada foi diferente em cada grupo, como descrito a seguir:

- grupo controle negativo (CN): foram administrados no peritônio soro fisiológico 0,9%;
- grupo controle positivo (CP): foram administrados no peritônio 40 mg/Kg de MetilMetanoSulfonato (MMS);
- grupo com a menor concentração da NPM-HFn (C1): foram administrados no peritônio 6,25 mg/Kg da NPM-HFn;
- grupo com NPM-HFn (C2): foram administrados no peritônio 12,5 mg/Kg da NPM-HFn;
- grupo com a maior concentração da NPM-HFn (C3): foram administrados no peritônio 25 mg/Kg da NPM-HFn.

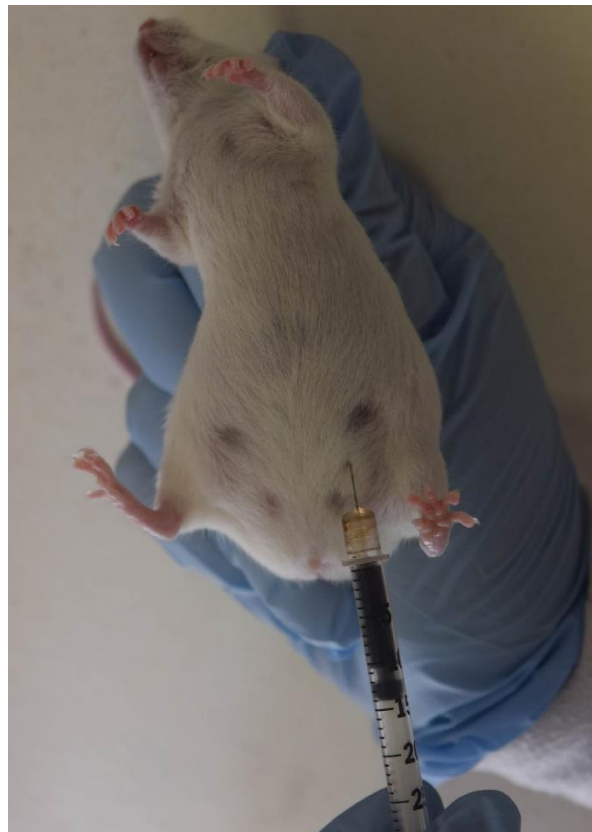


Figura 6 - Administração da NPM-HFn por via intraperitoneal.

Foi escolhido o MMS para ser administrado no grupo positivo por ser um agente mutagênico comumente utilizado e descrito pela Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD) como uma substância controle positiva tanto para o teste cometa quanto para o teste de micronúcleo (OECD, 2016). O grupo CP recebeu uma única dose do MMS no 8º dia de tratamento.

Após 24 horas da última administração da NPM-HFn os animais foram anestesiados e, então, foi realizada a coleta do sangue por punção cardíaca, seguida pela eutanásia dos animais, onde foram coletados os órgãos (baço, fígado, pulmão, cérebro, rins e mama) e células da medula de todos os animais (Figura 7).

Com o intuito de avaliar as alterações nos órgãos (baço, fígado, cérebro, pulmão e rim), foram obtidos os pesos absoluto e relativo desses órgãos. O peso relativo foi determinado a partir do peso absoluto obtido na balança e dividido pelo corporal do animal, usando a fórmula abaixo:

$$\text{Peso relativo} = \frac{\text{Peso bruto do órgão}}{\text{Peso corporal do animal}} \times 100$$

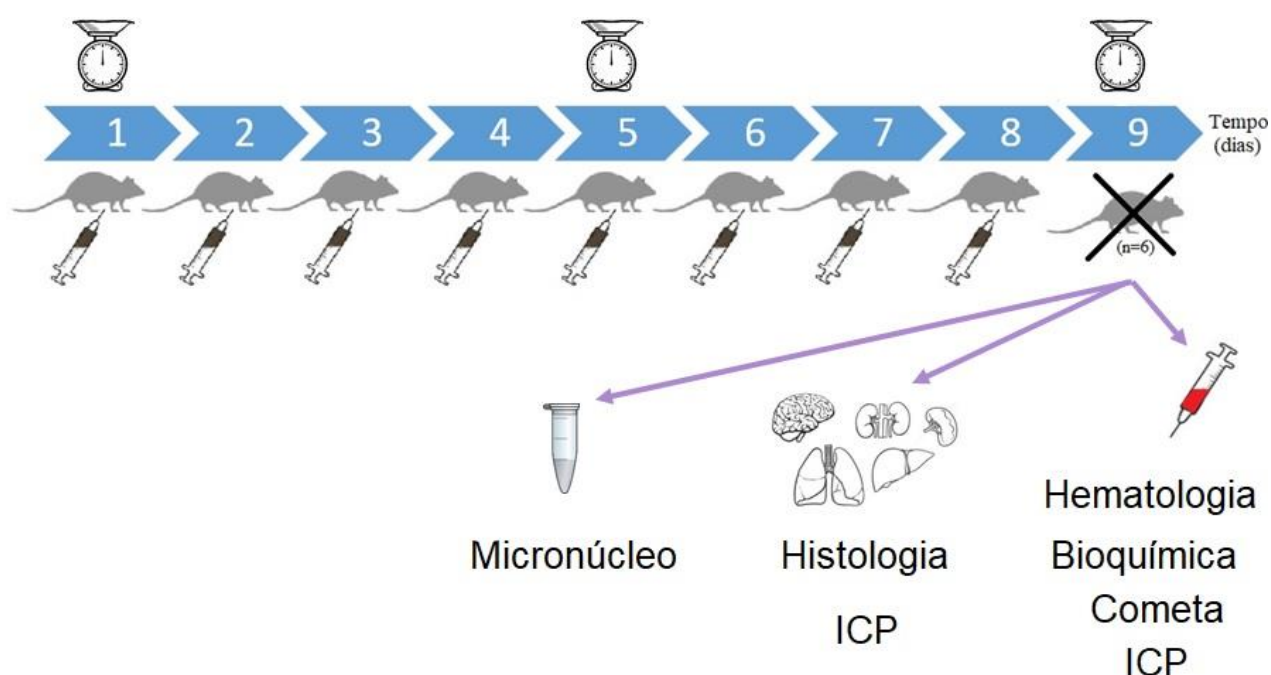


Figura 7 - Delineamento experimental dos grupos C1, C2 e C3. Onde foram administrados a amostra NPM-HFn por via intraperitoneal durante 8 dias consecutivos e 24h após a última administração foi feita a eutanásia, coleta do sangue, dos órgãos e das células da medula dos animais (Adaptado de GUERRINI, 2017).

4.3.3. ANÁLISES CLÍNICAS

Foram feitas observações do comportamento, peso e consumo de ração ao longo do período de experimentação. O consumo de ração foi avaliado nos dias 1, 5 e 9; o peso corporal dos animais foi determinado durante os 9 dias experimentais. Além disso, os animais foram monitorados quanto a sinais de toxicidade, como perda de peso, diminuição do consumo de ração, diarreia, úlcera cutânea e mortes.

4.3.4. ANÁLISES HEMATOLÓGICA E BIOQUÍMICA

Com o objetivo de verificar qualquer alteração hematológica ou bioquímica devido à administração da NPM-HFn, amostras de sangue foram coletadas, no dia da eutanásia, por meio da punção cardíaca extracorpórea, segundo o Guia para o Cuidado e Uso de Animais de Laboratório (NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 2010). Os animais foram anestesiados e dispostos em decúbito dorsal, e após a assepsia do local com álcool 70% foi realizada a punção. Foi coletado cerca de 1 mL de sangue, dos quais 100 µL foram colocados em um tubo Minicollect (Greiner Bio-One, AUT) com anticoagulante Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético (EDTA) para a realização da análise hematológica, cerca de 50 µL coletados em tubo Eppendorff para fazer o teste cometa, cerca de 200 µL para fazer a análise no ICP-OES (espectroscopia de emissão óptica com plasma) e o restante em outro tubo Minicollect com gel separador com ativador de coágulo para serem feitas análises bioquímicas.

O sangue coletado para a análise hematológica foi rapidamente colocado no porta-tubo do analisador hematológico de uso veterinário Sysmex pocH-100iV Diff™ (Sysmex, JAP). Os parâmetros que foram analisados são: número total de células brancas (WBC), número total de células vermelhas (RBC), hematócrito (HCT), hemoglobina (HGB), volume corpuscular médio (MCV), hemoglobina corpuscular média (MCH), concentração de hemoglobina corpuscular média (MCHC), porcentagem de linfócitos (% linfócitos), porcentagem de neutrófilos e monócitos (% neutrófilos+monócitos), porcentagem de eosinófilos (% eosinófilos) e plaquetas (PLT).

Já o sangue coletado para a análise bioquímica foi centrifugado a 5000 rpm durante 5 minutos para a separação do soro e armazenado a -20°C até o dia da análise. Após a calibração do equipamento ChemWell-T (LabTest, BRA), as amostras de sangue foram analisadas para quantificar enzimas que predizem a respeito das funções renais e hepáticas, como a Alanina Aminotransferase (ALT), Aspartato Aminotransferase (AST), creatinina, fosfatase alcalina, além da ureia e do ferro.

Visto que para considerar os resultados de exames laboratoriais como anormais, é necessário ter conhecimento da faixa de variação dos valores (valores normais ou de referência) em animais saudáveis (THRALL *et al.*, 2007), para estas análises foram considerados como referência nas comparações, tanto o grupo controle negativo (CN: sem tumor e sem tratamento) quanto os valores de referência para camundongos (EVERDS, 2007; QUIMBY & LUONG, 2007; THRALL *et al.*, 2007; VIANA, 2007).

4.3.5. ANÁLISE DE GENOTOXICIDADE

4.3.5.1. Teste de Micronúcleo

Para a coleta das células da medula óssea, os dois fêmures dos camundongos foram removidos, as epífises cortadas e as células coletadas em um Eppendorf de 2 mL com o auxílio de uma seringa contendo 1 mL de soro fetal bovino. Primeiramente, estas células foram centrifugadas a 1000 rpm por 10 minutos, o excesso do sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuscitado no restante do sobrenadante, sendo uma gota dessa suspensão utilizada para fazer o esfregaço na lâmina. Após as lâminas estarem secas, foram fixadas em álcool metílico durante 7 minutos e coradas com Giemsa também por 7 minutos.

As células foram avaliadas quanto à presença ou ausência de micronúcleos e quanto à possível citotoxicidade ocasionada pela exposição ao nanomaterial em teste. Para tal propósito os eritrócitos policromáticos (EPC) e normocromáticos (ENC) foram contados e obtida a relação EPC/ENC.

Foi utilizado o microscópio de luz Carl Zeiss Axio Vision 4.8.2 SP 2 com aumento de 1000× para analisar as células. Foram contadas 4000 células por animal, com o auxílio de um contador manual, para avaliar a frequência de micronúcleos, de acordo com a diretriz 474 da OECD (2016). Foi avaliada a citotoxicidade por meio da porcentagem de EPC (%EPC). Ao se atingir a contagem de 2000 células, a quantidade de EPC e ENC eram registradas e a %EPC calculada usando a fórmula abaixo.

$$\%EPC = \frac{EPC}{EPC+ENC} \times 100$$

4.3.5.2. Teste Cometa

Como mencionado anteriormente, as células sanguíneas também foram coletadas para o teste cometa. Primeiramente, as lâminas foram imersas em agarose a 1,5%. O sangue foi misturado com 100 µL de SFB e centrifugado a 5000 rpm durante 5 minutos e após a centrifugação, 80 µL do sobrenadante foram retirados e o restante foi ressuspendido. Em seguida, 20 µL dessa amostra ressuspendida foram misturados e homogeneizados com 120 µL de agarose com baixo ponto de fusão 0,5% a 37 °C. Então, 60 µL desse sangue em agarose foram colocados nas lâminas previamente preparadas com agarose e recobertos com uma lamínula para distribuir o material. As lâminas permaneceram na geladeira por 10 minutos para uma total solidificação da solução. A lamínula foi, então, retirada e as células foram lisadas por uma solução de lise (NaCl 2,5 M, EDTA 100 mM, Tris 10 mM, N-lauroyl sarcosine 1%, pH 10, Triton X-100 1% e DMSO 10%) durante 1 hora à temperatura ambiente.

Para a preparação do controle positivo, as lâminas foram imersas em uma solução de água oxigenada e PBS (20 µL de H₂O₂ e 15 mL de PBS) durante 8 minutos. Passado esse período, as lâminas foram lavadas com PBS gelado.

Posteriormente, as lâminas foram colocadas em uma cuba de eletroforese contendo solução tampão alcalina (NaOH 300 mM e EDTA 1 mM, pH > 13), que permite o desenrolamento do DNA, durante 20 minutos a 4°C. Em seguida foi realizada a eletroforese a 0,8 mV/cm, também por 20 minutos. Após a corrida, as lâminas foram colocadas em solução de neutralização durante 5 minutos; em seguida, foi retirada a solução, as lâminas descansaram por mais 5 minutos e esse procedimento foi repetido 3 vezes. Só então as lâminas foram fixadas em álcool etílico 100% durante 7 minutos. Para a coloração foi utilizado o brometo de etídio a 20 µg/mL, um corante intercalante com o DNA.

As lâminas foram analisadas de acordo com a diretriz 489 da OECD (2016), usando o microscópio de fluorescência Zeiss Axioskop 2 e fotos foram tiradas com a câmera Zeiss AxioCam MRc com o software Zen Lite 2012. Para a análise da porcentagem de fragmentação do DNA foram tiradas 100 fotos aleatórias das células de cada animal e para isto foi utilizado o software CometScore versão 2.0.0.38.

4.3.6. ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA

Após a coleta do sangue, os animais foram eutanasiados e os seguintes órgãos foram coletados: fígado, baço, rins, mama, pulmão e cérebro. A coleta foi realizada cuidadosamente e após a retirada dos órgãos, estes foram lavados em solução salina 0,9% para eliminar o excesso de sangue e de resíduos e foram rapidamente fixados. Os fragmentos do baço, fígado e cérebro foram fixados em solução de Davidson (9 partes da solução de estoque – 400 mL de formaldeído a 37%, 200 mL de glicerina, 600 mL de etanol 95% e 600 mL de água destilada – e uma parte de ácido acético

glacial (SHAW & BATTLE, 1957)) durante 24h à temperatura de 4°C, enquanto os demais tecidos foram fixados em solução formaldeído a 4% tamponado (pH 7,0) durante 24h à temperatura ambiente (MONGE-FUENTES, 2009). Após a fixação, os órgãos foram desidratados utilizando concentrações crescentes de álcool etílico (70% a 100%), em seguida diafanizados em solução álcool absoluto e xilol 1:1 e depois em xilol puro durante 45 minutos sob agitação em cada solução. Em seguida, foram incluídos em parafina por meio de três banhos por 1 hora cada em estufa a 60 °C. Após este processo, os órgãos foram emblocados individualmente em parafina.

Em sequência, os tecidos foram seccionados com espessura de 5 µm utilizando o micrótomo Leica modelo RM2125RT (Leica, ALE). Foram realizados três cortes consecutivos, onde foram preparadas três lâminas para cada órgão, onde uma lâmina foi corada com Hematoxilina e Eosina (H&E), outra com Perls e a última lâmina mantida como reserva.

Para a coloração com H&E, os cortes foram colocados em estufa para retirada do excesso de parafina e melhor fixação do corte na lâmina, depois foram desparafinizados com três banhos em xilol por 3 minuto em cada banho, hidratados em concentrações decrescentes em álcool etílico (100%, 90%, 80% e 70%) durante 1 minuto em cada, em seguida foram coradas, primeiramente, na hematoxilina e lavadas em água corrente e, posteriormente, coradas em eosina, para, então, serem novamente desidratados em álcool e xilol. Após o último banho no xilol, foi feita a montagem das lâminas utilizando verniz incolor (Acrilex, BRA) e lamínula, e secagem à temperatura ambiente.

Todas as lâminas foram analisadas utilizando-se o microscópio de luz Olympus BX41 e fotografadas digitalmente com a câmera Opticam para avaliar quaisquer possíveis alterações morfológicas de acordo com as peculiaridades de cada órgão. Cada alteração foi graduada em: ausente (-) discreta (+), moderada (++) e intensa (+++).

4.3.7. ANÁLISE DA BIODISTRIBUIÇÃO

4.3.7.1. Coloração de Perls

Para avaliar a biodistribuição da NPM-HFn foi realizada a coloração das lâminas histológicas por Perls, onde o ferro é marcado em azul por meio da interação dos íons do ferrocianeto de potássio presentes no corante com os íons férricos presentes nas células.

Para a coloração de Perls as lâminas passaram por um processamento descrito na Tabela 1. As lâminas foram montadas da mesma forma como descrito anteriormente.

As lâminas foram analisadas utilizando o microscópio de luz Carl Zeiss Axio Vision 4.8.2 SP 2 e fotografadas. Os órgãos foram avaliados de acordo com a ausência (-) e presença discreta (+), moderada (++) e intensa (+++) quantidade de ferro. Estes dados foram usados para a análise estatística.

Tabela 1 – Protocolo para coloração com Perls.

Processo	Tempo
Xilol 1	5 minutos
Xilol 2	3 minutos
Xilol 3	1 minutos
Álcool 100% 1	1 minutos
Álcool 100% 2	1 minutos
Álcool 90%	1 minutos
Álcool 80%	1 minutos
Álcool 70%	1 minutos
Água Destilada	1 minutos
Ferro Cianeto 2%	5 minutos
Ferro Cianeto 2% + HCL 1% (1:1)	15 minutos
Água Destilada	1 minutos
Vermelho Neutro	5 minutos
Água Destilada	3 minutos
Álcool 70%	1 minutos
Álcool 80%	1 minutos
Álcool 90%	1 minutos
Álcool 100% 1	2 minutos
Álcool 100% 2	2 minutos
Xilol 1	1 minutos
Xilol 2	1 minutos
Xilol 3	1 minutos

4.3.7.2. Espectrometria de Emissão Óptica com Plasma (ICP-OES)

Para determinar a concentração de ferro em cada órgão foi realizada análise por Espectrometria de Emissão Óptica com Plasma (ICP-OES), utilizando o equipamento PerkinElmer® Optima™ 8000 (PerkinElmer, EUA).

No dia da eutanásia, os órgãos foram coletados, retirado todo sangue residual, pesados e divididos ao meio com o auxílio de um bisturi, onde o fragmento direito e rim direito foram usados para a histologia e o fragmento esquerdo e rim esquerdo foram pesados e colocados em um tubo Eppendorf e congelados para posterior análise no ICP-OES.

Após o congelamento, os órgãos foram secos utilizando o equipamento Eppendorf Vacuum Concentrator Plus (Eppendorf, Reino Unido) até total secagem. Em seguida os órgãos foram digeridos utilizando 1 mL de Ácido Nítrico 65% durante 24 horas em temperatura ambiente, até a total digestão. Foram, então, colocados 150 µL da amostra do órgão digerido em um tubo Falcon com 9,85 mL de água ultrapura. A amostra final foi analisada pelo prof. Dr. Marcelo Henrique Sousa para determinação da concentração de ferro no Laboratório Nanotecnologia Verde, Faculdade de Ceilândia, Universidade de Brasília, conforme descrito em SOUSA *et al.*, 2011.

4.4. EFICÁCIA DA NPM-HFn PARA O TRATAMENTO DE ADENOCARCINOMA MAMÁRIO DE EHRLICH

4.4.1. GRUPOS EXPERIMENTAIS

Nesta parte do trabalho foram utilizados camundongos fêmeas da linhagem Swiss (*Mus musculus*) com 3 meses de idade e pesando 40 ± 5 g, também provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Goiás (UFG). Os animais foram mantidos na sala de Manutenção de Animais do Laboratório NanoGEM, GEM, IB, UnB, conforme mencionado no item 4.3.

Para avaliar o potencial terapêutico da NPM-HFn, foram utilizados 48 camundongos Swiss fêmeas (Figura 8). Os animais foram aleatoriamente divididos em 8 grupos (n=6):

- controle saudável (**Ctrl**): camundongos sem tumor que receberam administração endovenosa de soro fisiológico 0,9%;
- grupo com a NPM-HFn endovenosa (**NP(EV)**): camundongos sem tumor que receberam a administração endovenosa da NPM-HFn;
- grupo controle tumor (**T-Ctrl**): camundongos com tumor que receberam a administração intratumoral de soro fisiológico 0,9%;

- grupo com tumor e NPM-HFn intratumoral (**T-NP(IT)**): camundongos com tumor que receberam a administração intratumoral da NPM-HFn;
- grupo com tumor e NPM-HFn endovenoso (**T-NP(EV)**): camundongos com tumor que receberam a administração endovenosa da NPM-HFn;
- grupo com tumor, NPM-HFn endovenoso e exposto ao CMA (**T-NP(EV)AFM**): camundongos com tumor que receberam a administração endovenosa da NPM-HFn e foram expostos ao campo magnético alternado;
- grupo com tumor, NPM-HFn intratumoral e exposto ao CMA (**T-NP(IT)AFM**): camundongos com tumor que receberam a administração intratumoral da NPM-HFn e foram expostos ao campo magnético alternado;
- grupo com tumor e exposto ao CMA (**T-AFM**): camundongos com tumor que receberam a administração intratumoral de soro fisiológico 0,9% e foram expostos ao campo magnético alternado.

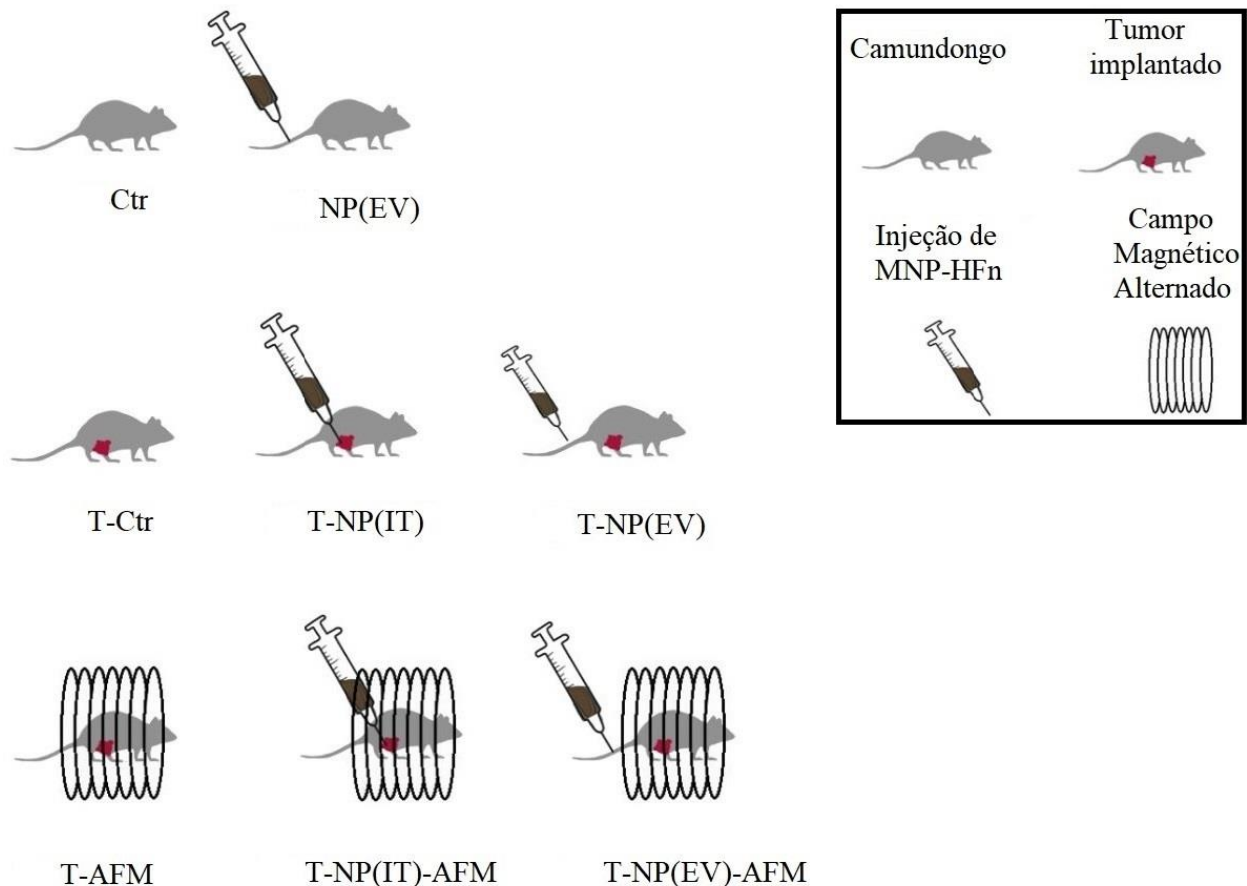


Figura 8 - Esquema mostrando todos os grupos experimentais. Ctr: Camundongos sem tumor que receberam administração endovenosa de soro fisiológico 0,9%; NP(EV): Camundongos sem tumor que receberam a administração endovenosa da NPM-HFn ; T-Ctr: Camundongos com tumor que receberam a administração intratumoral de soro fisiológico 0,9% ; T-NP(IT): Camundongos com tumor que receberam a administração intratumoral da NPM-HFn; T-NP(EV): Camundongos com tumor que receberam a administração endovenosa da NPM-HFn; T-AFM: Camundongos com tumor que receberam a administração intratumoral de soro fisiológico 0,9%

e foram expostos ao campo magnético alternado ; T-NP(IT)-AFM: Camundongos com tumor que receberam a administração intratumoral da NPM-HFn e foram expostos ao campo magnético alternado; T-NP(EV)-AFM: Camundongos com tumor que receberam a administração endovenosa da NPM-HFn e foram expostos ao campo magnético alternado (Adaptado de GUERRINI, 2017).

4.4.2. INDUÇÃO TUMORAL

O tumor ascítico de Ehrlich (TAE) foi mantido por repiques em camundongos Swiss, através da inoculação de 1×10^6 células do TAE congeladas em 100 μ L por via intraperitoneal. Após 8 dias, os inóculos foram obtidos através da punção intraperitoneal do fluido ascítico. A viabilidade celular destes inóculos foi verificada utilizando o Azul de Tripán 0,2% e com o auxílio da Câmara de Neubauer, sendo feita a contagem do número de células por mL. Para isso, as células coletadas do peritônio foram diluídas 1:10 em PBS, e em seguida foi realizada outra diluição 1:100 em PBS. Depois 10 μ L da suspensão 1:100 foram retirados e misturados em 10 μ L do azul de Tripán e 10 μ L dessa solução foram colocados na câmara de Neubauer. As células não coradas (células viáveis) foram contadas nos quatro quadrantes laterais e utilizando a fórmula abaixo a concentração de células foi determinada. A concentração celular dos inóculos foi ajustada com PBS estéril.

$$\frac{\text{Número de células contadas}}{\text{Número de quadrantes}} \times 10^4 \times \text{Fator de diluição} \times 2 = \text{Número de células/mL}$$

Após a obtenção de células do TAE frescas, os animais foram anestesiados, como descrito anteriormente, e realizada a inoculação ortotópica (ROMERO, 2015): o animal foi acomodado em um suporte adequado e, então, foram injetadas 1×10^7 células tumorais no ducto lactífero principal da quinta glândula mamária direita do camundongo, com o auxílio de uma lupa, visando a indução do tumor em sua forma sólida.

4.4.3. TRATAMENTO POR MAGNETOHIPERTERMIA (MHT)

Para o tratamento foi utilizado o equipamento CMagMHG gerador de campo eletromagnético de frequência alternada (Patente: PI 0204433-1, GUEDES *et al.*, 2004) desenvolvido por nosso grupo de pesquisa, que opera a uma radiofrequência de 1 MHz em uma amplitude de 40 Oe e com intensidade de corrente elétrica de 1 A/m.

O tratamento teve início 24 horas após a implantação do tumor, quando o tumor já era palpável, como já padronizado previamente por Romero (2015). Foram realizadas cinco administrações da NPM-HFn, uma a cada 48 horas (totalizando 5 administrações da NPM-HFn) e os animais foram expostos ao campo magnético de frequência alternada (CMA), uma a cada 24 horas, sendo a primeira delas logo após a primeira administração da amostra magnética (Figura 9). Os animais foram expostos durante 30 minutos ao campo magnético. É importante ressaltar que o grupo que recebeu a NPM-HFn por via endovenosa (T-NP(EV)-AFM) foi exposto ao campo após 24h da administração da NPM-HFn. Cada grupo foi subdividido em dois (n=3), sendo os animais de um deles eutanasiados 2 dias após o último tratamento, enquanto no outro grupo a eutanásia ocorreu 28 dias após o último tratamento.

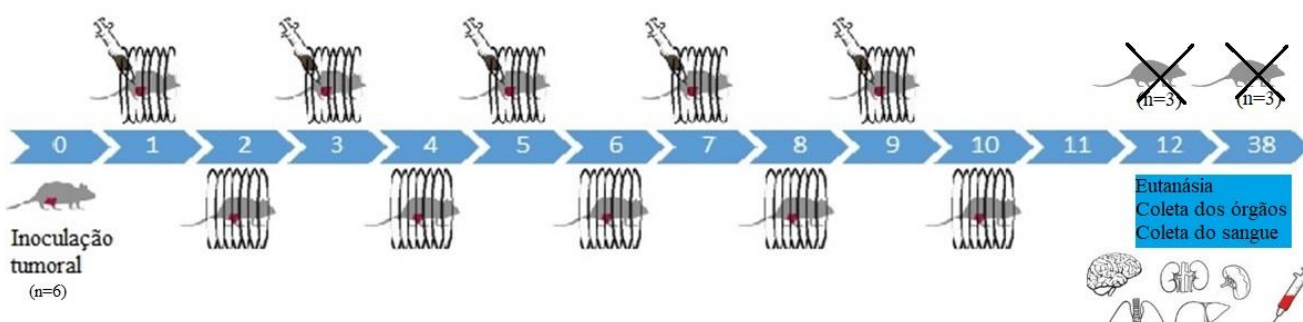


Figura 9 - Delineamento experimental dos grupos T-NP(EV)-AFM e T-NP(IT)-AFM, onde foram administradas 5 doses de NPM-HFn e foram expostos por 10 dias ao campo magnético alternado durante 30 minutos. Ao final do tratamento, os grupos foram separados em dois subgrupos (n=3), um dos subgrupos foi eutanasiado e feita a coleta do sangue e dos órgãos após 2 dias e o outro subgrupo foi eutanasiado 28 dias após o último tratamento (Adaptado de GUERRINI, 2017).

Cada grupo recebeu uma dose diferente da NPM-HFn a 10 mg/mL, e os animais do grupo Ctr receberam soro fisiológico a 0,9% por via endovenosa, enquanto os grupos T-Ctr e T-AFM receberam soro por via intratumoral. Detalhes do protocolo de tratamento estão descritos na Tabela 2.

Tabela 2 – Protocolo utilizado no tratamento; detalhes sobre a administração da NPM-HFn e do soro fisiológico nos animais controle.

Grupo	Dia 1	Dia 3	Dia 5	Dia 7	Dia 9
Ctrl	80 µL	80 µL	80 µL	80 µL	80 µL
NP(EV)	80 µL	80 µL	80 µL	80 µL	80 µL
T-Ctr	100 µL	80 µL	60 µL	80 µL	60 µL
T-NP(IT)	100 µL	80 µL	60 µL	80 µL	60 µL
T-NP(EV)	80 µL	80 µL	80 µL	80 µL	80 µL
T-NP(EV)-AFM	80 µL	80 µL	80 µL	80 µL	80 µL
T-NP(IT)-AFM	100 µL	80 µL	60 µL	80 µL	60 µL
T-AFM	100 µL	80 µL	60 µL	80 µL	60 µL

Testes preliminares determinaram a dose máxima de 80 μ L por via endovenosa sem que houvesse extravasamento da NPM-HFn. A aplicação endovenosa foi realizada sempre na veia caudal lateral como demonstrado na figura 10.

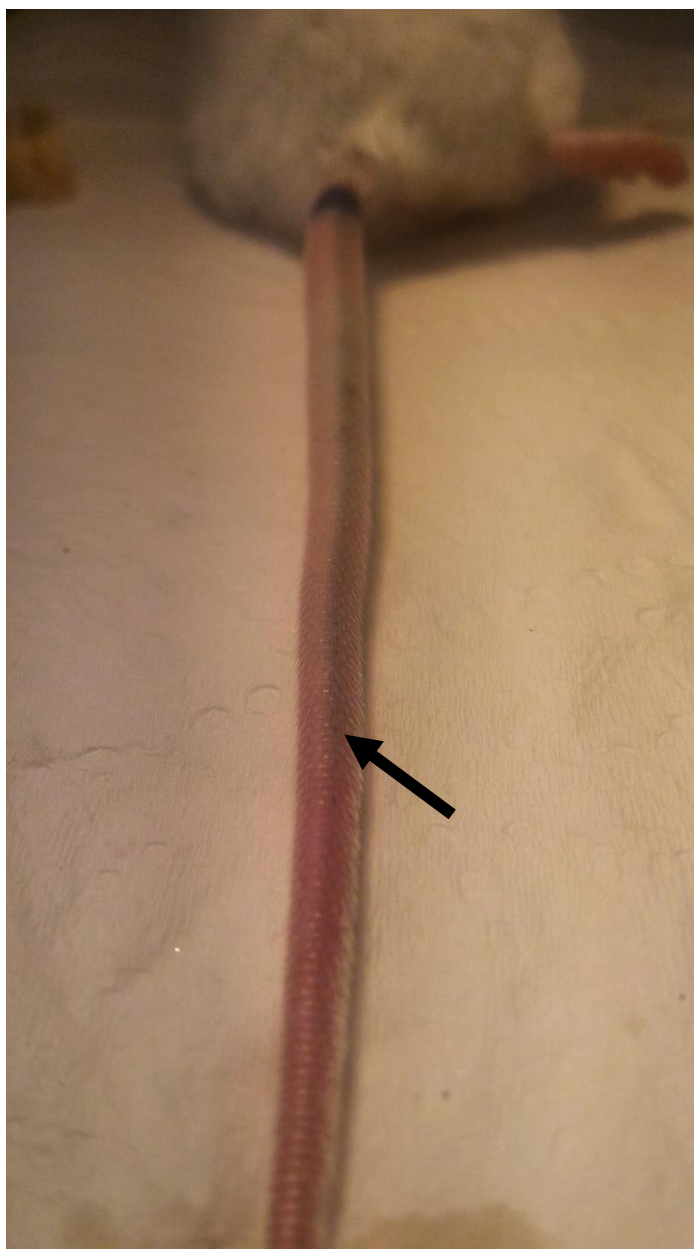


Figura 10 - Foto da cauda do animal logo após a administração endovenosa de 80 μ L da NPM-HFn. Seta mostra o local de administração.

4.4.4. AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO TUMORAL

Com o auxílio de um paquímetro digital milimetrado, o tumor foi mensurado a cada 24 horas antes da administração da amostra NPM-HFn, até o dia da eutanásia. O volume tumoral foi calculado conforme a fórmula abaixo (SCHUH, 2004):

$$\text{Volume} = (\text{Comprimento}) \times (\text{Largura})^2 \times 0,5$$

Após a eutanásia, o tumor, baço, pulmão, rim e fígado coletados foram pesados utilizando uma balança analítica modelo OHAUS[®] 220 e o peso relativo foi calculado usando a fórmula abaixo:

$$\text{Peso relativo} = \frac{\text{Peso bruto do órgão}}{\text{Peso corporal do animal}} \times 100$$

4.4.5. ANÁLISE CLÍNICA

Foram feitas anotações das observações sobre alterações clínicas e comportamentais, e acompanhamento do peso dos animais ao longo do período de até 30 dias após o início dos tratamentos. Os camundongos foram pesados diariamente antes do tratamento utilizando uma balança digital modelo OHAUS[®] 220.

4.4.6. ANÁLISE HEMATOLÓGICA E BIOQUÍMICA

Para verificar se houve toxicidade devido à aplicação da NPM-HFn em animais portadores do adenocarcinoma mamário, análises hematológicas e bioquímica foram realizadas. Os analitos avaliados foram: número total de células brancas (WBC), número total de células vermelhas (RBC), hematócrito (HCT), hemoglobina (HGB), volume globular médio (MCV), hemoglobina globular média (MCH), concentração de hemoglobina corpuscular média (MCHC), porcentagem de linfócitos (% linfócitos), porcentagem de neutrófilos e monócitos (% neutrófilos+monócitos), porcentagem de eosinófilos (% eosinófilos) e plaquetas (PLT), Alanina Aminotransferase (ALT), Aspartato Aminotransferase (AST), creatinina, ferro sérico e ureia.

Os animais foram anestesiados para fazer a coleta do sangue por punção cardíaca e os analitos foram analisados como descrito no item 4.3

4.4.7. ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA

Após a coleta do sangue, os animais foram eutanasiados e foram coletados os seguintes órgãos: fígado, baço, rins, linfonodo subilíaco direito, pulmão, cérebro e tumor. A eutanásia, a coleta dos órgãos, a fixação e o protocolo de processamento e coloração por H&E, assim como a avaliação morfológica dos órgãos coletados seguiram os procedimentos descritos no item 4.3.

Para a análise do tumor (Figura 11) e do linfonodo subilíaco (Figura 12), foi calculada a área do tumor (mm^2) e a área de necrose (mm^2) usando o software ImageJ conforme figuras abaixo.

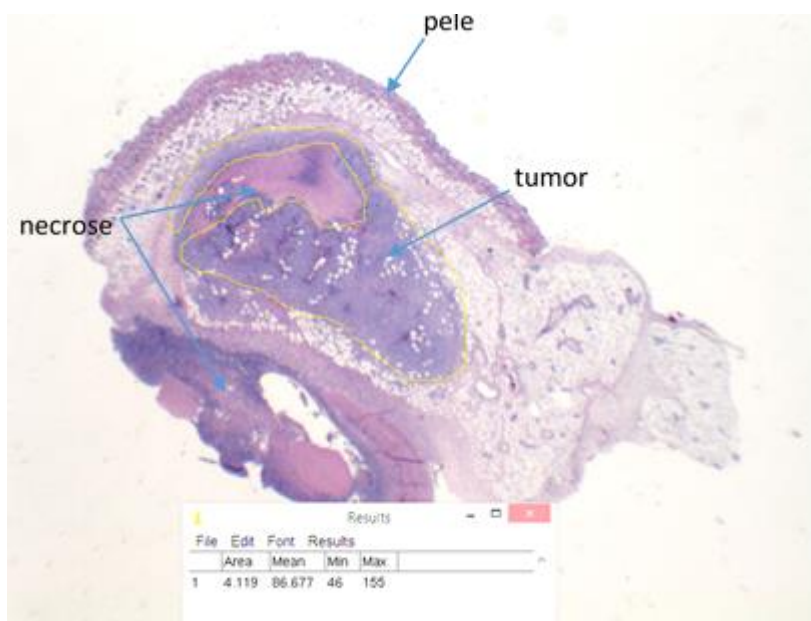


Figura 11 - Área do tumor (mm^2) na parede abdominal demarcada por linha amarela no programa Image J.

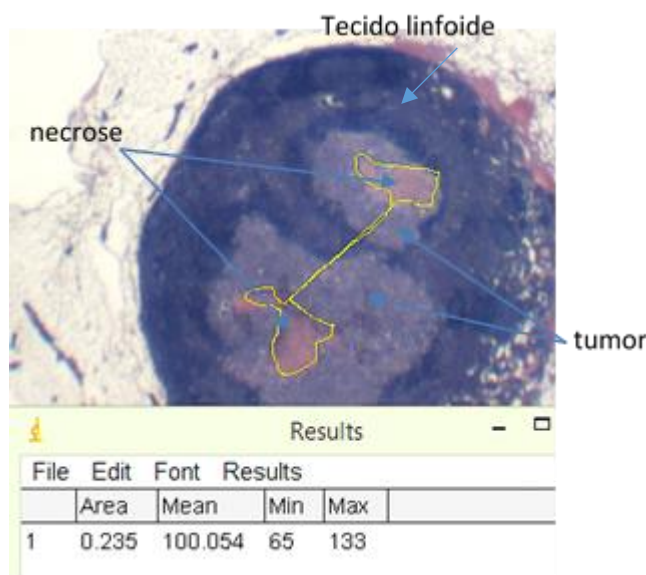


Figura 12 - Área da necrose do tumor (mm^2) no linfonodo demarcada por linha amarela no programa Image J.

4.4.8. ANÁLISE DE BIODISTRIBUIÇÃO

Para avaliar a biodistribuição de NPM-HFn nos animais portadores de tumor ou submetidos a tratamento, foram refeitos os procedimentos de histologia com coloração de Perls descritos no item 4.3.

4.4.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA

As variáveis foram testadas para distribuição normal com o teste de Shapiro-Wilk. Possíveis diferenças entre os grupos analisados foram investigadas pelos testes ANOVA ou Kruskal-Wallis (quando os dados não estavam normalmente distribuídos). Para resultados significativos com ANOVA, o teste de Tukey (post-hoc) foi escolhido para realizar as comparações múltiplas entre os grupos. Para os resultados significativos com o teste de Kruskal-Wallis, foi usado o teste de Mann-Whitney para verificar diferenças entre 2 grupos (comparações 2 a 2). Para as comparações entre os subgrupos 2 e 28, os testes T para amostras independentes (dados normalizados) e de Mann-Whitney (dados não-normalizados em pelo menos uma das variáveis de um dos subgrupos) foram usados. O programa estatístico utilizado foi o IBM SPSS Statistics versão 22. Os gráficos apresentando os dados analisados foram desenvolvidos utilizando o programa GraphPad Prism 5. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas com $p < 0,05$.

RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1. SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA NPM-HFn

5.1.1. AVALIAÇÃO DA ASSOCIAÇÃO DA FERRITINA À NPM

A eletroforese em gel de agarose (Figura 13) mostra que a ferritina livre (HFn) pode correr até o final do gel, enquanto que a NPM-HFn permaneceu no topo do gel. Além disso, a coloração azul fornecida pelo corante Kumasi blue ao interagir com proteínas, confirmou a presença da ferritina associada às NPM no poço correspondente à NPM-HFn,

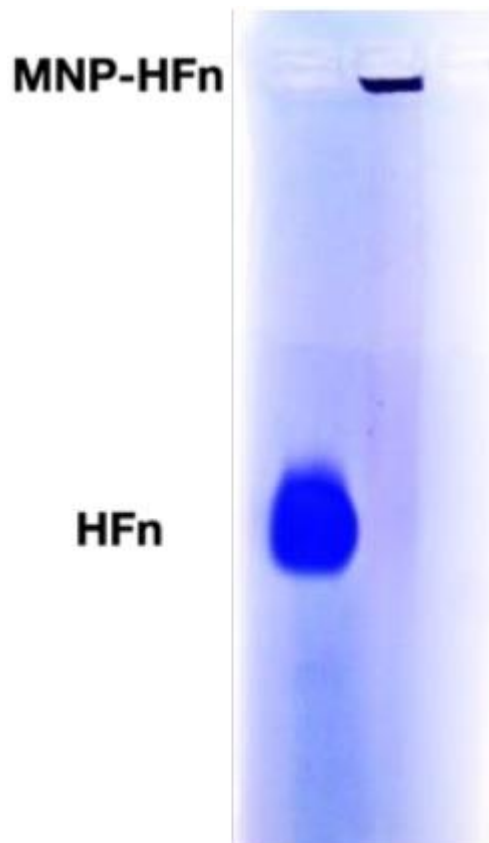


Figura 13 - – Imagem do gel de agarose após a coloração com Kumasi blue. A ferritina (HFn) livre correu até o final, enquanto a NPM-HFn permaneceu no topo do gel (Fonte: GUERRINI, 2017).

5.1.2. CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA NPM-HFn

A análise da morfologia das nanopartículas por Microscopia Eletrônica de Transmissão mostrou que as NPM possuem diâmetro médio de $12,7 \pm 0,7$ nm com um formato arredondado e com características monodispersas (Figura 14).

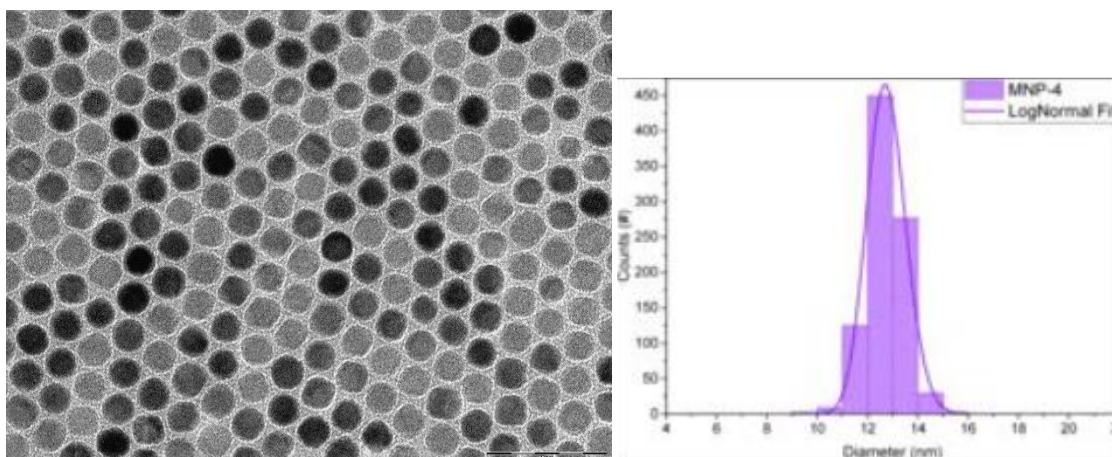


Figura 14 - Imagem de Microscopia Eletrônica de Transmissão das NPM e distribuição dos diâmetros correspondentes, obtida através da estatística da contagem de 1200 nanopartículas. O diâmetro médio é $d_{TEM} = 12,7 \pm 0,7$ nm; A linha roxa representa o ajuste a uma função log normal com $d_{LN} = 12,7 \pm 0,8$ nm (Fonte: GUERRINI, 2017).

A análise da difração de raio X mostrou que a NPM produzida possui a estrutura cristalina da magnetita, confirmando a boa qualidade da amostra (Figura 15).

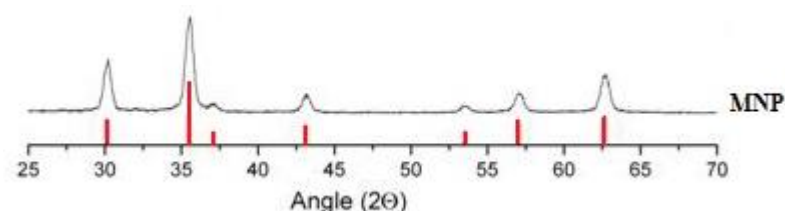
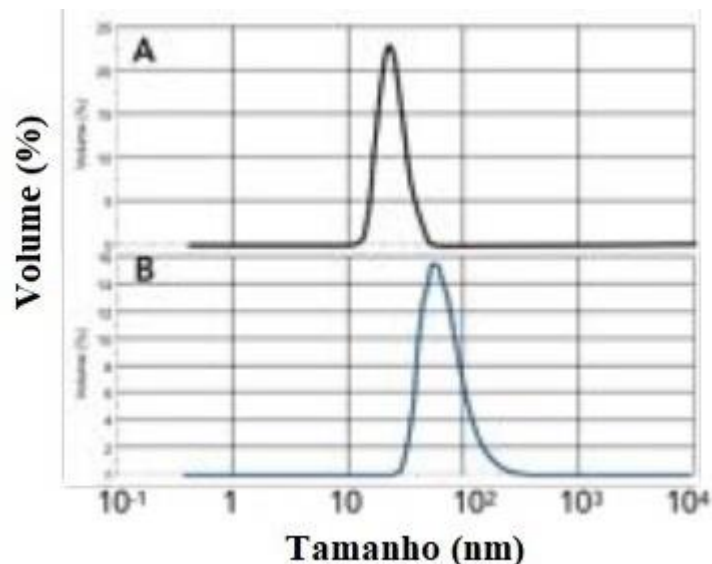


Figura 15 - Difração de raio X (DRX) da NPM. As barras vermelhas representam o padrão da magnetita (Fonte: GUERRINI, 2017).

Para saber o diâmetro hidrodinâmico da NPM-HFn foi feito o Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS). O diâmetro de 70 nm da NPM-HFn confirma que a ligação da HFn com a NPM foi bem-sucedida. É importante ressaltar que todas as amostras foram caracterizadas por uma distribuição simples e nenhuma aglomeração foi notada. O potencial zeta foi de $-21,3$ mV (Figura 16).



	D_H (nm)	PDI	ZPOT (mV)
NPM-HFn	70,4	0,168	-21,3

Figura 16 - Distribuição do diâmetro das amostras através do DLS. (A) representa a amostra NPM. (B) representa a amostra NPM-HFn. (D) Valores do resultado do DLS e do potencial zeta, Valores do Diâmetro Hidrodinâmico, índice de polidispersão e potencial zeta estão descritos na tabela. dH indica o diâmetro hidrodinâmico, PdI indica o índice de polidispersão e ZPOT indica o potencial zeta (Adaptado: GUERRINI, 2017).

5.1.3. Termometria *in vitro*

Durante a obtenção das curvas de aquecimento foi observado que as concentrações de 0,6 (60 µL), 0,8 (80 µL) e 1 mg (100 µL) de ferro foram as concentrações que atingiram e mantiveram a temperatura desejada de aproximadamente 43°C (Figura 17).

- O volume de 500 µL (5 mg de ferro) alcançou a temperatura de 40 °C após 4,3 minutos e atingiu a temperatura máxima de 53,39 °C;
- O volume de 100 µL (1 mg de ferro) alcançou a temperatura de 40 °C após 5,25 minutos e atingiu a temperatura máxima de 45,34 °C;
- O volume de 80 µL (0,8 mg de ferro) alcançou a temperatura de 40 °C após 8,35 minutos e atingiu a temperatura máxima de 43,16 °C;
- O volume de 60 µL (0,6 mg de ferro) alcançou a temperatura de 40 °C após 8,45 minutos e atingiu a temperatura máxima de 42 °C;
- O volume de 40 µL (0,4 mg de ferro) alcançou a temperatura máxima de 37,65 °C.

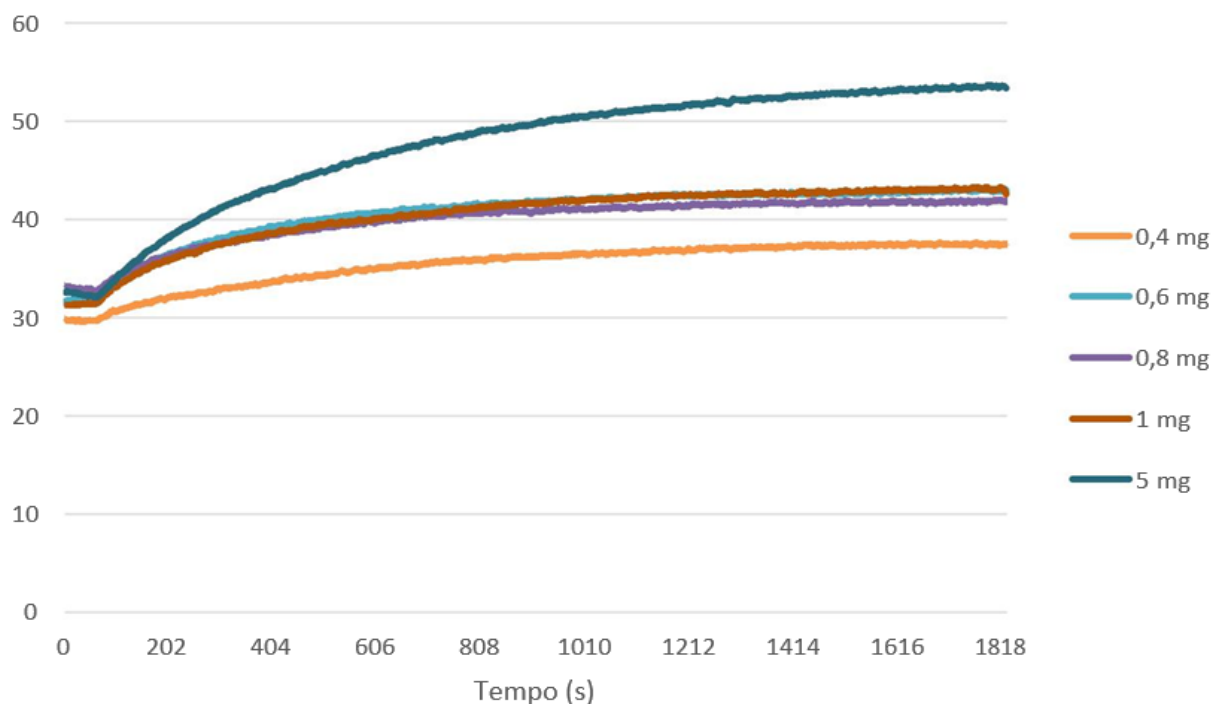


Figura 17 - Curva de aquecimento da amostra NPM-HFn exposta ao campo magnético alternado na frequência de 332,3 kHz, 228 V e campo magnético de 342,75 G, durante 30 min.

Com esses resultados foi possível determinar as doses a serem administradas por via intratumoral que, além de fornecerem melhor aquecimento apresentam volumes adequados para administração intratumoral (item 5.4).

5.2 ANÁLISE DA TOXICIDADE DA NPM-HFn

5.2.1. ANÁLISE DOS PARÂMETROS CLÍNICOS

A avaliação do peso corporal (Figura 18) mostra que os animais de todos os grupos, mesmo após a administração da NP-HFn por via intraperitoneal, mantiveram o peso inicial, sem diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,05$).

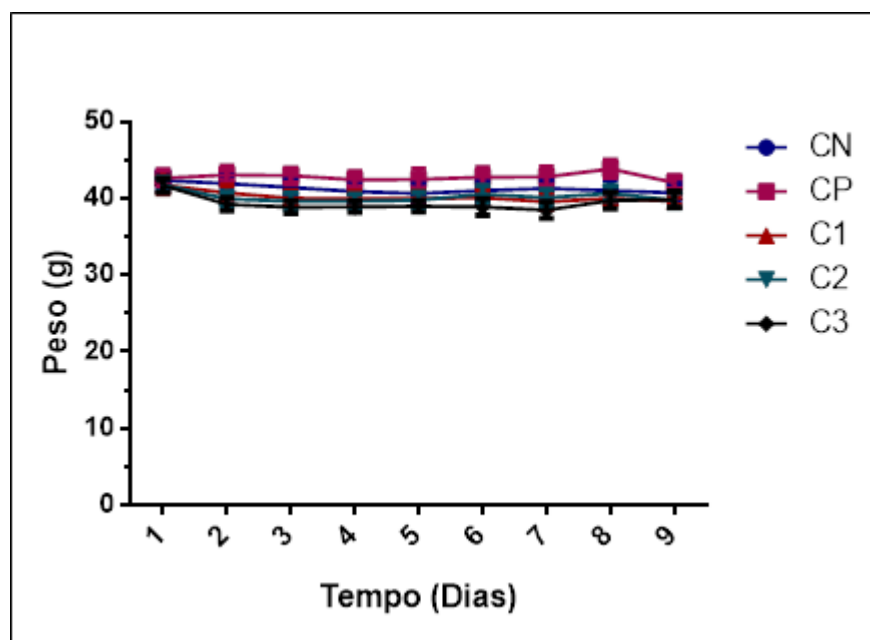


Figura 18 - Variação do peso corporal durante o tratamento com NPM-HFn administrada via intraperitoneal por 8 dias consecutivos. CN: camundongos que receberam soro fisiológico a 0,9%; CP: camundongos que receberam 40 mg/Kg de MetilMetanoSulfonato (MMS); C1: camundongos que receberam 6,25 mg/Kg da NPM-HFn; C2: camundongos que receberam 12,5 mg/Kg da NPM-HFn; C3: camundongos que receberam 25 mg/Kg da NPM-HFn. Valores representados como média \pm EPM. As análises estatísticas do grupo CP foram feitas utilizando o teste Kruskal-Wallis, enquanto que as análises dos grupos CN, C1, C2 e C3 foram feitas utilizando o teste One-way ANOVA com pós-teste Tukey ($p > 0,05$).

Quanto ao consumo de ração, foi observado que no quinto dia de tratamento, no grupo em que foi administrada a maior dose da NPM-HFn, C3, houve diminuição significativa em comparação com o grupo controle saudável, CN. Mas, no 9º dia de tratamento esse consumo de ração já não apresentava essa diferença, como mostrado na Figura 19.

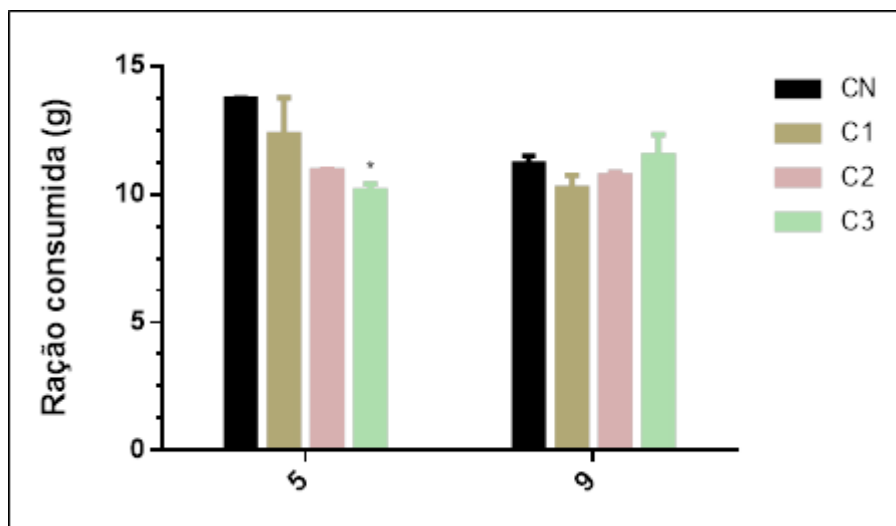


Figura 19 - Ração consumida por grupo experimental durante o tratamento com NPM-HFn administrada via intraperitoneal por 8 dias consecutivos. CN: camundongos que receberam soro fisiológico a 0,9%; CP: camundongos que receberam 40 mg/Kg de MetilMetanoSulfonato (MMS); C1: camundongos que receberam 6,25 mg/Kg da NPM-HFn; C2: camundongos que receberam 12,5 mg/Kg da NPM-HFn; C3: camundongos que receberam 25 mg/Kg da NPM-HFn. Valores representados como média \pm EPM. As análises estatísticas foram feitas utilizando o teste Kruskal-Wallis. * significa $p \leq 0,05$.

5.2.2. ANÁLISE GENOTÓXICA

5.2.2.1. Teste de Micronúcleo

As frequências de eritrócitos policromáticos micronucleados observadas nos camundongos tratados com NPM-HFn estão representados na Tabela 3.

Tabela 3 - Resultados do teste do micronúcleo (MN) em camundongos Swiss fêmeas após o tratamento com NPM-HFn administrada via intraperitoneal por 8 dias consecutivos. O controle negativo (CN) recebeu soro fisiológico a 0,9%, enquanto o controle positivo (CP), 40 mg/Kg de metilmetanosulfonato (MMS) em uma única dose intraperitoneal no 8º dia de tratamento.

Grupo	Eritrócitos Policromáticos (EPC)	
	MN-EPC	Índice de Proliferação Celular (%EPC)
CN	3,20 \pm 1,77	83,60 \pm 5,83
CP	4,20 \pm 1,96	69,29 \pm 6,01
C1	2,00 \pm 1,48	71,55 \pm 4,88
C2	2,20 \pm 1,96	79,70 \pm 7,64
C3	0,67 \pm 0,49	82,54 \pm 1,80
P-valores	0,680	0,242

Os dados correspondem à média e ao erro padrão da média (EPM). C1= camundongos que receberam 6,25 mg/Kg da NPM-HFn; C2: camundongos que receberam 12,5 mg/Kg da NPM-HFn; C3: camundongos que receberam 25 mg/Kg

da NPM-HFn; MN-EPC: frequência de micronúcleos nos eritrócitos policromáticos; %EPC: percentagem de eritrócitos policromáticos. Os p-valores foram gerados por ANOVA (%EPC) e pelo teste de Kruskal-Wallis (MN-EPC).

A comparação da frequência de micronúcleos entre os grupos não apresentou nenhuma significância estatística, o que indica que a NPM-HFn nas concentrações testadas não induziu dano cromossômico estrutural ou numérico em eritrócitos imaturos. A substância MMS utilizada no controle positivo, na concentração utilizada (40 mg/mL) mostrou tendência para aumentar esse valor, mas a diferença não foi significativa.

5.2.2.2. Teste Cometa

Os resultados do teste cometa, após tratamento dos animais com NPM-HFn, estão mostrados na Figura 20 e estão representados como médias e erro padrão da média de dano total (% de DNA na cauda).

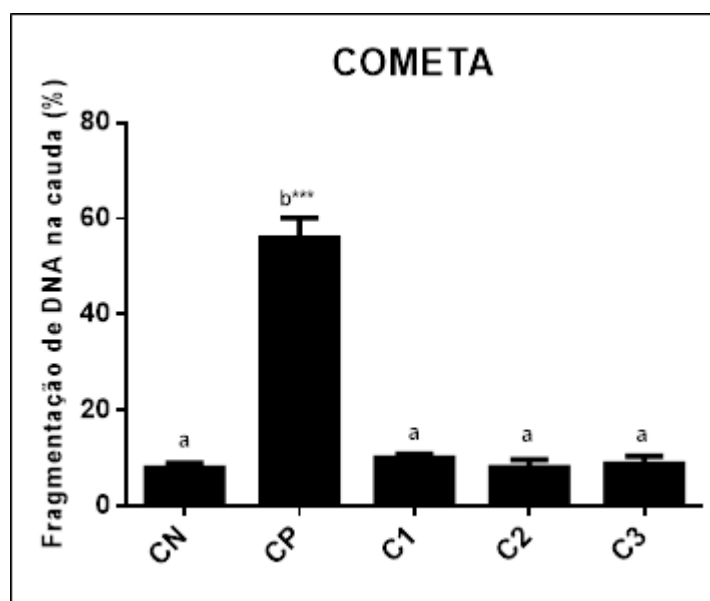


Figura 20 – Resultado do teste cometa após o tratamento com NPM-HFn administrada via intraperitoneal por 8 dias consecutivos. CN: camundongos que receberam soro fisiológico a 0,9%; CP: camundongos que receberam 40 mg/Kg de MetilMetanoSulfonato (MMS); C1: camundongos que receberam 6,25 mg/Kg da NPM-HFn; C2: camundongos que receberam 12,5 mg/Kg da NPM-HFn; C3: camundongos que receberam 25 mg/Kg da NPM-HFn. Os valores de p foram gerados usando ANOVA. As letras minúsculas indicam diferenças significativas detectadas pelo teste de

Foi observado aumento significativo da porcentagem de dano no DNA das células da medula óssea, apenas no grupo positivo (CP), tratado com MMS, em comparação com o grupo saudável (CN). Não foram observados danos significativos nos grupos tratados com a amostra NPM-HFn.

5.2.3. ANÁLISE HEMATOLÓGICA

Na análise dos hemogramas obtidos após os tratamentos com NPM-HFn (Tabela 4), constatou-se que houve alterações nas variáveis hemoglobina corpuscular média (HCM), concentração hemoglobínica corpuscular média (CHCM), e percentagens de linfócitos e neutrófilos + monócitos.

Quando comparados com o grupo controle negativo (CN), as alterações hematológicas encontradas após os tratamentos foram: diminuição significativa da hemoglobina corpuscular média (HCM; $p=0,008$) e da concentração hemoglobínica corpuscular média (CHCM; $p=0,016$) no grupo C2, o mesmo ocorrendo com CHCM no grupo C3 ($p=0,024$); redução significativa da percentagem de linfócitos nos grupos C1 ($p=0,037$) e C3 ($p=0,010$); e aumento significativo de neutrófilos + monócitos no grupo C3 ($p=0,000$).

A redução significativa da % de linfócitos ($p=0,037$) também foi observada no grupo C3, quando comparado ao grupo controle positivo (CP), não havendo diferenças significativas nos parâmetros hematológicos entre os grupos de tratamento C1, C2 e C3.

Tabela 4 - Análises hematológicas de camundongos Swiss fêmeas saudáveis após o tratamento com NPM-HFn administrada via intraperitoneal por 8 dias consecutivos. O controle negativo (CN) recebeu soro fisiológico a 0,9%, enquanto o controle positivo (CP), 40 mg/Kg de metilmetanosulfonato (MMS) em uma única dose intraperitoneal no 8º dia de tratamento.

	CN	CP	C1	C2	C3	P- valores
Eritrograma						
Eritrócitos ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	8,33 \pm 0,32	8,48 \pm 0,21	7,98 \pm 0,31	8,47 \pm 0,45	8,20 \pm 0,33	0,819
HGB (g/dL)	12,33 \pm 0,34	12,12 \pm 0,37	11,65 \pm 0,59	11,57 \pm 0,62	11,57 \pm 0,50	0,594
HCT (%)	31,22 \pm 0,98	31,85 \pm 0,90	30,20 \pm 1,24	31,05 \pm 1,81	30,52 \pm 1,32	0,781
VCM (fL)	37,53 \pm 0,49	37,60 \pm 0,69	37,80 \pm 0,23	36,65 \pm 0,55	37,23 \pm 0,41	0,532
HCM (pg)	14,90 \pm 0,25	14,32 \pm 0,30	14,58 \pm 0,22	13,67 \pm 0,20 ^{***a}	14,10 \pm 0,17	0,011
CHCM (g/dL)	39,55 \pm 0,56	37,98 \pm 0,16	38,52 \pm 0,51	37,32 \pm 0,36 ^{*a}	37,92 \pm 0,25 ^{*a}	0,021
Leucograma						
Leucócitos totais ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	3,13 \pm 0,37	2,65 \pm 1,05	4,87 \pm 0,71	4,97 \pm 0,61	3,82 \pm 0,23	0,074
Linfócitos (%)	76,08 \pm 4,26	69,43 \pm 4,62	66,95 \pm 4,55 ^{*a}	68,15 \pm 1,93	54,55 \pm 4,66 ^{*a}	0,022
Neutrófilos + Monócitos (%)	20,72 \pm 2,06	28,80 \pm 4,14	30,92 \pm 3,44	30,77 \pm 2,35	44,88 \pm 4,50 ^{***a,*b}	0,001
Eosinófilos (%)	3,20 \pm 2,45	1,77 \pm 0,80	2,13 \pm 1,67	1,08 \pm 0,56	0,57 \pm 0,16	0,807
Plaquetas						
PLT ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	1013,17 \pm 145,45	893,33 \pm 81,26	990,67 \pm 140,29	1326,17 \pm 175,02	1048,50 \pm 63,88	0,160

Os dados correspondem à média e ao erro padrão da média (EPM). CN: controle negativo (camundongos que receberam soro fisiológico a 0,9%); CP: controle positivo (camundongos que receberam 40 mg/Kg de metilmetanosulfonato - MMS); C1= camundongos que receberam 6,25 mg/Kg da NPM-HFn; C2: camundongos que receberam 12,5 mg/Kg da NPM-HFn; C3: camundongos que receberam 25 mg/Kg da NPM-HFn; HGB:

Hemoglobina; HCT: Hematócito; VCM: Volume Corpuscular Médio; HCM: Hemoglobina Corpuscular Média; CHCM: Concentração Hemoglobínica Corpuscular Média; PLT: plaquetas; g/dL: gramas por decilitros; fL: femtolitros; pg: picograma. Os valores de p de eritrócitos, MCV, MCH, leucócitos totais e neutrófilos + monócitos foram gerados por ANOVA, enquanto os demais p-valores foram gerados pelo teste de Kruskal-Wallis. As letras minúsculas indicam diferenças significativas a nível de *p < 0,05 e **p < 0,01 detectadas pelos testes de Tukey (HCM, neutrófilos + monócitos) e de Mann-Whitney (CHCM, % linfócitos), sendo a= significativo comparado com o grupo CN; b= significativo comparado com o grupo CP.

5.2.4. ANÁLISE BIOQUÍMICA

Na análise bioquímica dos animais tratados com NPM-HFn, observou-se que houve alterações nas variáveis TGO (AST) e fosfatase alcalina, quando comparados com o grupo controle negativo (CN); houve aumento significativo nos valores de TGO (AST) nos grupos C1 e C3 (p= 0,010 para ambos), e redução significativa nos valores da fosfatase alcalina no grupo C3 (p= 0,045). O grupo controle positivo (CP) também promoveu aumento significativo nos valores de TGP (ALT: p= 0,037) e TGO (AST: p= 0,004). Os resultados e as diferenças significativas nos parâmetros bioquímicos entre os grupos que receberam tratamento com MMS e NPM-HFn são mostradas na Tabela 5.

Tabela 5 - Resultados das dosagens bioquímicas de camundongos Swiss fêmeas saudáveis após o tratamento com NPM-HFn administrada via intraperitoneal por 8 dias consecutivos. O controle negativo (CN) recebeu soro fisiológico a 0,9%, enquanto o controle positivo (CP), 40 mg/Kg de metilmetanosulfonato (MMS) em uma única dose intraperitoneal no 8º dia de tratamento.

	CN	CP	C1	C2	C3	P-valores
TGP (ALT) - U/L	17,00 ± 3,85	32,17 ± 4,90 ^{*a}	30,17 ± 3,38	21,67 ± 3,12	27,83 ± 1,01	0,028
TGO (AST) - U/L	57,00 ± 5,96	114,67 ± 7,76 ^{**a}	94,33 ± 14,94 ^{*a}	70,83 ± 9,60 ^{*b}	105,33 ± 22,65 ^{*a}	0,003
FOSFATASE ALCALINA (U/L)	11,33 ± 1,89	8,83 ± 0,91	9,00 ± 0,82	10,67 ± 1,61	5,83 ± 2,18 ^{*a}	0,135
LDH (mg/dL)	703,00 ± 242,05	1031,17 ± 178,30	678,50 ± 101,48	778,00 ± 99,78	558,50 ± 30,05 ^{**b,*d}	0,108
CREATININA (mg/dL)	0,32 ± 0,02	0,31 ± 0,01	0,36 ± 0,03	0,27 ± 0,02 ^{**c}	0,30 ± 0,01	0,016
UREIA (mg/dL)	49,50 ± 3,39	50,67 ± 6,56	45,33 ± 4,08	34,00 ± 1,10 ^{*b}	37,00 ± 2,16	0,018
FERRO SÉRICO (µg/dL)	166,83 ± 16,76	171,17 ± 37,18	138,17 ± 37,26	188,00 ± 44,28	275,83 ± 21,45 ^{*c}	0,068

Os dados correspondem à média e ao erro padrão da média (EPM). CN: controle negativo (camundongos que receberam soro fisiológico a 0,9%); CP: controle positivo (camundongos que receberam 40 mg/Kg de metilmetanosulfonato - MMS); C1= camundongos que receberam 6,25 mg/Kg da NPM-HFn; C2: camundongos que receberam 12,5 mg/Kg da NPM-HFn; C3: camundongos que receberam 25 mg/Kg da NPM-HFn; TGP: transaminase glutâmico-pirúvica (ou ALT: alanina aminotransferase); TGO: transaminase glutâmico-oxalacética (ou AST: aspartato aminotransferase); LDH: lactato desidrogenase; U/L: unidades por litro; mg/dL: miligramas por decilitro; µg/dL= microgramas por decilitro. Os valores de p de TGP, creatinina, ureia e ferro sérico foram gerados por ANOVA, enquanto os demais p-valores foram gerados pelo teste de Kruskal-Wallis. As letras minúsculas indicam diferenças significativas a nível de *p < 0,05 e **p < 0,01 detectadas pelos testes de Tukey (TGP, creatinina, ureia,

ferro sérico) e de Mann-Whitney (TGO, fosfatase alcalina, LDH), sendo a= significativo comparado com o grupo CN; b= significativo comparado com o grupo CP; c= significativo comparado com o grupo C1; d= significativo comparado com o grupo C2.

5.2.5. ANÁLISE DOS ÓRGÃOS

A Figura 21 mostra os resultados obtidos em relação ao peso absoluto (A) e pelo relativo (B) relativo dos órgãos baço, fígado, cérebro, pulmão e rins dos animais tratados com NPM-HFn, coletados no dia da eutanásia. Os pesos, tanto absoluto quanto relativo, dos órgãos cérebro, pulmão e rins não foram alterados pelo tratamento. Entretanto, os que receberam as maiores concentrações da NPM-HFn (C2 e C3) apresentaram esplenomegalia. Esse aumento de peso (absoluto e relativo) foi significativo nos grupos que receberam as maiores concentrações da amostra C2 e C3, em comparação com o grupo saudável CN. Além disso, a maior concentração da amostra (C3) também levou a um aumento significativo do fígado ($p < 0,001$).

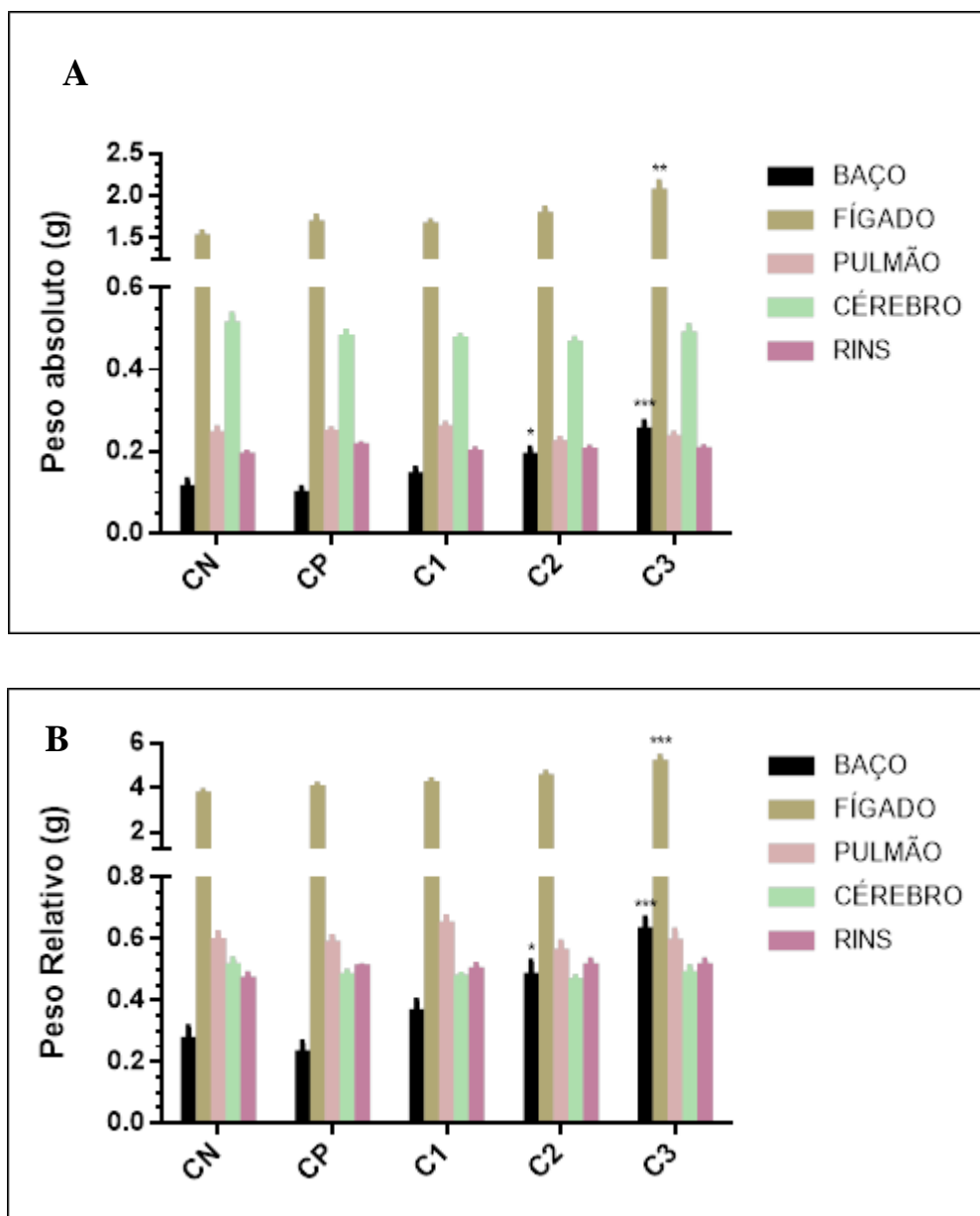


Figura 21 – (A) Peso absoluto do baço, fígado, pulmão, rins e cérebro. Os valores de p do baço e pulmão foram gerados usando one-way ANOVA com pós-teste Tukey, enquanto que os demais valores do foram gerados utilizando o teste Kruskal-Wallis. (B) Peso relativo do baço, fígado, pulmão, rins e cérebro. CN: camundongos que receberam soro fisiológico a 0,9%; CP: camundongos que receberam 40 mg/Kg de MetilMetanoSulfonato (MMS); C1: camundongos que receberam 6,25 mg/Kg da NPM-HFn; C2: camundongos que receberam 12,5 mg/Kg da NPM-HFn; C3: camundongos que receberam 25 mg/Kg da NPM-HFn. Os valores de p do baço, fígado, pulmão e rins foram gerados usando one-way ANOVA com pós-teste Tukey, enquanto que o valor do cérebro foi gerado utilizando o teste Kruskal-Wallis * significa $p < 0,05$; ** significa $p < 0,01$ *** significa $p < 0,001$.

5.2.6. ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA

No baço foram observadas hemossiderose e hematopoiese em todos os animais experimentais, incluindo os animais controle saudáveis (Anexo 2). Adicionalmente, foi observado hiperplasia da polpa branca apenas no grupo C1.

No cérebro (Anexo 3) foram observados congestão e edema em alguns animais de todos os grupos.

No fígado (Anexo 4) dos animais que receberam as maiores doses da NPM-HFn (C2 e C3) foi observada hemossiderose. Apesar de não significativo também foi observada uma leve degeneração hidrópica em todos os grupos que receberam a NPM-HFn.

Foi encontrado uma leve hiperplasia no linfonodo dos animais que receberam a menor dose da NPM-HFn (Anexo 5).

No pulmão (Anexo 6) foram observadas congestão e hemorragia em todos os animais, incluindo os animais controle saudáveis. Estes dados do baço, do cérebro e do pulmão, portanto, não são considerados como indicadores de toxicidade.

No rim (Anexo 7) foram observados alguns achados de hemossiderose peri-renal e inflamação crônica apenas em um ou dois animais de cada grupo tratado.

5.2.7. ANÁLISE DE BIODISTRIBUIÇÃO

5.2.7.1. ANÁLISE HISTOLÓGICA – COLORAÇÃO DE PERLS

A coloração de Perls é comumente utilizada para a detecção de ferro em cortes histológicos, sendo este revelado pela coloração azulada (ver figura 28, 29 e 30). Foram observados aumento de ferro no baço, pulmão e linfonodo e aumento crescente fígado nos grupos tratados, enquanto que nos demais órgãos (cérebro e rins) não foi observada nenhuma variação em comparação com o grupo controle (Tabela 6).

Tabela 6 - Presença de ferro observada na análise por Perls após o tratamento com NPM-HFn administrada via intraperitoneal por 8 dias consecutivos. O controle negativo (CN) recebeu soro fisiológico a 0,9%, enquanto o controle positivo (CP), 40 mg/Kg de metilmetanosulfonato (MMS) em uma única dose intraperitoneal no 8º dia de tratamento. Ausência de ferro (-), pouco ferro (+), concentração de ferro mediana (++), muito ferro (+++).

	BAÇO	FÍGADO	PULMÃO	CÉREBRO	RINS	LINFONODO
CN	++	+	+	+	+	+
C1	+++	+	+	+	++	++
C2	+++	++	+	+	+	++
C3	+++	+++	++	+	+	++

CN: camundongos que receberam soro fisiológico a 0,9%; C1: camundongos que receberam 6,25 mg/Kg da NPM-HFn; C2: camundongos que receberam 12,5 mg/Kg da NPM-HFn; C3: camundongos que receberam 25 mg/Kg da NPM-HFn

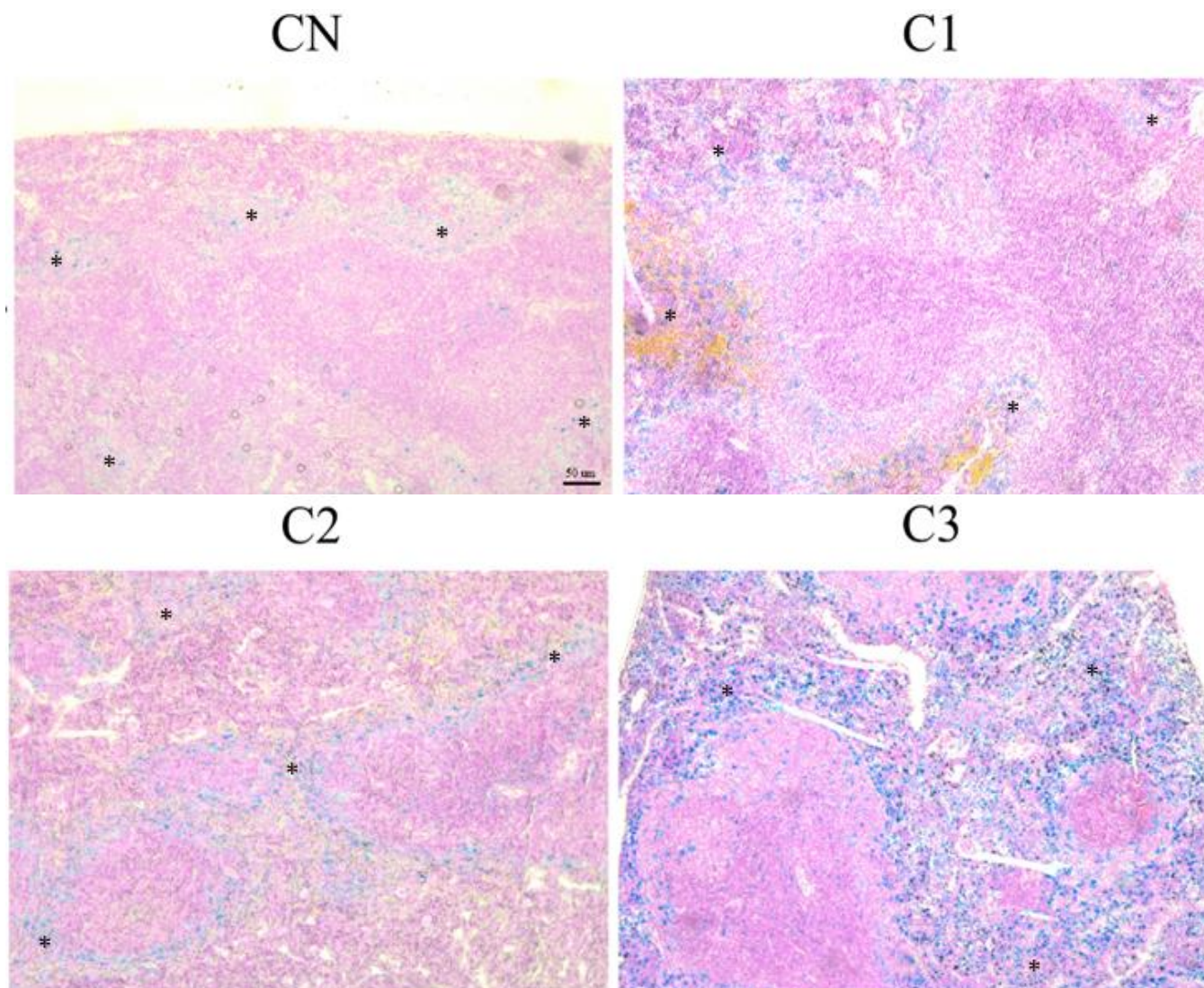


Figura 22 – Fotomicrografia de cortes histológicos do baço de camundongos Swiss corados por Perls. CN: camundongos que receberam soro fisiológico a 0,9%; C1: camundongos que receberam 6,25 mg/Kg da NPM-HFn; C2: camundongos que receberam 12,5 mg/Kg da NPM-HFn; C3: camundongos que receberam 25 mg/Kg da NPM-HFn. (*) indica presença de ferro (PERLS 100x).

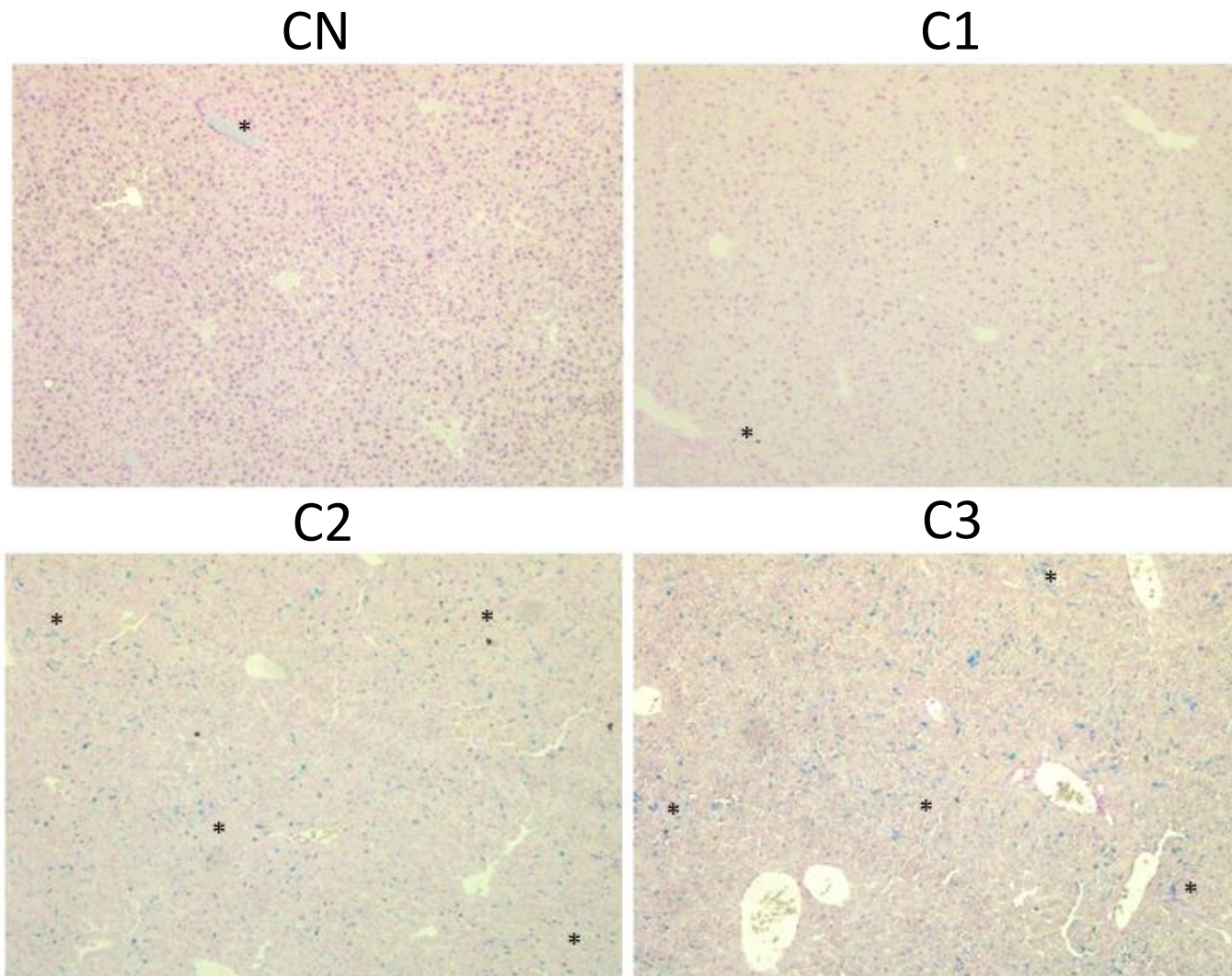


Figura 23 - Fotomicrografia de cortes histológicos do fígado de camundongos Swiss corados por Perls. CN: camundongos que receberam soro fisiológico a 0,9%; C1: camundongos que receberam 6,25 mg/Kg da NPM-HFn; C2: camundongos que receberam 12,5 mg/Kg da NPM-HFn; C3: camundongos que receberam 25 mg/Kg da NPM-HFn. (*) indica presença de ferro (PERLS 100x).

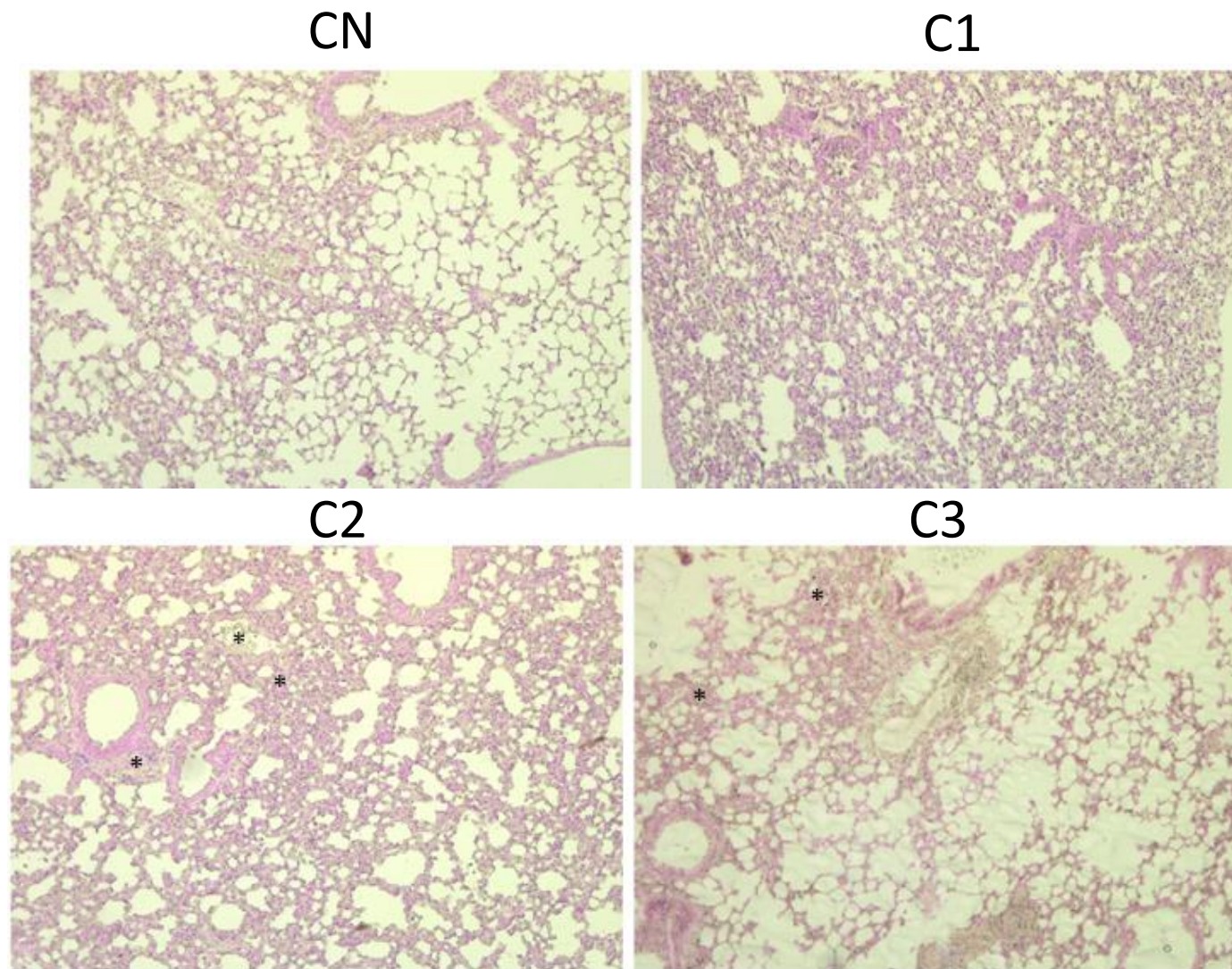


Figura 24 - Fotomicrografia de cortes histológicos do pulmão de camundongos Swiss. CN: camundongos que receberam soro fisiológico a 0,9%; C1: camundongos que receberam 6,25 mg/Kg da NPM-HFn; C2: camundongos que receberam 12,5 mg/Kg da NPM-HFn; C3: camundongos que receberam 25 mg/Kg da NPM-HFn. (*) indica presença de ferro (PERLS 100x).

5.2.7.2. ICP-OES

Os resultados obtidos na avaliação quantitativa da biodistribuição da NPM-HFn realizada por Espectrometria de Emissão Óptica com Plasma (ICP-OES), confirmaram os resultados da análise de Perls, tendo sido detectado aumento crescente da concentração de ferro no baço (não significativo), fígado e pulmão nos grupos tratados (C1, C2 e C3), como mostrado na figura 30A. Também foi observado aumento significativo na concentração de ferro no sangue do grupo C3 (Fig. 30B). Por outro lado, no rim e no cérebro não foi observada nenhuma variação significativa desse parâmetro em comparação com o grupo controle.

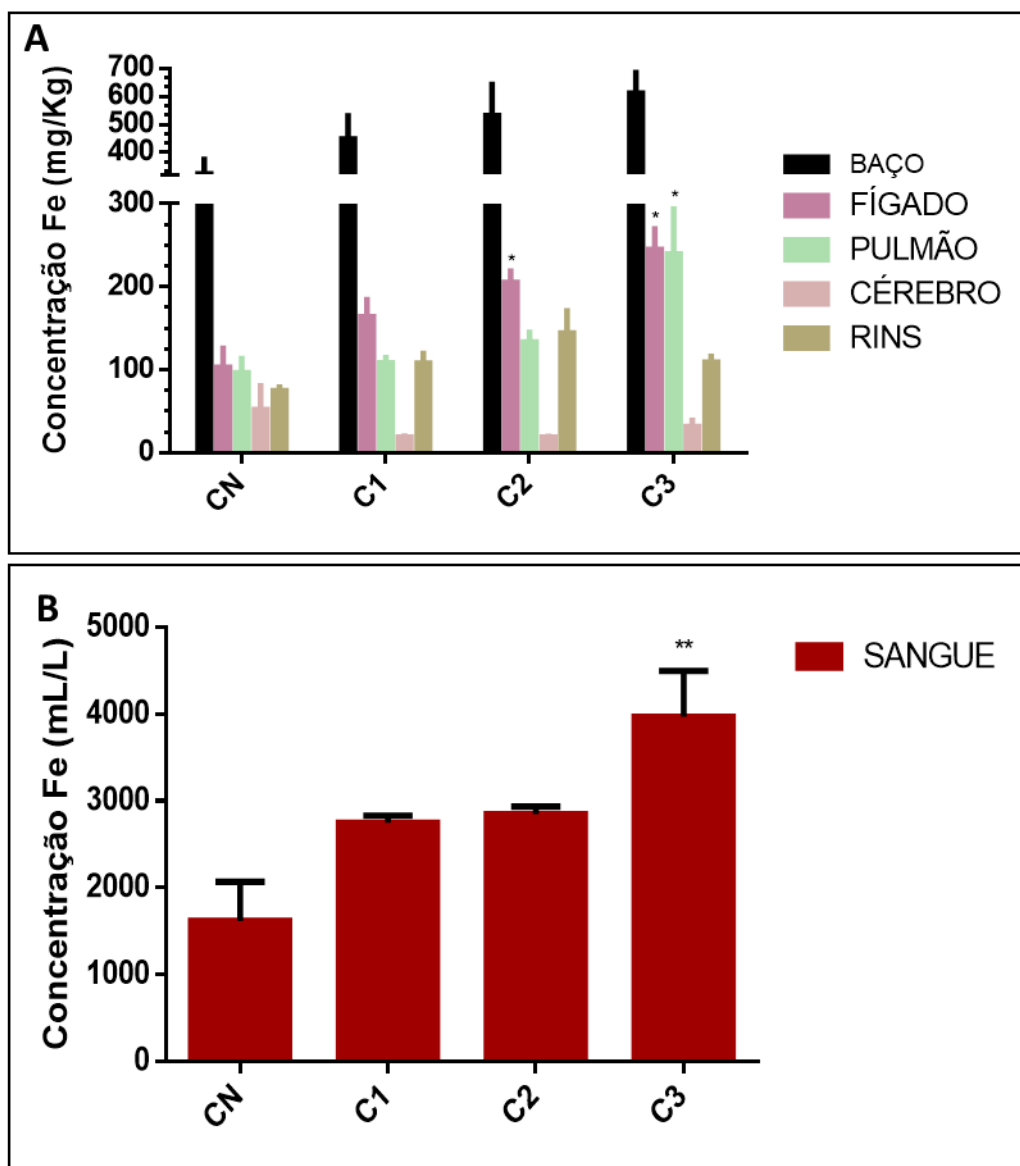


Figura 25 – Análise de biodistribuição *ex vivo* da NPM-HFn no (A) rim, cérebro, pulmão, fígado, baço e (B) sangue após o tratamento com NPM-HFn administrada via intraperitoneal por 8 dias consecutivos. O controle negativo (CN) recebeu o soro fisiológico a 0,9%, enquanto o controle positivo (CP), 40 mg/Kg de metilmetanosulfonato (MMS) em uma única dose intraperitoneal no 8º dia de tratamento. CN: camundongos que receberam soro fisiológico a 0,9%; CP: camundongos que receberam 40 mg/Kg de MetilMetanoSulfonato (MMS); C1: camundongos que receberam 6,25 mg/Kg da NPM-HFn; C2: camundongos que receberam 12,5 mg/Kg da NPM-HFn; C3: camundongos que receberam 25 mg/Kg da NPM-HFn. * significa $p < 0,05$; ** significa $p < 0,01$.

5.3. EFICÁCIA DA NPM-HFn NO TRATAMENTO DE ADENOCARCINOMA MAMÁRIO DE EHRLICH

5.3.1. ANÁLISE DOS PARÂMETROS CLÍNICOS

Foi observado que os animais que receberam a administração endovenosa da NPM-HFn apresentaram um acúmulo de nanopartículas na veia caudal onde era aplicado a amostra magnética a partir da terceira dose, como mostrado na Figura 31.



Figura 26 - Foto mostrando o acúmulo da NPM-HFn na veia caudal do camundongo. Foto tirada no 32º dia.

Quanto à avaliação do peso, a Figura 32 mostra que todos os animais de todos os grupos mantiveram o peso inicial sem diferença estatística ($p > 0,05$), tanto no subgrupo coletado dois dias após o tratamento (subgrupo 2), quanto no subgrupo em que a coleta ocorreu 28 dias após o tratamento (subgrupo 28). Também não houve diferença estatística entre os pesos dos diferentes grupos experimentais.

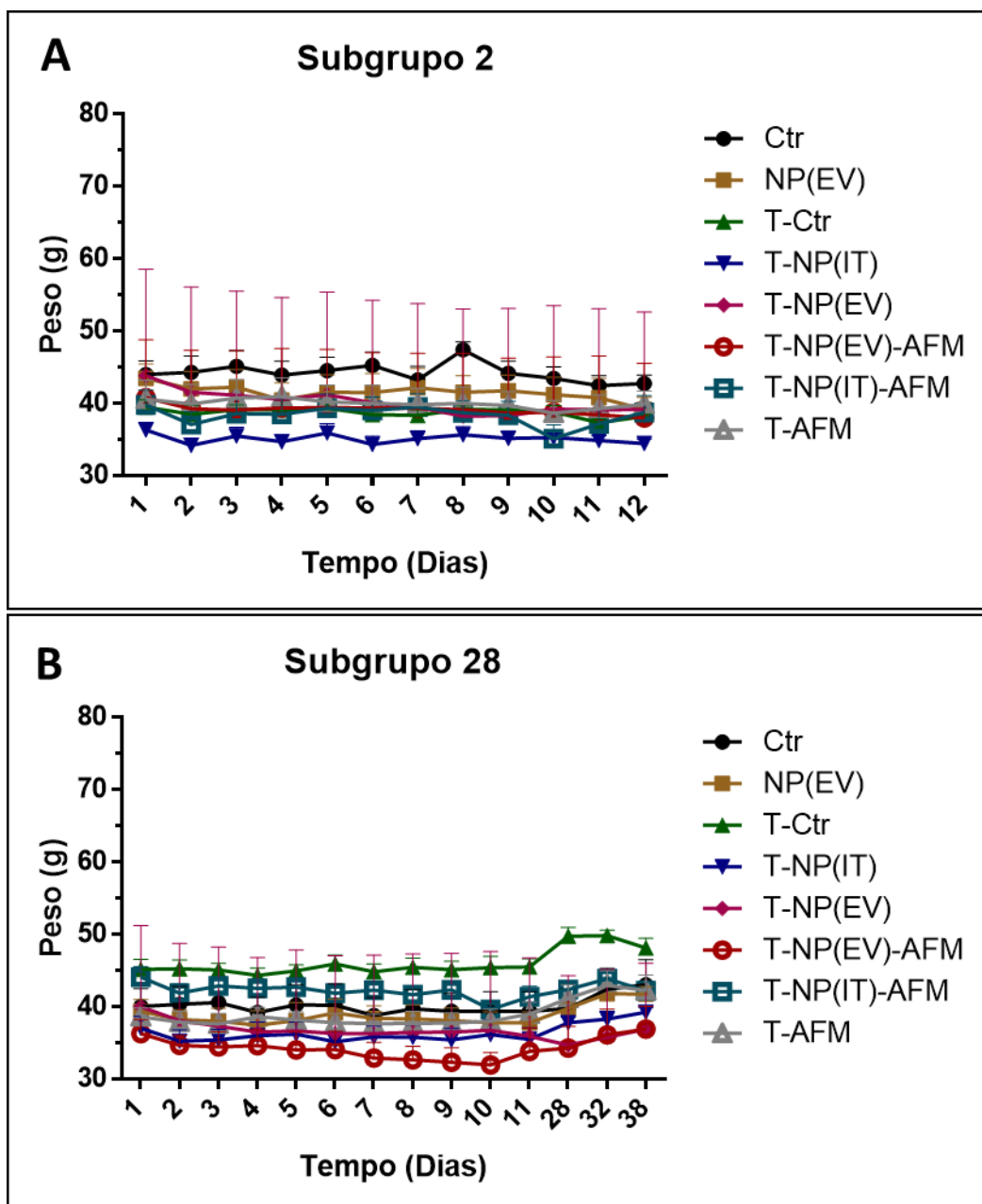


Figura 27 - Variação do peso corporal (A) subgrupo de 2 dias e (B) subgrupo de 28 dias durante e após as 5 administrações da NPM-HFn. Os valores estão apresentados como média \pm EPM. Ctr: Camundongos sem tumor que receberam administração endovenosa de soro fisiológico 0,9%; NP(EV): Camundongos sem tumor que receberam a administração endovenosa da NPM-HFn; T-Ctr: Camundongos com tumor que receberam a administração intratumoral de soro fisiológico 0,9%; T-NP(IT): Camundongos com tumor que receberam a administração intratumoral da NPM-HFn; T-AFM: Camundongos com tumor que receberam a administração intratumoral de soro fisiológico 0,9% e foram expostos ao campo magnético alternado; T-NP(IT)-AFM: Camundongos com tumor que receberam a administração intratumoral da NPM-HFn e foram expostos ao campo magnético alternado; T-NP(EV)-AFM: Camundongos com tumor que receberam a administração endovenosa da NPM-HFn e foram expostos ao campo magnético alternado.

5.3.2. VOLUME TUMORAL

Em geral, os resultados da variação do volume tumoral mostraram que todos os animais apresentaram um aumento crescente do volume tumoral durante o período experimental, porém alguns tratamentos reduziram a velocidade do crescimento tumoral, como demonstrado na Figura 33.

Analisando o subgrupo 2, os animais controle tumor (T-Ctr) foram os que apresentaram maior volume tumoral, como esperado, seguido pelo grupo só exposto ao campo magnético (T-AFM), grupo que só recebeu a NPM-HFn por via endovenosa (T-NP(EV)), grupo que só recebeu a NPM-HFn por via intratumoral (T-NP(IT)), grupo que recebeu a NPM-HFn por via endovenosa e exposto ao CMA (T-NP(IT)-AFM) e grupo que recebeu a NPM-HFn por via intratumoral e exposto ao CMA (T-NP(EV)-AFM) (figura 33 A). Nos dias 5, 6 e 7 o grupo T-NP(EV)-AFM apresentou um volume tumoral significativamente menor em comparação com os grupos T-NP(IT) e T-AFM ($p < 0,05$ e $p < 0,01$). No dia 7 o grupo T-NP (EV) apresentou um volume tumoral significativamente menor em comparação com o grupo T-NP(IT) ($p < 0,05$). Nos dias 11 e 12 foi possível observar que o grupo T-NP(EV)-AFM apresentou um volume tumoral significativamente menor que no grupo T-Ctr e no grupo T-AFM ($p < 0,05$).

Ainda analisando o subgrupo 2, o grupo T-Ctr apresentou um aumento significativo do tumor nos dias 11 e 12 em comparação com o dia 3.

Analisando o subgrupo 28, os animais do grupo só exposto ao campo magnético foram os que apresentaram maior volume tumoral, seguido pelos grupos: grupo controle tumor, grupo que só recebeu a NPM-HFn por via endovenosa, grupo que recebeu a NPM-HFn por via intratumoral e exposto ao CMA, grupo que só recebeu a NPM-HFn por via intratumoral e grupo que recebeu a NPM-HFn por via intratumoral e exposto ao CMA (figura 33 B). Nos dias 5, 8 e 9 o grupo T-NP(EV)-AFM apresentou volume tumoral significativamente menor em comparação com os grupos T-NP(IT) ($p < 0,05$). Os grupos T-Ctr, T-NP(IT), T-NP(IT)-AFM e T-AFM apresentaram um aumento significativo do tumor no dia 28 em comparação com os primeiros dias após a inoculação tumoral ($p < 0,05$).

Em conjunto, os resultados mostraram efeitos mais significativos de redução de tumor nos tratamentos com magnetohipertermia, especialmente no grupo em que as NPM foram injetadas por via endovenosa.

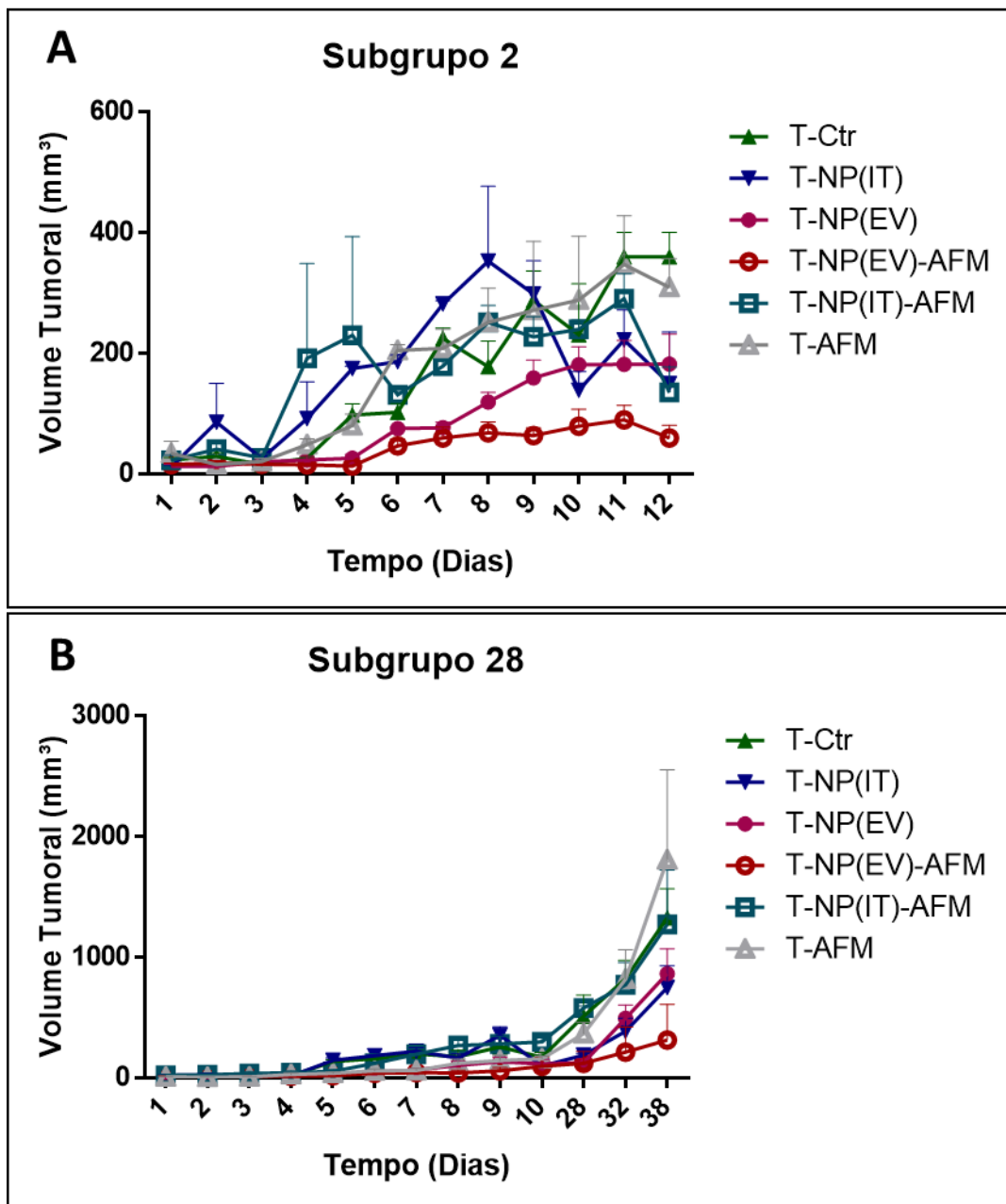


Figura 28 - Variação do volume tumoral *in vivo* utilizando um paquímetro digital (A) subgrupo de 2 dias e (B) subgrupo de 28 dias durante e após as 5 administrações da NPM-HFn. Os valores estão apresentados como média \pm EPM. T-Ctr: Camundongos com tumor que receberam a administração intratumoral de soro fisiológico 0,9%; T-NP(IT): Camundongos com tumor que receberam a administração intratumoral da NPM-HFn; T-NP(EV): Camundongos com tumor que receberam a administração endovenosa da NPM-HFn; T-AFM: Camundongos com tumor que receberam a administração intratumoral de soro fisiológico 0,9% e foram expostos ao campo magnético alternado; T-NP(IT)-AFM: Camundongos com tumor que receberam a administração intratumoral da NPM-HFn e foram expostos ao campo magnético alternado; T-NP(EV)-AFM: Camundongos com tumor que receberam a administração endovenosa da NPM-HFn e foram expostos ao campo magnético alternado.

A Figura 34 ilustra os resultados do volume tumoral *ex vivo*, indicando que o maior volume tumoral foi encontrado nos animais do controle tumor, T-Ctr, e o grupo com menor volume tumoral foi o que recebeu a NPM-HFn por via endovenosa seguido pela exposição ao CMA, tanto no subgrupo 2 quanto no subgrupo 28, confirmando os resultados obtidos das medidas do tumor apresentados na figura 33. Contudo, a área tumoral do grupo tratado por MHT com administração intratumoral mostrou uma pequena área tumoral e uma grande área de necrose.

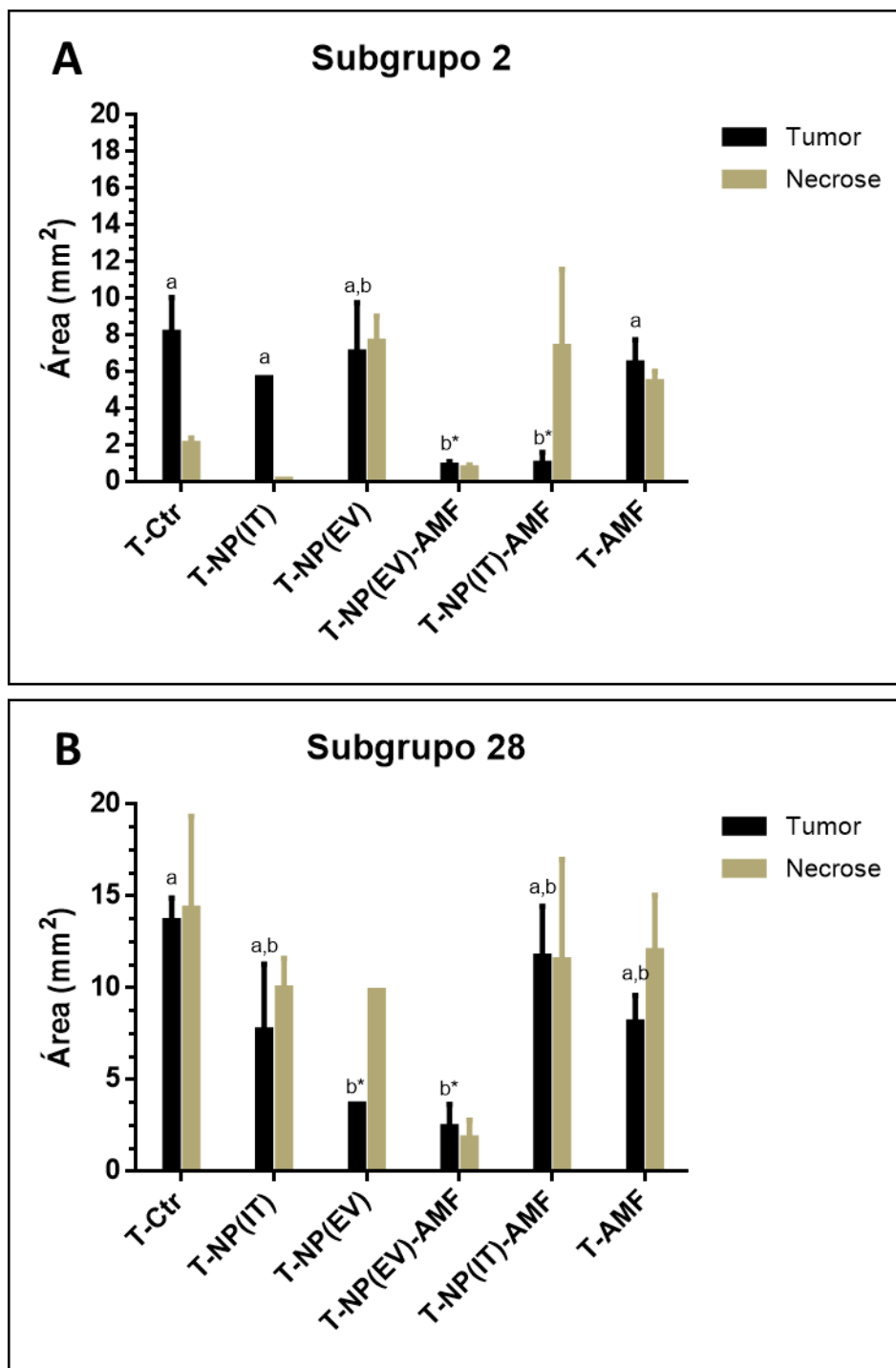


Figura 29 - Volume tumoral e da área de necrose no tumor *ex vivo* (A) subgrupo de 2 dias e (B) subgrupo de 28 dias após as 5 administrações da NPM-HFn. Os valores estão apresentados como média \pm EPM. T-Ctr: Camundongos com tumor que receberam a administração intratumoral de soro fisiológico 0,9%; T-NP(IT): Camundongos com tumor que receberam a administração intratumoral da NPM-HFn; T-NP(EV): Camundongos com tumor que receberam a administração endovenosa da NPM-HFn; T-AMF: Camundongos com tumor que receberam a administração intratumoral de soro fisiológico 0,9% e foram expostos ao campo magnético alternado; T-NP(IT)-AMF: Camundongos com tumor que receberam a administração intratumoral da NPM-HFn e foram expostos ao campo magnético alternado; T-NP(EV)-AMF: Camundongos com tumor que receberam a administração endovenosa da NPM-HFn e foram expostos ao campo magnético alternado. As letras minúsculas indicam diferenças significativas. * significa $p < 0,05$.

5.3.3. ANÁLISE HEMATOLÓGICA

A análise hematológica mostrou algumas alterações em alguns dos parâmetros estudados, tanto no subgrupo 2, quanto no subgrupo 28, em comparação com o grupo controle saudável (Ctr). No hemograma do subgrupo 2 (tabela 7) foi observado que camundongos sem tumor que receberam a administração endovenosa da NPM-HFn (grupo NP(EV)) tiveram diminuição significativa tanto de CHCM quanto do percentual de linfócitos ($p=0,011$ para ambos). Também foi observada redução significativa de HGB no grupo tratado com administração intratumoral da NPM-HFn e exposição ao campo magnético alternado (T-NP(IT)AFM: $p=0,046$) e de leucócitos totais no grupo de camundongos com tumor que receberam a administração intratumoral de soro fisiológico 0,9%; (T-Ctr: $p=0,046$),

Outras diferenças significativas nos parâmetros hematológicos entre os grupos que receberam tratamento com NPM-HFn são mostradas na Tabela 7.

Tabela 7 - Análises hematológicas de camundongos Swiss fêmeas após as 5 administrações da NPM-HFn.

SUBGRUPO 2	Ctr	NP(EV)	T-Ctr	T-NP(IT)	T-NP(EV)	T-NP(EV)AFM	T-NP(IT)AFM	T-AFM	P-valores
Eritrograma									
Eritrócitos ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	8,19 \pm 0,46	7,26 \pm 0,77	7,94 \pm 0,37	8,20 \pm 0,82	7,19 \pm 0,29	7,11 \pm 0,53	7,77 \pm 0,22	8,12 \pm 0,24	0,496
HGB (g/dL)	12,03 \pm 0,38	10,17 \pm 1,27	10,90 \pm 0,25	11,50 \pm 1,30	10,47 \pm 0,22	9,80 \pm 0,74	10,80 \pm 0,20 ^a	11,47 \pm 0,32 ^d	0,278
HCT (%)	30,33 \pm 1,34	27,80 \pm 2,71	28,00 \pm 0,96	29,80 \pm 3,00	27,13 \pm 0,90	26,00 \pm 1,77	28,07 \pm 0,66	30,33 \pm 0,78	0,470
VCM (fL)	37,07 \pm 0,49	38,43 \pm 1,42	35,30 \pm 0,45	36,35 \pm 0,05	37,80 \pm 1,68	36,60 \pm 0,44	36,13 \pm 0,33	37,37 \pm 0,35	0,320
HCM (pg)	14,73 \pm 0,37	14,13 \pm 0,68	13,73 \pm 0,32	14,00 \pm 0,20	14,57 \pm 0,50	13,80 \pm 0,25	13,93 \pm 0,22	14,13 \pm 0,27	0,605
CHCM (g/dL)	39,70 \pm 0,51	36,40 \pm 0,95 ^a	38,97 \pm 0,45	38,55 \pm 0,45	38,60 \pm 0,57	37,70 \pm 0,40	38,47 \pm 0,29	37,83 \pm 0,42	0,024
Leucograma									
Leucócitos totais ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	3,30 \pm 0,52	3,67 \pm 2,12	1,87 \pm 0,17 ^a	10,20 \pm 6,7	10,43 \pm 2,64 ^c	4,00 \pm 1,04 ^c	4,13 \pm 1,62	2,87 \pm 0,26 ^c	0,121
Linfócitos (%)	39,70 \pm 0,51	36,40 \pm 0,95 ^a	38,97 \pm 0,45	38,55 \pm 0,45	38,60 \pm 0,57	37,70 \pm 0,40	38,47 \pm 0,29	37,83 \pm 0,42	0,024
Neutrófilos + Monócitos (%)	25,50 \pm 3,67	48,17 \pm 8,31	41,17 \pm 0,38	58,30 \pm 8,90	64,37 \pm 7,17	64,03 \pm 4,70	58,53 \pm 8,82	42,47 \pm 3,22	0,036
Eosinófilos (%)	1,67 \pm 1,02	3,43 \pm 2,43	0,87 \pm 0,19	0,95 \pm 0,25	3,17 \pm 1,50	0,67 \pm 0,19 ^b	2,50 \pm 1,50	1,17 \pm 0,52	0,440
Plaquetas									
PLT ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	1224,67 \pm 55,53	884,67 \pm 118,26	820,33 \pm 177,74	1271,00 \pm 259,00	1180,33 \pm 112,89	1325,67 \pm 122,67 ^{b,c}	1133,00 \pm 156,32	897,00 \pm 95,47	0,128

Os dados correspondem à média e ao erro padrão da média (EPM). Ctr: controle saudável (camundongos sem tumor que receberam administração endovenosa de soro fisiológico 0,9%; NP(EV): camundongos sem tumor que receberam a administração endovenosa da NPM-HFn; T-Ctr: camundongos com tumor que receberam a administração

intratumoral de soro fisiológico 0,9%; T-NP(IT): camundongos com tumor que receberam a administração intratumoral da NPM-HFn; T-NP(EV): camundongos com tumor que receberam a administração endovenosa da NPM-HFn; T-NP(EV)AFM: camundongos com tumor que receberam a administração endovenosa da NPM-HFn e foram expostos ao campo magnético alternado; T-NP(IT)AFM: camundongos com tumor que receberam a administração intratumoral da NPM-HFn e foram expostos ao campo magnético alternado; T-AFM: camundongos com tumor que receberam a administração intratumoral de soro fisiológico 0,9% e foram expostos ao campo magnético alternado; HGB: Hemoglobina; HCT: Hematócito; VCM: Volume Corpuscular Médio; HCM: Hemoglobina Corpuscular Média; CHCM: Concentração Hemoglobínica Corpuscular Média; PLT: plaquetas; g/dL: gramas por decilitros; fL: femtolitros; pg: picograma. Os valores de p de eritrócitos, HCT, MCV, MCHC e linfócitos (%) foram gerados por ANOVA, enquanto os demais p-valores foram gerados pelo teste de Kruskal-Wallis. As letras minúsculas indicam diferenças significativas a nível de $*p < 0,05$ detectadas pelos testes de Tukey (CHCM, linfócitos %) e de Mann-Whitney (HGB, leucócitos totais, eosinófilos %, PLT), sendo a= significativo comparado com o grupo Ctr; b= significativo comparado com o grupo NP(EV); c= significativo comparado com o grupo T-Ctr; d= significativo comparado com o grupo T-NP(IT)AFM.

No hemograma do subgrupo 28 (Tabela 8), alguns tratamentos com NPM-HFn promoveram alterações significativas, em comparação com o grupo controle saudável (Ctr), nos valores de VCM, CHCM, % linfócitos, % neutrófilos + monócitos e plaquetas (PLT). O grupo T-NP(EV) apresentou redução significativa nos valores de VCM ($p=0,046$) e plaquetas (PLT: $p=0,024$), o mesmo ocorrendo com os valores de CHCM nos grupos NP(EV) ($p=0,018$), T-NP(IT) ($p=0,012$) e T-NP(EV) ($p=0,027$). O grupo com tumor que recebeu a administração intratumoral da NPM-HFn e foi exposto ao campo magnético alternado (T-NP(IT)AFM) exibiu redução significativa nas percentuais de linfócitos ($p=0,002$) e de neutrófilos + monócitos ($p=0,002$), o mesmo ocorrendo com neutrófilos + monócitos no grupo com tumor que recebeu administração endovenosa da NPM-HFn e foi exposto ao campo magnético alternado (T-NP(EV)AFM: $p=0,021$).

Outras diferenças significativas nos parâmetros hematológicos entre os grupos que receberam tratamento com NPM-HFn do subgrupo 28 são mostradas na Tabela 8.

Tabela 8 - Análises hematológicas de camundongos Swiss fêmeas após as 5 administrações da NPM-HFn.

SUBGRUPO 28	Ctr	NP(EV)	T-Ctr	T-NP(IT)	T-NP(EV)	T-NP(EV)AFM	T-NP(IT)AFM	T-AFM	P-valores
Eritrograma									
Eritrócitos (x 10 ⁶ /μL)	6,48 ± 0,87	6,63 ± 0,84	8,04 ± 0,17	7,02 ± 0,52	9,21 ± 0,76	9,27 ± 0,90	7,54 ± 0,14	7,12 ± 0,53	0,044
HGB (g/dL)	9,57 ± 1,28	8,57 ± 1,35	11,30 ± 0,47	9,03 ± 0,48	11,47 ± 0,77	11,97 ± 1,00	10,27 ± 0,45	10,00 ± 0,56	0,123
HCT (%)	23,90 ± 3,23	23,10 ± 3,44	29,73 ± 1,28	24,47 ± 1,05	30,80 ± 1,82	31,53 ± 2,29	26,80 ± 0,87	26,40 ± 1,81	0,085
VCM (fL)	36,90 ± 0,50	34,73 ± 1,51	36,93 ± 0,84	35,03 ± 1,30	33,63 ± 1,17 ^a	34,20 ± 1,23	35,53 ± 0,50	37,10 ± 0,29	0,205
HCM (pg)	14,77 ± 0,34	12,90 ± 0,84	14,07 ± 0,32	12,93 ± 0,38	12,50 ± 0,26	12,97 ± 0,29	13,57 ± 0,35	14,10 ± 0,30 ^{d,e,f}	0,047
CHCM (g/dL)	40,07 ± 0,47	37,03 ± 0,92 ^a	38,00 ± 0,06	36,90 ± 0,40 ^a	37,20 ± 0,58 ^a	37,90 ± 0,51	38,30 ± 0,42	37,93 ± 0,54	0,017
Leucograma									
Leucócitos totais (x 10 ³ /μL)	1,70 ± 0,68	1,50 ± 0,36	3,83 ± 0,85	3,23 ± 0,93 ^b	6,63 ± 2,18	6,57 ± 3,52	4,03 ± 0,75	2,93 ± 0,43	0,058
Linfócitos (%)	73,13 ± 7,83	64,93 ± 1,00	45,93 ± 3,49	47,90 ± 1,50	47,90 ± 12,01	60,43 ± 5,13	29,93 ± 6,64 ^{**a,b,f}	50,80 ± 1,95	0,004
Neutrófilos + Monócitos (%)	73,13 ± 7,83	64,93 ± 1,00	44,60 ± 2,43	47,90 ± 1,50	51,37 ± 12,06	39,63 ± 5,47 ^a	29,93 ± 6,64 ^{**a,b}	50,80 ± 1,95	0,003
Eosinófilos (%)	1,33 ± 0,73	2,10 ± 1,80	0,30 ± 0,17	1,23 ± 0,99	0,73 ± 0,22	0,37 ± 0,13	0,50 ± 0,15	0,70 ± 0,31	0,952
Plaquetas									
PLT (x 10 ³ /μL)	579,67 ± 312,21	808,33 ± 131,77	1107,67 ± 131,71	823,00 ± 162,17	2025,33 ± 515,77 ^a	1738,67 ± 267,58	992,67 ± 70,00	756,00 ± 249,13	0,014

Os dados correspondem à média e ao erro padrão da média (EPM). Ctr: controle saudável (camundongos sem tumor que receberam administração endovenosa de soro fisiológico 0,9%); NP(EV): camundongos sem tumor que receberam a administração endovenosa da NPM-HFn; T-Ctr: camundongos com tumor que receberam a administração intratumoral de soro fisiológico 0,9%; T-NP(IT): camundongos com tumor que receberam a administração intratumoral da NPM-HFn; T-NP(EV): camundongos com tumor que receberam a administração endovenosa da NPM-HFn; T-NP(EV)AFM: camundongos com tumor que receberam a administração endovenosa da NPM-HFn e foram expostos ao campo magnético alternado; T-NP(IT)AFM: camundongos com tumor que receberam a administração intratumoral da NPM-HFn e foram expostos ao campo magnético alternado; T-AFM: camundongos com tumor que receberam a administração intratumoral de soro fisiológico 0,9% e foram expostos ao campo magnético alternado; HGB: Hemoglobina; HCT: Hematócrito; VCM: Volume Corpuscular Médio; HCM: Hemoglobina Corpuscular Média; CHCM: Concentração Hemoglobínica Corpuscular Média; PLT: plaquetas; g/dL: gramas por decilitros; fL: femtolitros; pg: picograma. Os valores de p de eritrócitos, HGB, HCT, CHCM, linfócitos (%), neutrófilos + monócitos (%) e PLT foram gerados por ANOVA, enquanto os demais p-valores foram gerados pelo teste de Kruskal-Wallis. As letras minúsculas indicam diferenças significativas a nível de *p < 0,05 e **p < 0,01 detectadas pelos testes de Tukey (CHCM, % linfócitos, % neutrófilos + monócitos, PLT) e de Mann-Whitney (VCM, HCM, leucócitos totais), sendo a= significativo comparado com o grupo Ctr; b= significativo comparado com o grupo NP(EV); d= significativo comparado com o grupo T-NP(IT); e= significativo comparado com o grupo T-NP(EV); f= significativo comparado com o grupo T-NP(EV)AFM.

Nas comparações entre os subgrupos 2 e 28 verificou-se diferença nos linfócitos de camundongos sem tumor (grupos Ctr e NP(EV)), cuja porcentagem foi significativamente maior no grupo 28. O mesmo ocorreu nos grupos com tumor que recebeu administração endovenosa da NPM-HFn e exposto ao campo magnético (T-NP(EV)AFM (p=0,047), grupo com tumor que

recebeu administração intratumoral da NPM-HFn (T-NP(IT)) (p=0,000) e grupo com tumor apenas exposto ao campo magnético (T-AFM) (p=0,047).

5.3.4. ANÁLISE BIOQUÍMICA

Na análise bioquímica dos animais do subgrupo 2 tratados com NPM-HFn, observou-se que houve alterações nas variáveis TGO (AST), creatinina e ureia, quando comparados com o grupo controle negativo (CN), ocorrendo aumento significativo nos valores de TGO (AST) no grupo com tumor que recebeu administração intratumoral da NPM-HFn (T-NP(IT)), e de ureia no grupo com tumor que recebeu administração endovenosa da NPM-HF (T-NP(EV)AFM (p=0,046 para ambos), e redução significativa de creatinina no grupo com tumor que recebeu administração intratumoral da NPM-HFn e foi expostos ao campo magnético alternado (T-NP(IT)AFM: p=0,029).

Outras diferenças significativas nos parâmetros bioquímicos entre os grupos que receberam tratamento com NPM-HFn são mostradas na Tabela 9.

Tabela 9 - Resultados das dosagens bioquímicas de camundongos Swiss fêmeas após as 5 administrações da NPM-HFn.

SUBGRUPO 2	Ctr	NP(EV)	T-Ctr	T-NP(IT)	T-NP(EV)	T-NP(EV)AFM	T-NP(IT)AFM	T-AFM	P-valores
TGP (ALT) - U/L	23,33 ± 6,39	31,00 ± 9,85	34,67 ± 1,76	49,67 ± 9,35	58,33 ± 15,34	39,00 ± 7,94	24,33 ± 2,40	53,00 ± 21,07	0,259
TGO (AST) - U/L	109,00 ± 22,03	102,00 ± 11,5	313,33 ± 55,85	239,33 ± 6,33 ^{a,b,c}	400,33 ± 20,85 ^d	248,00 ± 4,93	195,33 ± 10,17 ^d	281,33 ± 51,27	0,006
CREATININA (mg/dL)	0,57 ± 0,05	0,54 ± 0,01	0,62 ± 0,06	0,42 ± 0,10	0,64 ± 0,13	0,51 ± 0,11	0,21 ± 0,03 ^{a,c,e}	0,32 ± 0,02	0,006
UREIA (mg/dL)	18,67 ± 3,84	30,33 ± 0,88	20,67 ± 2,73	16,67 ± 2,19	52,50 ± 2,50	32,33 ± 3,33 ^{a,c,d}	28,00 ± 3,00	22,67 ± 4,41	0,034
FERRO SÉRICO (µg/dL)	196,67 ± 15,25	86,00 ± 12,34	110,67 ± 8,76	174,33 ± 29,33	213,67 ± 24,50 ^b	151,00 ± 33,61	154,33 ± 24,84	199,00 ± 40,62	0,033

Os dados correspondem à média e ao erro padrão da média (EPM). Ctr: controle saudável (camundongos sem tumor que receberam administração endovenosa de soro fisiológico 0,9%; NP(EV): camundongos sem tumor que receberam a administração endovenosa da NPM-HFn; T-Ctr: camundongos com tumor que receberam a administração intratumoral de soro fisiológico 0,9%; T-NP(IT): camundongos com tumor que receberam a administração intratumoral da NPM-HFn; T-NP(EV): camundongos com tumor que receberam a administração endovenosa da NPM-HFn; T-NP(EV)AFM: camundongos com tumor que receberam a administração endovenosa da NPM-HFn e foram expostos ao campo magnético alternado; T-NP(IT)AFM: camundongos com tumor que receberam a administração intratumoral da NPM-HFn e foram expostos ao campo magnético alternado; T-AFM: camundongos com tumor que receberam a administração intratumoral de soro fisiológico 0,9% e foram expostos ao campo magnético alternado; TGP: transaminase glutâmico-pirúvica (ou ALT: alanina aminotransferase); TGO: transaminase glutâmico-oxalacética (ou AST: aspartato aminotransferase); U/L: unidades por litro; mg/dL: miligramas por decilitro; µg/dL= microgramas por decilitro. Os valores de p de TGP (ALT), creatinina e ferro sérico foram gerados por ANOVA, enquanto os demais p-valores foram gerados pelo teste de Kruskal-Wallis. As letras minúsculas indicam diferenças significativas a nível de *p < 0,05 detectadas pelos testes de Tukey (creatinina, ferro sérico) e de Mann-

Whitney (TGO, ureia), sendo a= significativo comparado com o grupo Ctr; b= significativo comparado com o grupo NP(EV); c= significativo comparado com o grupo T-Ctr; d= significativo comparado com o grupo T-NP(IT)AFM; e= significativo comparado com o grupo T-NP(EV).

Os valores de quase todas as variáveis do subgrupo 28 não apresentaram diferenças significativas quando comparados com os do grupo controle saudável (Ctr), exceto TGP, cujos valores aumentaram significativamente no grupo T-NP(EV) ($p=0,019$). Outras diferenças significativas nos parâmetros bioquímicos entre os grupos que receberam tratamento com NPM-HFn são mostradas na Tabela 10.

Tabela 9 - Resultados das dosagens bioquímicas de camundongos Swiss fêmeas após as 5 administrações da NPM-HFn.

SUBGRUPO 28	Ctr	NP(EV)	T-Ctr	T-NP(IT)	T-NP(EV)	T-NP(EV)AFM	T-NP(IT)AFM	T-AFM	P-valores
TGP (ALT) - U/L	22,33 ± 11,46	165,00 ± 32,52	98,00 ± 12,12	64,33 ± 7,86	42,00 ± 1,53 ^a	44,33 ± 15,33	77,67 ± 28,05	129,00 ± 52,08	0,016
TGO (AST) - U/L	149,00 ± 31,02	388,33 ± 52,17	381,00 ± 188,86	383,67 ± 42,24	502,50 ± 371,50	422,50 ± 325,50	339,00 ± 131,80	572,33 ± 291,01	0,848
CREATININA (mg/dL)	0,40 ± 0,05	0,35 ± 0,02	0,41 ± 0,02	0,53 ± 0,08	0,27 ± 0,01 ^d	0,39 ± 0,09	0,49 ± 0,03	0,39 ± 0,04	0,055
UREIA (mg/dL)	22,00 ± 3,51	33,00 ± 4,58	20,33 ± 2,73	25,33 ± 0,33 ^{b,c}	34,33 ± 4,49 ^d	32,67 ± 5,49	18,33 ± 4,18 ^d	18,33 ± 0,67 ^{b,d,e,f}	0,019
FERRO SÉRICO (µg/dL)	137,00 ± 55,65	115,67 ± 33,15	121,67 ± 14,38	168,00 ± 55,75	71,33 ± 9,03	166,33 ± 47,10	454,67 ± 196,68	250,33 ± 22,58	0,054

Os dados correspondem à média e ao erro padrão da média (EPM). Ctr: controle saudável (camundongos sem tumor que receberam administração endovenosa de soro fisiológico 0,9%; NP(EV): camundongos sem tumor que receberam a administração endovenosa da NPM-HFn; T-Ctr: camundongos com tumor que receberam a administração intratumoral de soro fisiológico 0,9%; T-NP(IT): camundongos com tumor que receberam a administração intratumoral da NPM-HFn; T-NP(EV): camundongos com tumor que receberam a administração endovenosa da NPM-HFn; T-NP(EV)AFM: camundongos com tumor que receberam a administração endovenosa da NPM-HFn e foram expostos ao campo magnético alternado; T-NP(IT)AFM: camundongos com tumor que receberam a administração intratumoral da NPM-HFn e foram expostos ao campo magnético alternado; T-AFM: camundongos com tumor que receberam a administração intratumoral de soro fisiológico 0,9% e foram expostos ao campo magnético alternado; TGP: transaminase glutâmico-pirúvica (ou ALT: alanina aminotransferase); TGO: transaminase glutâmico-oxalacética (ou AST: aspartato aminotransferase); U/L: unidades por litro; mg/dL: miligramas por decilitro; µg/dL= microgramas por decilitro. Os valores de p de TGP (ALT), TGO (AST) e creatinina foram gerados por ANOVA, enquanto os demais p-valores foram gerados pelo teste de Kruskal-Wallis. As letras minúsculas indicam diferenças significativas a nível de $*p < 0,05$ detectadas pelos testes de Tukey (TGP e creatinina) e de Mann-Whitney (ureia), sendo a= significativo comparado com o grupo Ctr; b= significativo comparado com o grupo NP(EV); c= significativo comparado com o grupo T-Ctr; d= significativo comparado com o grupo T-NP(IT); e= significativo comparado com o grupo T-NP(EV); f= significativo comparado com o grupo T-NP(EV)AFM.

Nas comparações das análises bioquímicas entre os subgrupos 2 e 28 verificou-se aumento significativo do ALT no subgrupo 28 do grupo saudável que recebeu a administração da NPM-HFn (NP(EV): $p= 0,017$) e no grupo controle tumor (T-Ctr: $p= 0,032$). E aumento do AST no subgrupo 28 do grupo com tumor que recebeu administração intratumoral da NPM-HFn (T-NP(IT): $p= 0,046$). Também foi observado diminuição na creatinina no subgrupo 28 do grupo saudável que recebeu a administração da NPM-HFn (NP(EV): $p= 0,002$), no grupo controle tumor (T-Ctr: $p= 0,022$) e um aumento no grupo com tumor que recebeu administração intratumoral da

NPM-HFn e foi expostos ao campo magnético alternado (T-NP(IT)AFM: $p= 0,003$). Na ureia ocorreu aumento no subgrupo 28 do grupo com tumor que recebeu administração intratumoral da NPM-HFn (T-NP(IT): $p= 0,046$) e diminuição do grupo com tumor que recebeu administração intratumoral da NPM-HFn e foi expostos ao campo magnético alternado (T-NP(IT)AFM: $p= 0,046$).

5.3.5. ANALISE DOS ÓRGÃOS NÃO ALVO

Avaliando o peso absoluto no subgrupo 2 não se observou nenhuma diferença estatística, mas no subgrupo 28 foram observadas diferenças significativas no baço dos grupos NP(EV) e T-NP(IT), em comparação com o grupo controle Ctr (Figura 35).

Por outro lado, avaliando o peso relativo dos órgãos nos animais do subgrupo 2 e do subgrupo 28, é possível observar aumento no peso do baço em todos os animais que receberam a NPM-HFn. Foi observado também aumento no peso do fígado nos grupos NP(EV) e T-NP(IT) do subgrupo 28 (Figura 36). Nem os tratamentos, nem o tumor, causaram alterações significativas no peso dos demais órgãos.

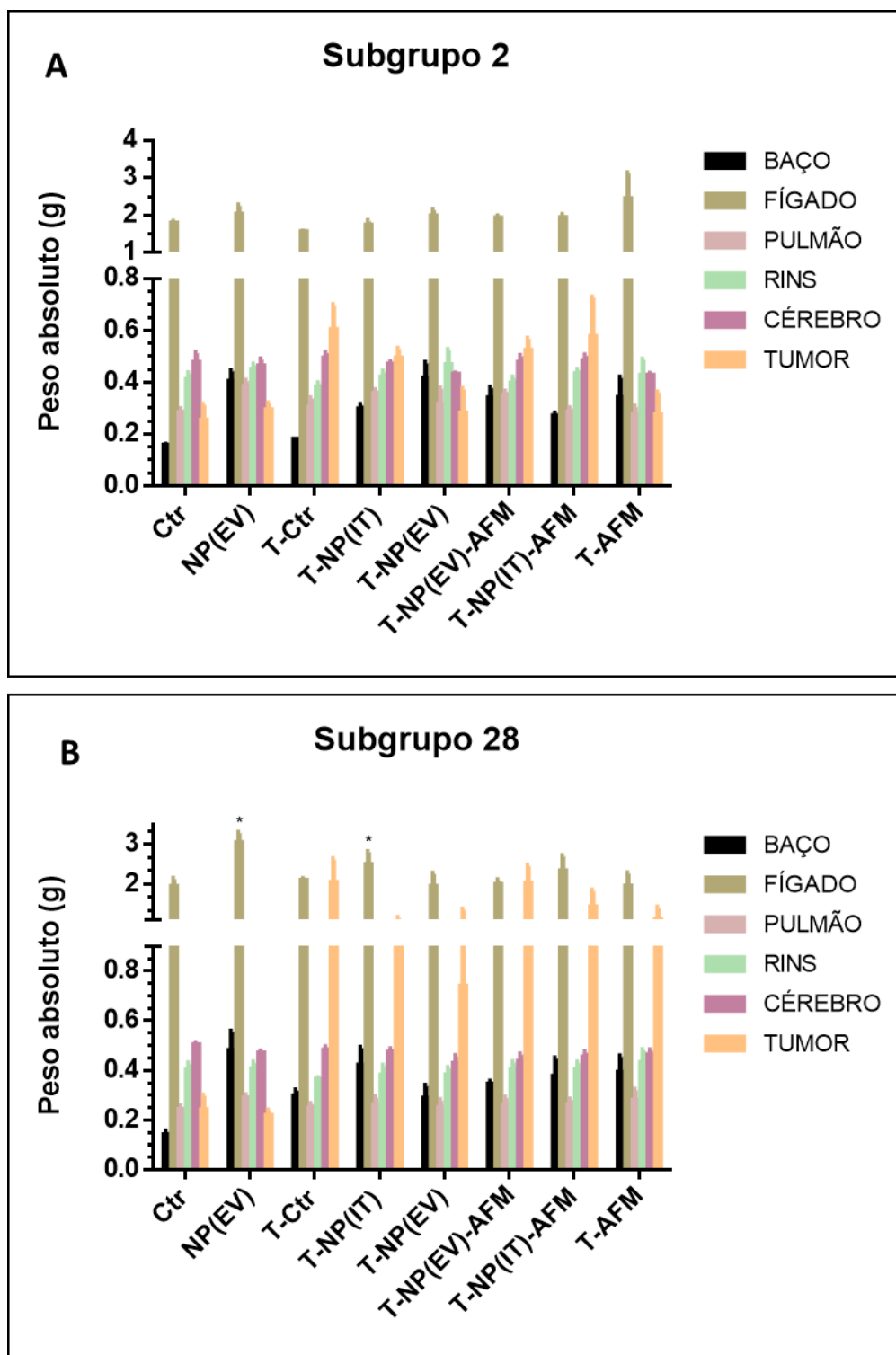


Figura 30 - Peso absoluto do baço, fígado, pulmão, rins, cérebro e tumor no subgrupo 2 (A) e no subgrupo 28 (B) após as 5 administrações da NPM-HFn. Os valores de p do pulmão no subgrupo 2 foram gerados usando one-way ANOVA com pós-teste Tukey, e os demais valores foram gerados utilizando o teste Kruskal-Wallis. Enquanto o valor de p do baço, fígado e rins no subgrupo 28 foram gerados usando one-way ANOVA com pós-teste Tukey, os demais valores foram gerados utilizando o teste Kruskal-Wallis. * significa $p < 0,05$.

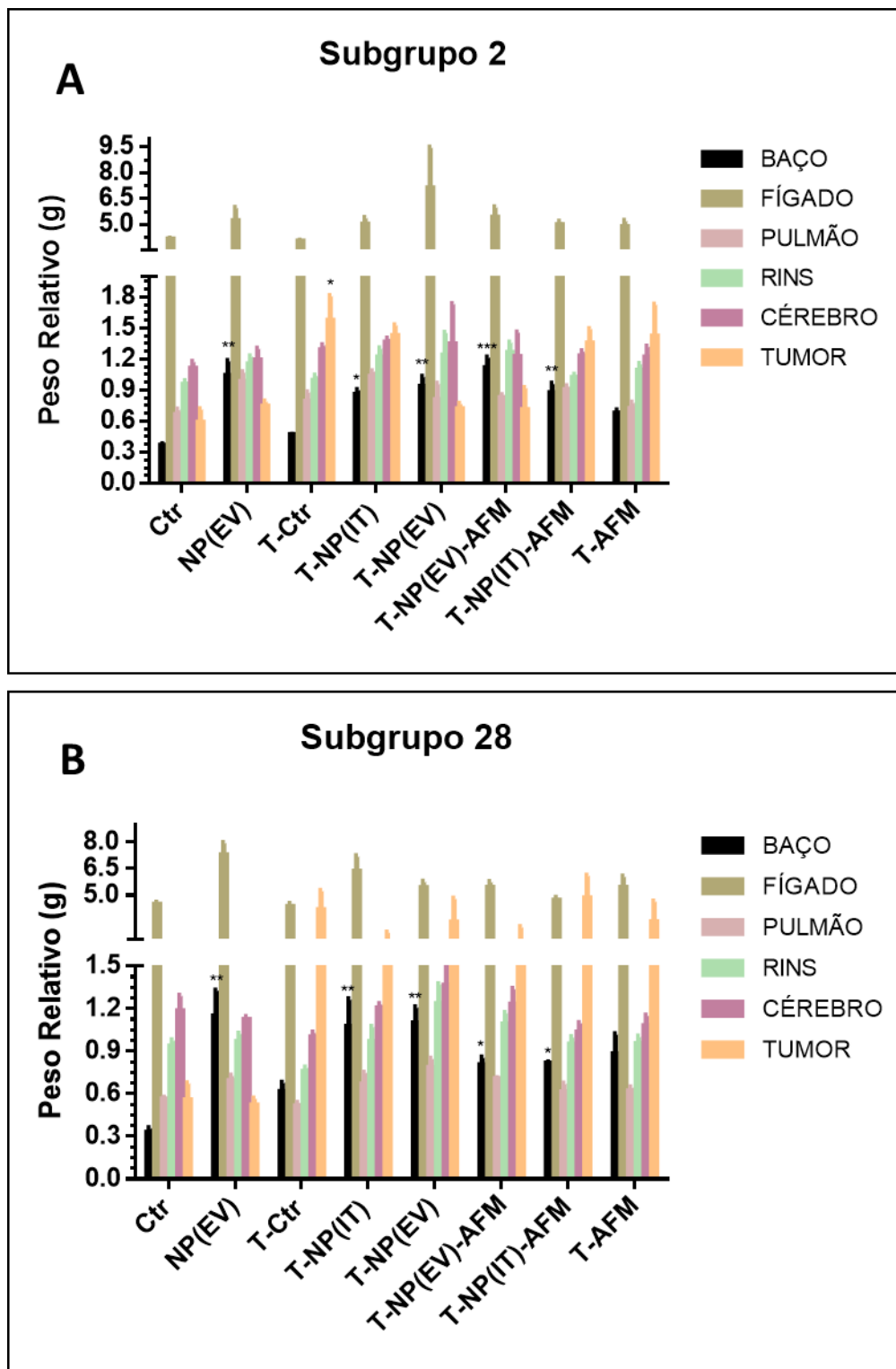


Figura 31 - Peso relativo do baço, fígado, pulmão, rins, cérebro e tumor no subgrupo 2 (A) e no subgrupo 28 (B) após as 5 administrações da NPM-HFn. Os valores de p do baço, pulmão, cérebro e rins no subgrupo 2 foram gerados usando one-way ANOVA com pós-teste Tukey, enquanto que os demais valores foram gerados utilizando o teste Kruskal-Wallis. Enquanto o valor de p dos rins no subgrupo 28 foram gerados usando one-way ANOVA com pós-teste Tukey, os demais valores foram gerados utilizando o teste Kruskal-Wallis. * significa $p < 0,05$; ** significa $p < 0,01$; *** significa $p < 0,001$.

Na análise histopatológica, no subgrupo 2, foram detectadas micrometástases no linfonodo subilíaco direito nos grupos controle tumor, nos que receberam a NPM-HFn por via intratumoral e endovenosa e no grupo que recebeu a NPM-HFn por via intratumoral seguido de exposição ao CMA. Já no subgrupo 28, foram observadas micrometástases nos grupos controle tumor, grupos que receberam a NPM-HFn por via intratumoral e endovenosa, no grupo que recebeu a NPM-HFn por via intratumoral e foi exposto ao CMA e no grupo somente exposto ao CMA. Não foram observadas micrometástases no grupo tratado com NPM-HFn por via endovenosa e a seguir exposto ao CMA, tanto no subgrupo 2 como no subgrupo 28 (Figura 37).

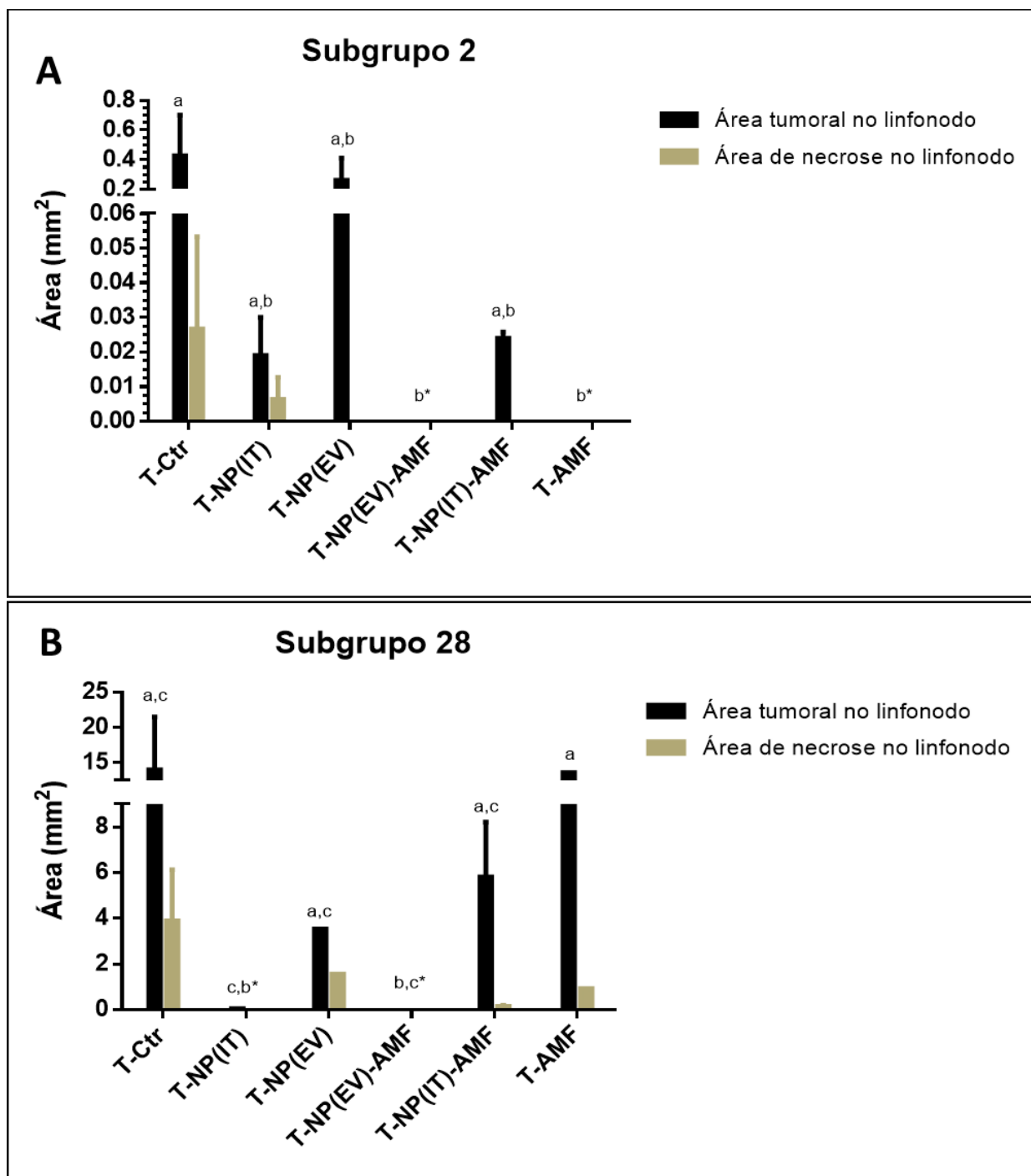


Figura 32 – Necrose e comprometimento do linfonodo subilíaco direito por micrometástase após as 5 administrações da NPM-HFn. T-Ctr: Camundongos com tumor que receberam a administração intratumoral de soro fisiológico 0,9%; T-NP(IT): Camundongos com tumor que receberam a administração intratumoral da NPM-HFn; T-NP(EV): Camundongos com tumor que receberam a administração endovenosa da NPM-HFn; T-AMF: Camundongos com tumor que receberam a administração intratumoral de soro fisiológico 0,9% e foram expostos ao campo magnético alternado; T-NP(IT)-AMF: Camundongos com tumor que receberam a administração intratumoral da NPM-HFn e foram expostos ao campo magnético alternado; T-NP(EV)-AMF: Camundongos com tumor que receberam a administração endovenosa da NPM-HFn e foram expostos ao campo magnético alternado.

5.3.6. ANÁLISE DE BIODISTRIBUIÇÃO

A coloração de Perls das lâminas histológicas permitiu a identificação do ferro em vários cortes histológicos (Tabela 11).

No subgrupo 2 foi observado aumento de ferro nos seguintes órgãos e grupos: no baço nos grupos onde foi administrado a NPM-HFn por via endovenosa; no fígado, apenas nos grupos T-Ctr, T-NP(EV) e T-NP(EV)-AFM; no pulmão aumento discreto nos grupos com tumor que receberam a administração endovenosa; nos rins nos grupos T-NP(IT); no linfonodo em todos os grupos que receberam a NPM-HFn. Somente os grupos que receberam a NPM-HFn por via intratumoral apresentaram um grande aumento de ferro no tumor. Também foi observado ligeiro aumento no grupo T-NP(EV)-AFM. No cérebro não foi observada nenhuma diferença (Figura 38 e 39).

Tabela 10 – Presença de ferro observada na análise por Perls no subgrupo de 2 dias após as 5 administrações da NPM-HFn. Ausência de ferro (-), pouco ferro (+), concentração de ferro mediana (++) , muito ferro (+++).

Subgrupo 2	BAÇO	FÍGADO	PULMÃO	CÉREBRO	RINS	LINFONO DO	MAMA/ TUMOR
Ctr	++	+	+	+	+	+	+
NP(EV)	++	+	+	+	+	++	+
T-Ctr	++	+	+	+	+	+	++
T-NP(IT)	++	+	+	+	++	++	+++
T-NP(EV)	++	++	+	+	+	++	+
T-NP(EV)-AFM	+++	+++	++	+	+	++	++
T-NP(IT)-AFM	++	+	+	+	+	++	+++
T-AFM	++	+	-	+	+	+	+

Ctr: Camundongos sem tumor que receberam administração endovenosa de soro fisiológico 0,9%; NP(EV): Camundongos sem tumor que receberam a administração endovenosa da NPM-HFn; T-Ctr: Camundongos com tumor que receberam a administração intratumoral de soro fisiológico 0,9%; T-NP(IT): Camundongos com tumor que receberam a administração intratumoral da NPM-HFn; T-NP(EV): Camundongos com tumor que receberam a administração endovenosa da NPM-HFn; T-AFM: Camundongos com tumor que receberam a administração intratumoral de soro fisiológico 0,9% e foram expostos ao campo magnético alternado; T-NP(IT)-AFM: Camundongos com tumor que receberam a administração intratumoral da NPM-HFn e foram expostos ao campo magnético alternado; T-NP(EV)-AFM: Camundongos com tumor que receberam a administração endovenosa da NPM-HFn e foram expostos ao campo magnético alternado.

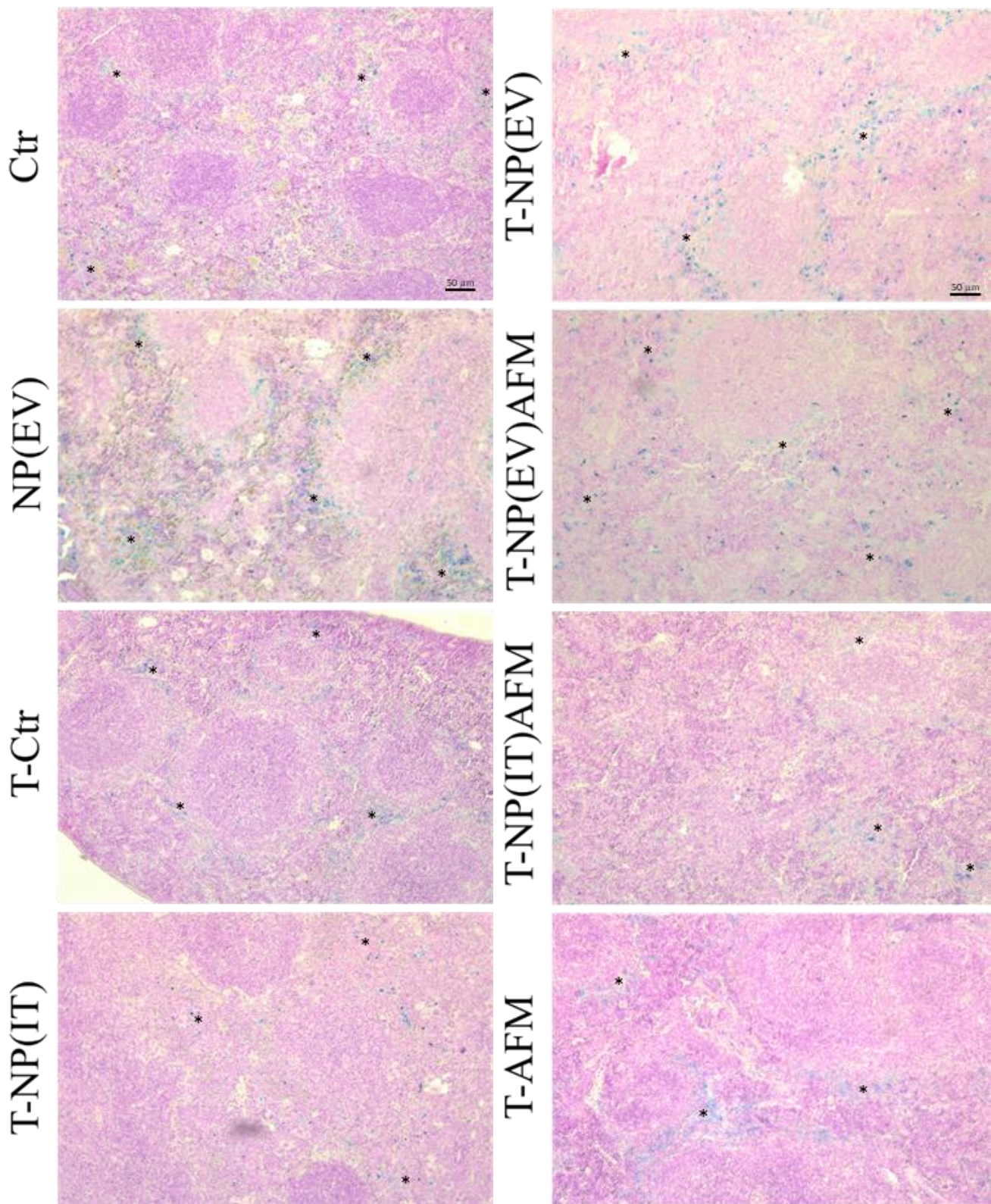


Figura 33 - Fotomicrografia de cortes histológicos do baço de camundongos Swiss após as 5 administrações da NPM-HFn corados por Perls do subgrupo 2. Ctr: Camundongos sem tumor que receberam administração endovenosa de soro fisiológico 0,9%; NP(EV): Camundongos sem tumor que receberam a administração endovenosa da NPM-HFn; T-Ctr: Camundongos com tumor que receberam a administração intratumoral de soro fisiológico 0,9%; T-NP(IT): Camundongos com tumor que receberam a administração intratumoral da NPM-HFn; T-NP(EV): Camundongos com tumor que receberam a administração endovenosa da NPM-HFn; T-AFM: Camundongos com tumor que receberam a administração intratumoral de soro fisiológico 0,9% e foram expostos ao campo magnético alternado; T-NP(IT)-AFM: Camundongos com tumor que receberam a administração intratumoral da NPM-HFn e foram expostos ao campo magnético alternado; T-NP(EV)-AFM: Camundongos com tumor que receberam a administração endovenosa da NPM-HFn e foram expostos ao campo magnético alternado. (*) indica ferro (PERLS 100x).

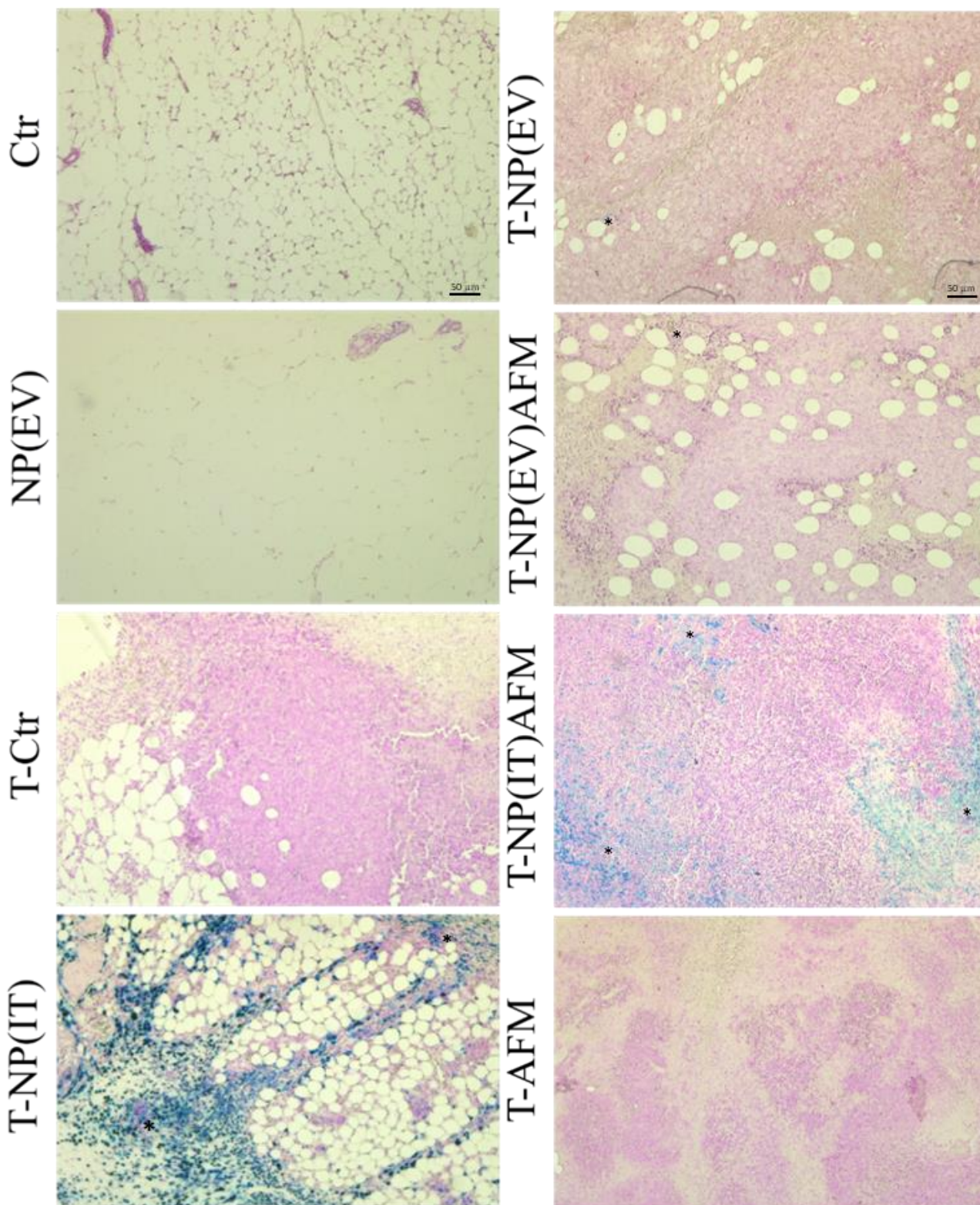


Figura 34 - Fotomicrografia de cortes histológicos da mama/tumor de camundongos Swiss após as 5 administrações da NPM-HFn corados por Perls do subgrupo 2. Ctr: Camundongos sem tumor que receberam administração endovenosa de soro fisiológico 0,9%; NP(EV): Camundongos sem tumor que receberam a administração endovenosa da NPM-HFn; T-Ctr: Camundongos com tumor que receberam a administração intratumoral de soro fisiológico 0,9%; T-NP(IT): Camundongos com tumor que receberam a administração intratumoral da NPM-HFn; T-NP(EV): Camundongos com tumor que receberam a administração endovenosa da NPM-HFn; T-AFM: Camundongos com tumor que receberam a administração intratumoral de soro fisiológico 0,9% e foram expostos ao campo magnético alternado; T-NP(IT)-AFM: Camundongos com tumor que receberam a administração intratumoral da NPM-HFn e foram expostos ao campo magnético alternado; T-NP(EV)-AFM: Camundongos com tumor que receberam a administração endovenosa da NPM-HFn e foram expostos ao campo magnético alternado. (*) indica ferro (PERLS 100x).

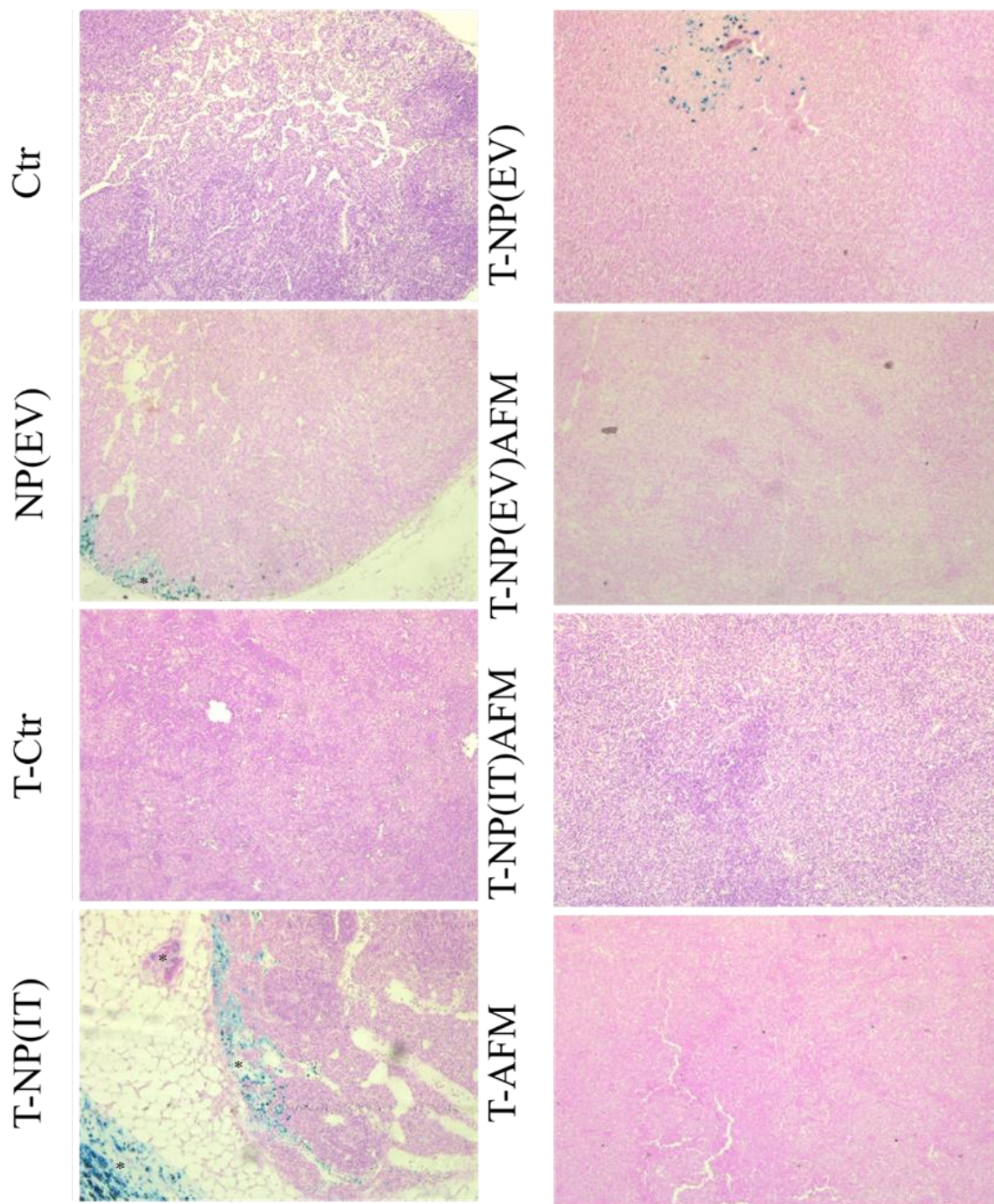


Figura 35 - Fotomicrografia de cortes histológicos do linfonodo de camundongos Swiss após as 5 administrações da NPM-HFn corados por Perls do subgrupo 2. Ctr: Camundongos sem tumor que receberam administração endovenosa de soro fisiológico 0,9%; NP(EV): Camundongos sem tumor que receberam a administração endovenosa da NPM-HFn; T-Ctr: Camundongos com tumor que receberam a administração intratumoral de soro fisiológico 0,9%; T-NP(IT): Camundongos com tumor que receberam a administração intratumoral da NPM-HFn; T-NP(EV): Camundongos com tumor que receberam a administração endovenosa da NPM-HFn; T-AFM: Camundongos com tumor que receberam a administração intratumoral de soro fisiológico 0,9% e foram expostos ao campo magnético alternado; T-NP(IT)-AFM: Camundongos com tumor que receberam a administração intratumoral da NPM-HFn e foram expostos ao campo magnético alternado; T-NP(EV)-AFM: Camundongos com tumor que receberam a administração endovenosa da NPM-HFn e foram expostos ao campo magnético alternado. (*) indica ferro (PERLS 100x).

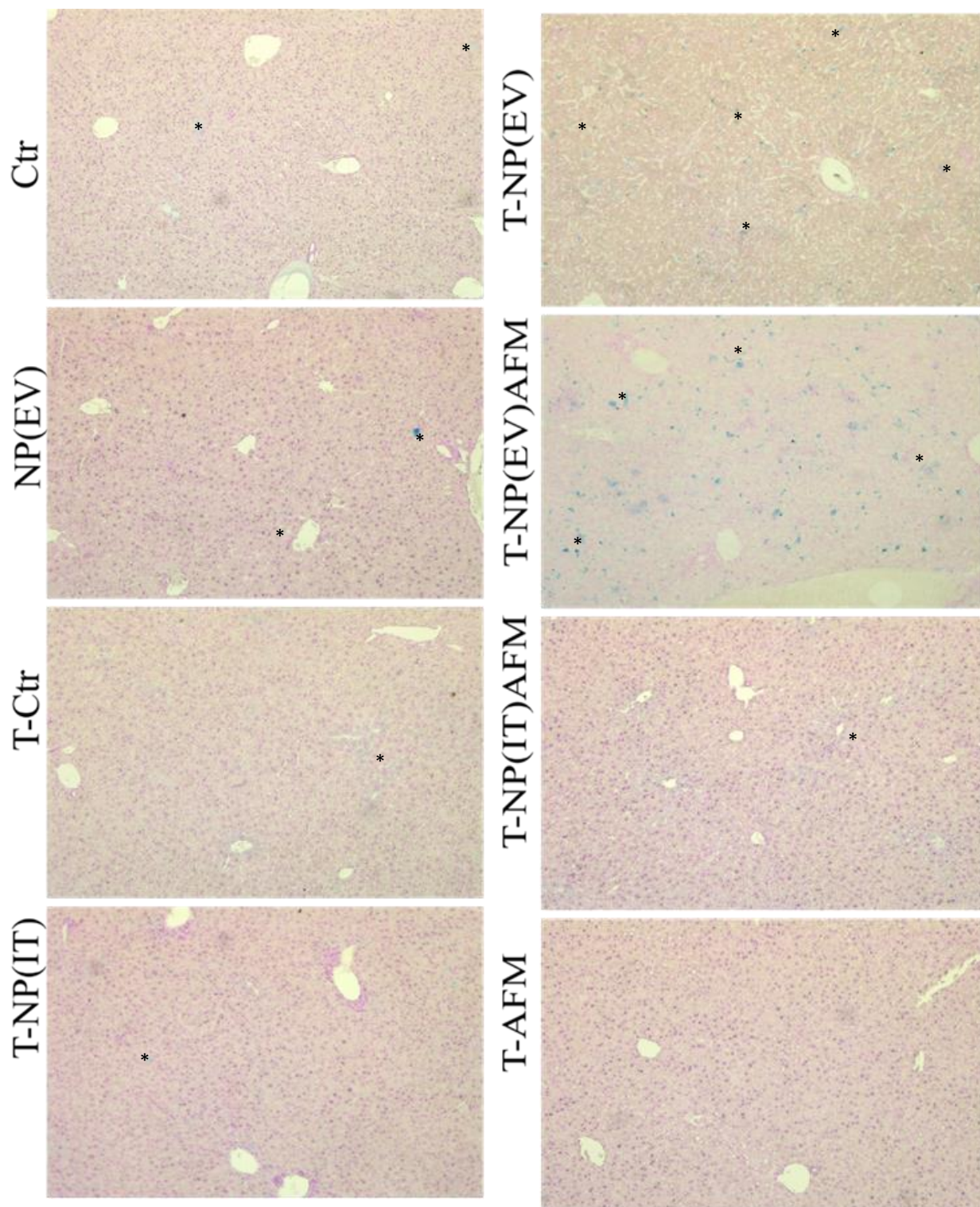


Figura 36 - Fotomicrografia de cortes histológicos do fígado de camundongos Swiss após as 5 administrações da NPM-HFn corados por Perls do subgrupo 2. Ctr: Camundongos sem tumor que receberam administração endovenosa de soro fisiológico 0,9%; NP(EV): Camundongos sem tumor que receberam a administração endovenosa da NPM-HFn; T-Ctr: Camundongos com tumor que receberam a administração intratumoral de soro fisiológico 0,9%; T-NP(IT): Camundongos com tumor que receberam a administração intratumoral da NPM-HFn; T-NP(EV): Camundongos com tumor que receberam a administração endovenosa da NPM-HFn; T-AFM: Camundongos com tumor que receberam a administração intratumoral de soro fisiológico 0,9% e foram expostos ao campo magnético alternado; T-NP(IT)-AFM: Camundongos com tumor que receberam a administração intratumoral da NPM-HFn e foram expostos ao campo magnético alternado; T-NP(EV)-AFM: Camundongos com tumor que receberam a administração endovenosa da NPM-HFn e foram expostos ao campo magnético alternado. (*) indica ferro (PERLS 100x).

No subgrupo 28 (Tabela 12) a concentração de ferro continuou aumentada nos seguintes órgãos e grupos: no baço do grupo onde foi administrado a NPM-HFn por via endovenosa e exposta ao CMA e no grupo controle tumor; no fígado somente nos grupos NP(EV), T-NP(EV) e T-NP(EV)-AFM; no pulmão ligeiro aumento nos grupos com tumor; no linfonodo nos grupos NP(EV), T-NP(IT) e T-NP(IT)-AFM. Como no subgrupo 2, os grupos que receberam a NPM-HFn por via intratumoral apresentaram um grande aumento de ferro no tumor. No cérebro não foi observada nenhuma diferença, já no rim foi observado um leve aumento nos grupos T-NP(IT) e T-NP(EV)-AFM (Figura 43 a 46).

Tabela 11 - Presença de ferro observada na análise por Perls no subgrupo de 28 dias após as 5 administrações da NPM-HFn. Ausência de ferro (-), pouco ferro (+), concentração de ferro mediana (++) , muito ferro (+++).

Subgrupo 28	BAÇO	FÍGADO	PULMÃO	CÉREBRO	RINS	LINFONODO	MAMA/ TUMOR
Ctr	++	+	+	+	+	+	+
NP(EV)	++	++	+	+	+	++	+
T-Ctr	+++	+	+	+	+	+	+
T-NP(IT)	++	+	+	+	++	++	+++
T-NP(EV)	+++	++	+	+	+	+	+
T-NP(EV)-AFM	++	++	+	+	++	+	+
T-NP(IT)-AFM	++	+	+	+	+	++	+++
T-AFM	+	+	+	+	+	+	+

T-Ctr: Camundongos com tumor que receberam a administração intratumoral de soro fisiológico 0,9%; T-NP(IT): Camundongos com tumor que receberam a administração intratumoral da NPM-HFn; T-NP(EV): Camundongos com tumor que receberam a administração endovenosa da NPM-HFn; T-AFM: Camundongos com tumor que receberam a administração intratumoral de soro fisiológico 0,9% e foram expostos ao campo magnético alternado; T-NP(IT)-AFM: Camundongos com tumor que receberam a administração intratumoral da NPM-HFn e foram expostos ao campo magnético alternado; T-NP(EV)-AFM: Camundongos com tumor que receberam a administração endovenosa da NPM-HFn e foram expostos ao campo magnético alternado.

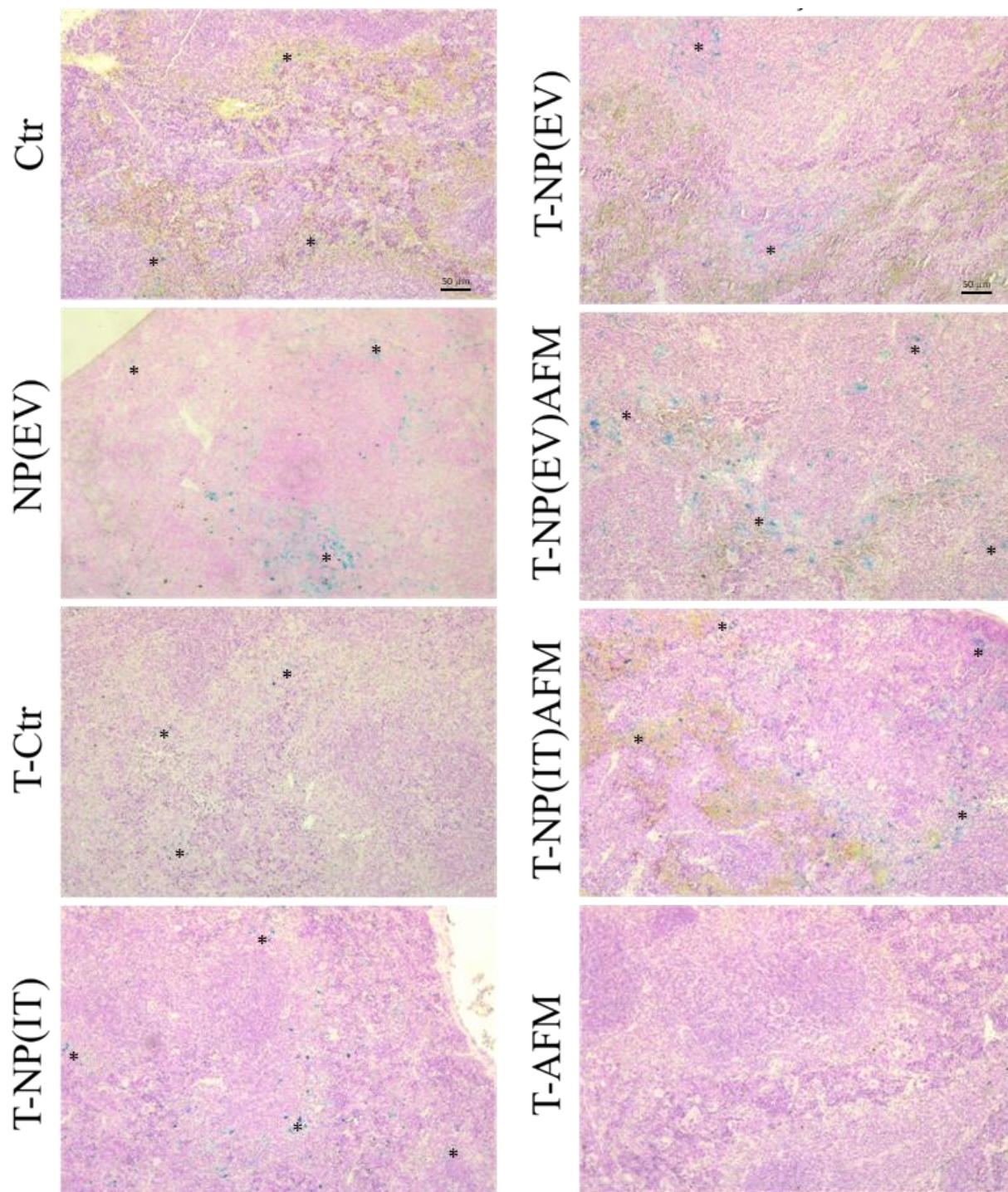


Figura 37 - Fotomicrografia de cortes histológicos do baço de camundongos Swiss após as 5 administrações da NPM-HFn corados por Perls do subgrupo 28. Ctr: Camundongos sem tumor que receberam administração endovenosa de soro fisiológico 0,9%; NP(EV): Camundongos sem tumor que receberam a administração endovenosa da NPM-HFn; T-Ctr: Camundongos com tumor que receberam a administração intratumoral de soro fisiológico 0,9%; T-NP(IT): Camundongos com tumor que receberam a administração intratumoral da NPM-HFn; T-NP(EV): Camundongos com tumor que receberam a administração endovenosa da NPM-HFn; T-AFM: Camundongos com tumor que receberam a administração intratumoral de soro fisiológico 0,9% e foram expostos ao campo magnético alternado; T-NP(IT)-AFM: Camundongos com tumor que receberam a administração intratumoral da NPM-HFn e foram expostos ao campo magnético alternado; T-NP(EV)-AFM: Camundongos com tumor que receberam a administração endovenosa da NPM-HFn e foram expostos ao campo magnético alternado (PERLS 100x).

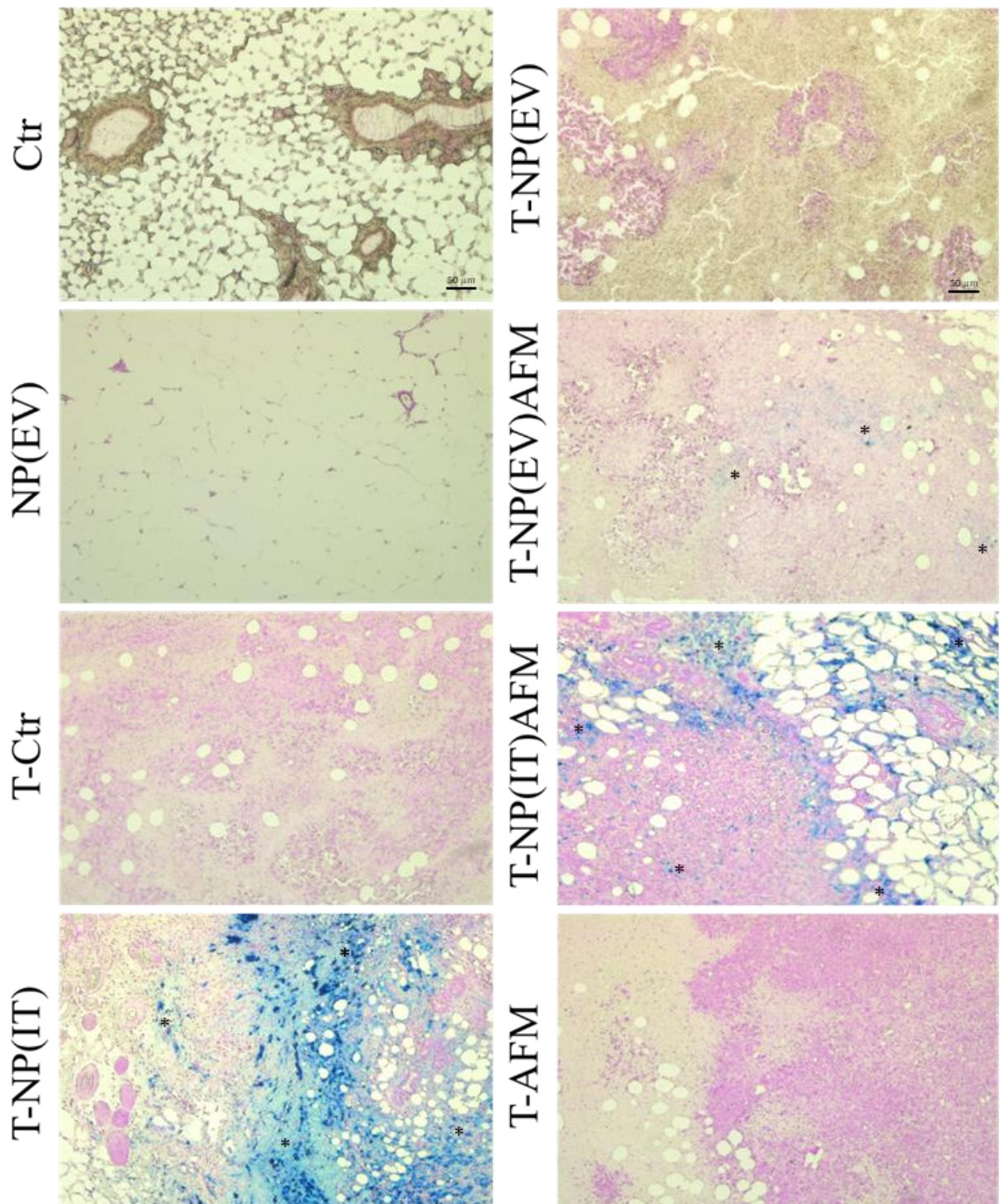


Figura 38 - Fotomicrografia de cortes histológicos da mama/tumor de camundongos Swiss após as 5 administrações da NPM-HFn corados por Perls do subgrupo 28. Ctr: Camundongos sem tumor que receberam administração endovenosa de soro fisiológico 0,9%; NP(EV): Camundongos sem tumor que receberam a administração endovenosa da NPM-HFn; T-Ctr: Camundongos com tumor que receberam a administração intratumoral de soro fisiológico 0,9%; T-NP(IT): Camundongos com tumor que receberam a administração intratumoral da NPM-HFn; T-NP(EV): Camundongos com tumor que receberam a administração endovenosa da NPM-HFn; T-AFM: Camundongos com tumor que receberam a administração intratumoral de soro fisiológico 0,9% e foram expostos ao campo magnético alternado; T-NP(IT)-AFM: Camundongos com tumor que receberam a administração intratumoral da NPM-HFn e foram expostos ao campo magnético alternado; T-NP(EV)-AFM: Camundongos com tumor que receberam a administração endovenosa da NPM-HFn e foram expostos ao campo magnético alternado (PERLS 100x).

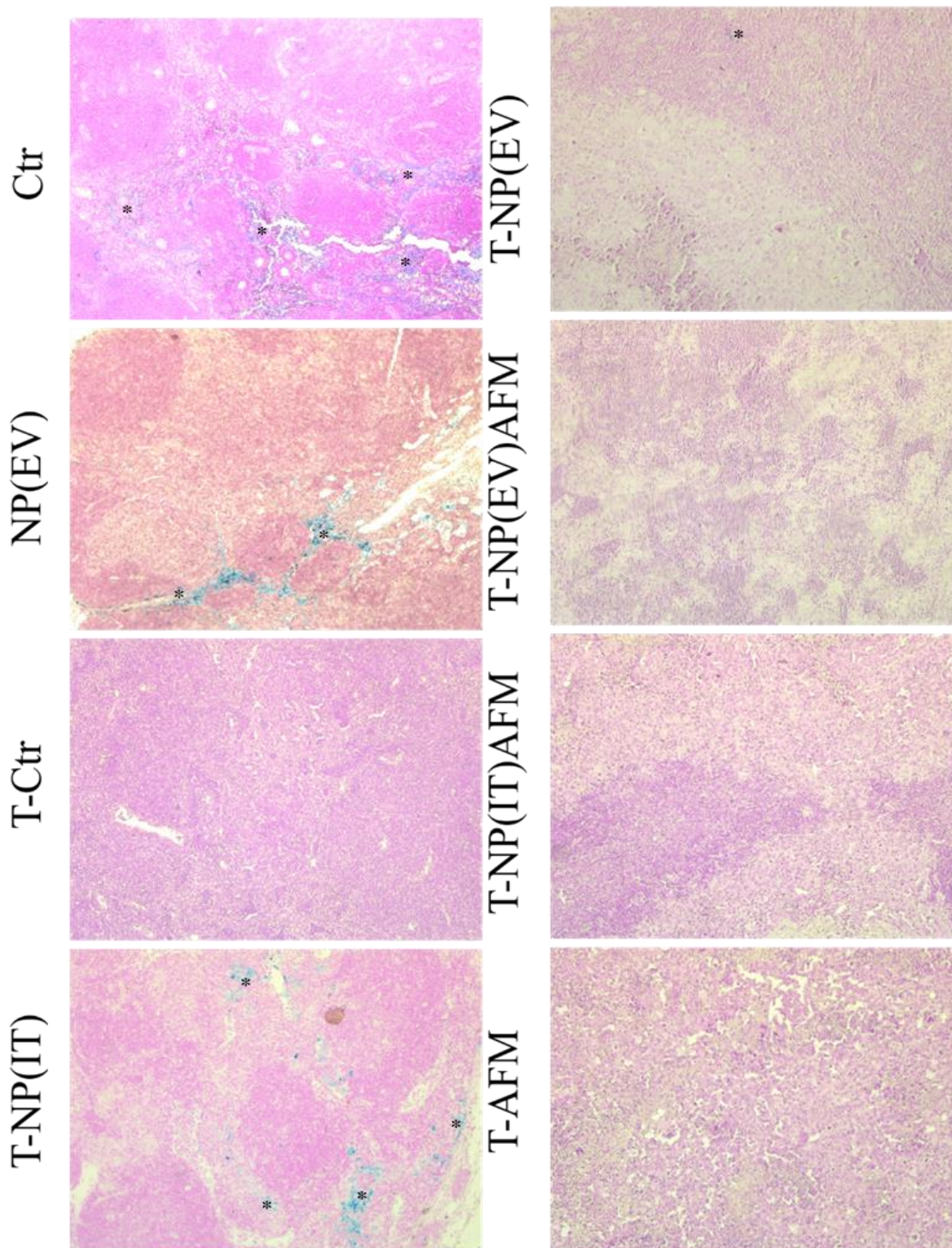


Figura 39 - Fotomicrografia de cortes histológicos da mama/tumor de camundongos Swiss após as 5 administrações da NPM-HFn corados por Perls do subgrupo 28. Ctr: Camundongos sem tumor que receberam administração endovenosa de soro fisiológico 0,9%; NP(EV): Camundongos sem tumor que receberam a administração endovenosa da NPM-HFn; T-Ctr: Camundongos com tumor que receberam a administração intratumoral de soro fisiológico 0,9%; T-NP(IT): Camundongos com tumor que receberam a administração intratumoral da NPM-HFn; T-NP(EV): Camundongos com tumor que receberam a administração endovenosa da NPM-HFn; T-AFM: Camundongos com tumor que receberam a administração intratumoral de soro fisiológico 0,9% e foram expostos ao campo magnético alternado; T-NP(IT)-AFM: Camundongos com tumor que receberam a administração intratumoral da NPM-HFn e foram expostos ao campo magnético alternado; T-NP(EV)-AFM: Camundongos com tumor que receberam a administração endovenosa da NPM-HFn e foram expostos ao campo magnético alternado (PERLS 100x).

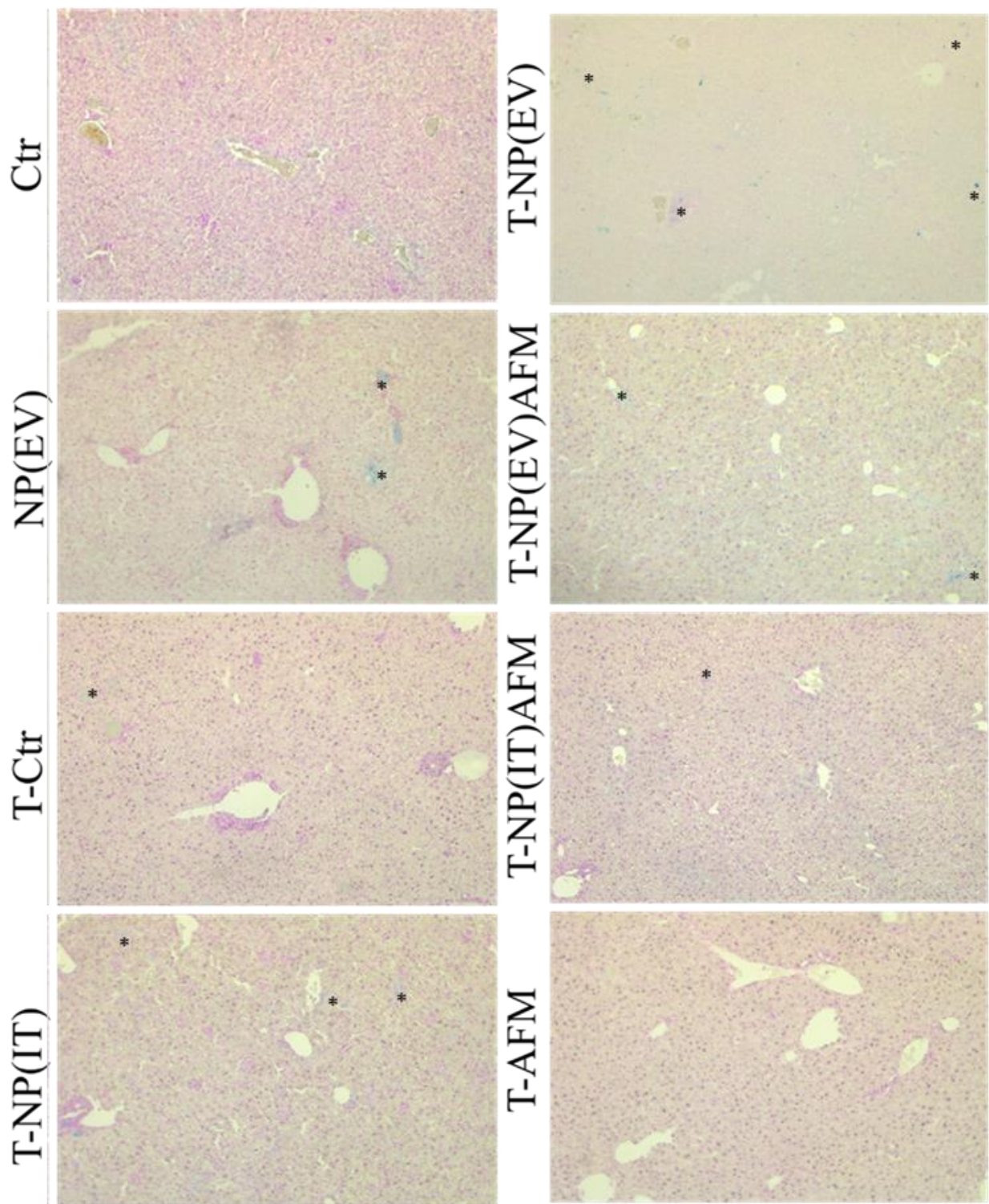


Figura 40 - Fotomicrografia de cortes histológicos do fígado de camundongos Swiss após as 5 administrações da NPM-HFn corados por Perls do subgrupo 28. Ctr: Camundongos sem tumor que receberam administração endovenosa de soro fisiológico 0,9%; NP(EV): Camundongos sem tumor que receberam a administração endovenosa da NPM-HFn; T-Ctr: Camundongos com tumor que receberam a administração intratumoral de soro fisiológico 0,9%; T-NP(IT): Camundongos com tumor que receberam a administração intratumoral da NPM-HFn; T-NP(EV): Camundongos com tumor que receberam a administração endovenosa da NPM-HFn; T-AFM: Camundongos com tumor que receberam a administração intratumoral de soro fisiológico 0,9% e foram expostos ao campo magnético alternado; T-NP(IT)-AFM: Camundongos com tumor que receberam a administração intratumoral da NPM-HFn e foram expostos ao campo magnético alternado; T-NP(EV)-AFM: Camundongos com tumor que receberam a administração endovenosa da NPM-HFn e foram expostos ao campo magnético alternado (PERLS 100x).

5.3.7. ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA

Analisando as lâminas do baço foi detectado que o tratamento com a administração da NPM-HFn por via endovenosa e exposição ao CMA causou hemossiderose nos animais do subgrupo 2 e no subgrupo 28 (Figura 46).

Nas lâminas do cérebro não foi notada nenhuma alteração significativa nos grupos que receberam a administração da NPM-HFn (Figura 47).

Nas lâminas do fígado não foram observados casos de esteatose e necrose em nenhum dos animais. Por outro lado, degeneração hidrópica e hematopoiese foram observadas em todos os animais, incluindo os animais controle saudáveis e, portanto, não foram consideradas como indicador de toxicidade. Ainda no fígado, o tratamento com a NPM-HFn via endovenosa e exposição ao CMA causou hemossiderose, congestão e inflamação no subgrupo 2 (Figura 48).

Nas lâminas do linfonodo foi detectado que o tratamento com NPM-HFn por via endovenosa em animais saudáveis causou hemossiderose apenas no subgrupo 2 (Figura 49).

Nas lâminas do pulmão foram observadas congestão, hemorragia e inflamação crônica em todos os animais, não sendo, portanto, considerado indicador de toxicidade (Figura 50).

Nas lâminas do rim, não foram detectadas alterações relacionadas à congestão dos vasos sanguíneos, degeneração tubular, alterações glomerulares, hemorragia ou áreas de necrose. Entretanto, em todos os grupos com implantação tumoral alguns animais apresentaram pielonefrite crônica discreta (Figura 51).

Em todas as lâminas do tumor analisadas foi observada a presença de necrose associada a área tumoral (Figura 52).

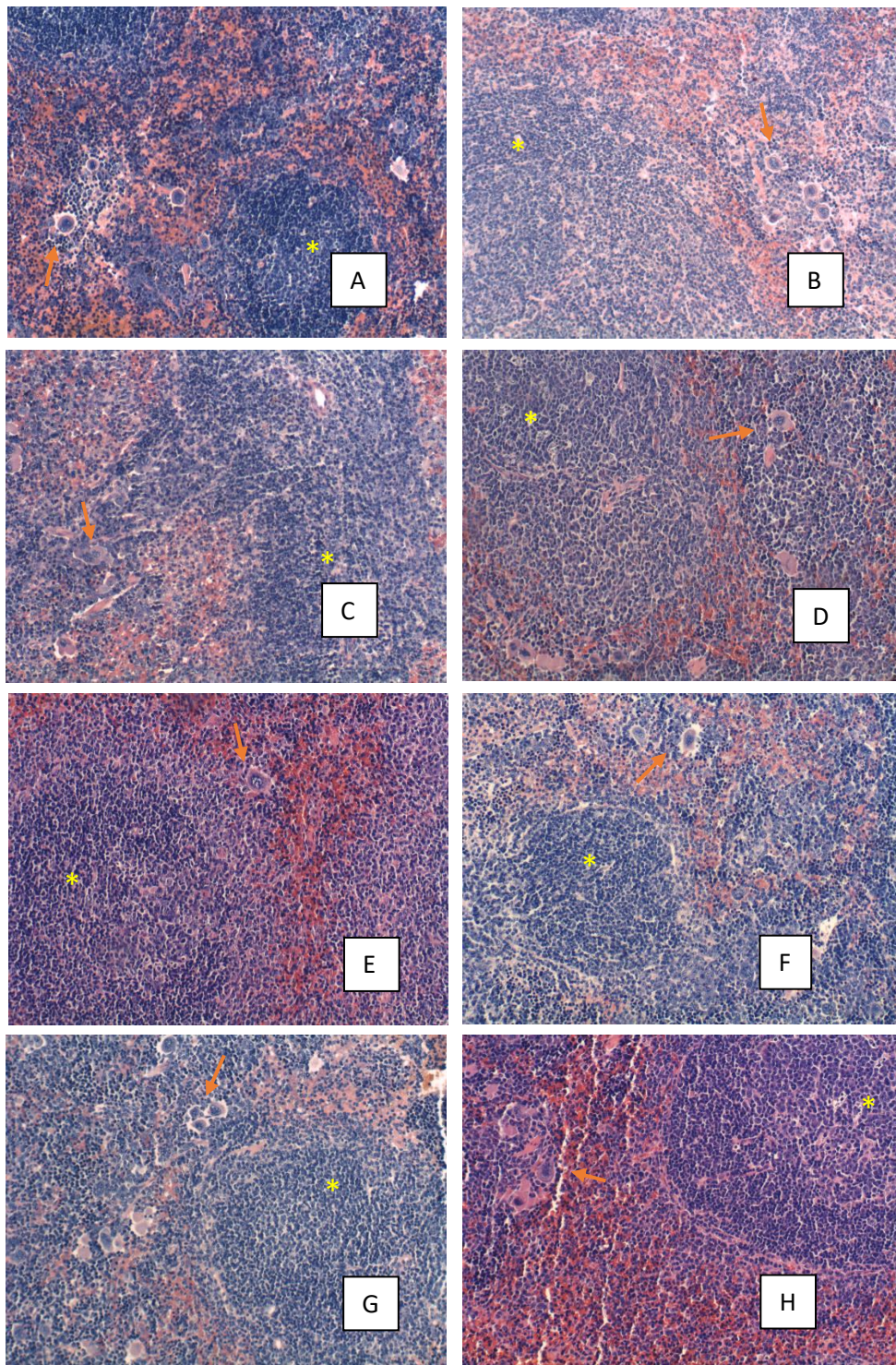


Figura 41 - Fotomicrografia do baço em Ctr (A), NP(EV) (B), T-Ctr (C) T-NP(IT) (D), T-NP(EV)AFM (E), T-NP(IT)AFM (F), T-AFM (G) e T-NP(EV) (H). Hiperplasia linfoide (*) e hematopoiese (seta laranja). A, B, C, D, E, F, G e H Ctr: Camundongos sem tumor que receberam administração endovenosa de soro fisiológico 0,9%; NP(EV): Camundongos sem tumor que receberam a administração endovenosa da NPM-HFn; T-Ctr: Camundongos com tumor que receberam a administração intratumoral de soro fisiológico 0,9%; T-NP(IT): Camundongos com tumor que receberam a administração intratumoral da NPM-HFn; T-NP(EV): Camundongos com tumor que receberam a administração endovenosa da NPM-HFn; T-AFM: Camundongos com tumor que receberam a administração intratumoral de soro fisiológico 0,9% e foram expostos ao campo magnético alternado; T-NP(IT)-AFM: Camundongos com tumor que receberam a administração intratumoral da NPM-HFn e foram expostos ao campo magnético alternado; T-NP(EV)-AFM: Camundongos com tumor que receberam a administração endovenosa da NPM-HFn e foram expostos ao campo magnético alternado (HE, 100X);

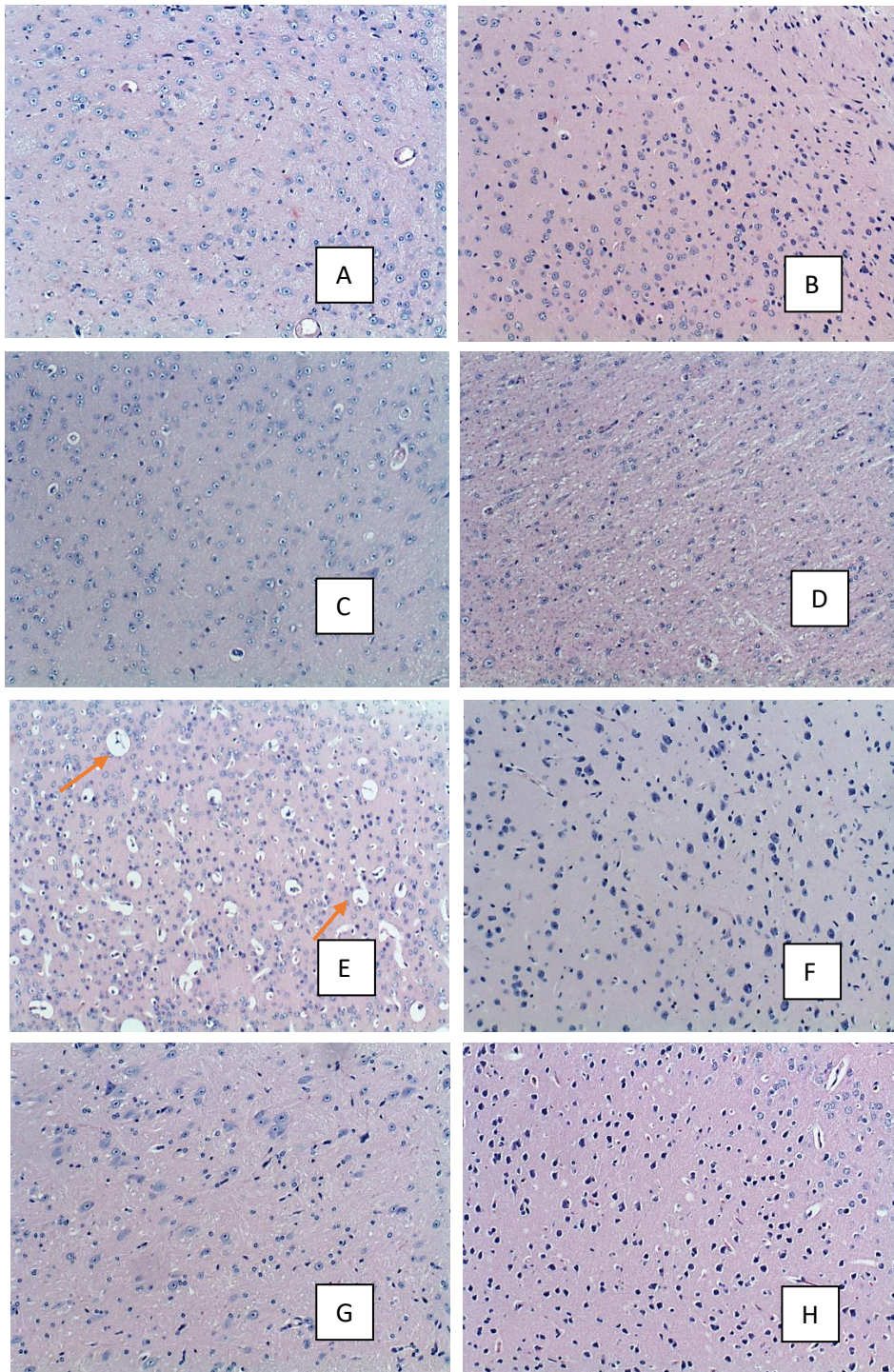


Figura 42 - Fotomicrografia do cérebro em Ctr (A), NP(EV) (B), T-Ctr (C) T-NP(IT) (D), T-NP(EV)AFM (E), T-NP(IT)AFM (F), T-AFM (G) e T-NP(EV) (H). Congestão e edema perivascular (seta laranja) em T-NP(EV)AFM (E). A, B, C, D, E, F, G e H Ctr: Camundongos sem tumor que receberam administração endovenosa de soro fisiológico 0,9%; NP(EV): Camundongos sem tumor que receberam a administração endovenosa da NPM-HFn; T-Ctr: Camundongos com tumor que receberam a administração intratumoral de soro fisiológico 0,9%; T-NP(IT): Camundongos com tumor que receberam a administração intratumoral da NPM-HFn; T-NP(EV): Camundongos com tumor que receberam a administração endovenosa da NPM-HFn; T-AFM: Camundongos com tumor que receberam a administração intratumoral de soro fisiológico 0,9% e foram expostos ao campo magnético alternado; T-NP(IT)-AFM: Camundongos com tumor que receberam a administração intratumoral da NPM-HFn e foram expostos ao campo magnético alternado; T-NP(EV)-AFM: Camundongos com tumor que receberam a administração endovenosa da NPM-HFn e foram expostos ao campo magnético alternado (HE, 100X);

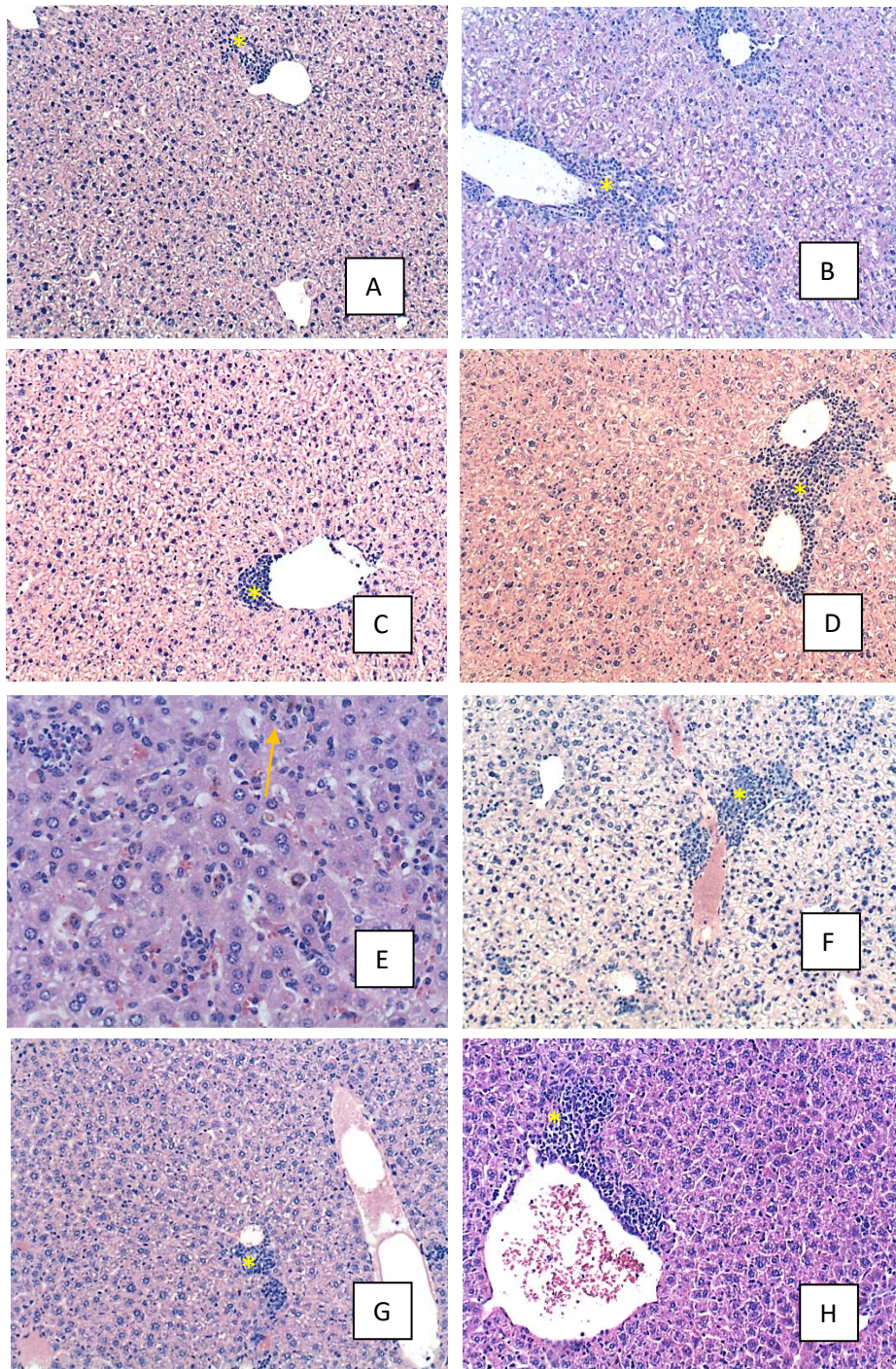


Figura 43 - Fotomicrografia do fígado. Hematopoiese (*) em Ctr (A), NP(EV) (B), T-Ctr (C) T-NP(IT) (D), T-NP(EV)AFM (E), T-NP(IT)AFM (F), T-AFM (G) e T-NP(EV) (H). Inflamação aguda (seta laranja) em T-NP(EV)AFM (E). A, B, C, D, F, G e H (HE, 100X); E Ctr: Camundongos sem tumor que receberam administração endovenosa de soro fisiológico 0,9%; NP(EV): Camundongos sem tumor que receberam a administração endovenosa da NPM-HFn; T-Ctr: Camundongos com tumor que receberam a administração intratumoral de soro fisiológico 0,9%; T-NP(IT): Camundongos com tumor que receberam a administração intratumoral da NPM-HFn; T-NP(EV): Camundongos com tumor que receberam a administração endovenosa da NPM-HFn; T-AFM: Camundongos com tumor que receberam a administração intratumoral de soro fisiológico 0,9% e foram expostos ao campo magnético alternado; T-NP(IT)-AFM: Camundongos com tumor que receberam a administração intratumoral da NPM-HFn e foram expostos ao campo magnético alternado; T-NP(EV)-AFM: Camundongos com tumor que receberam a administração endovenosa da NPM-HFn e foram expostos ao campo magnético alternado (HE, 200X).

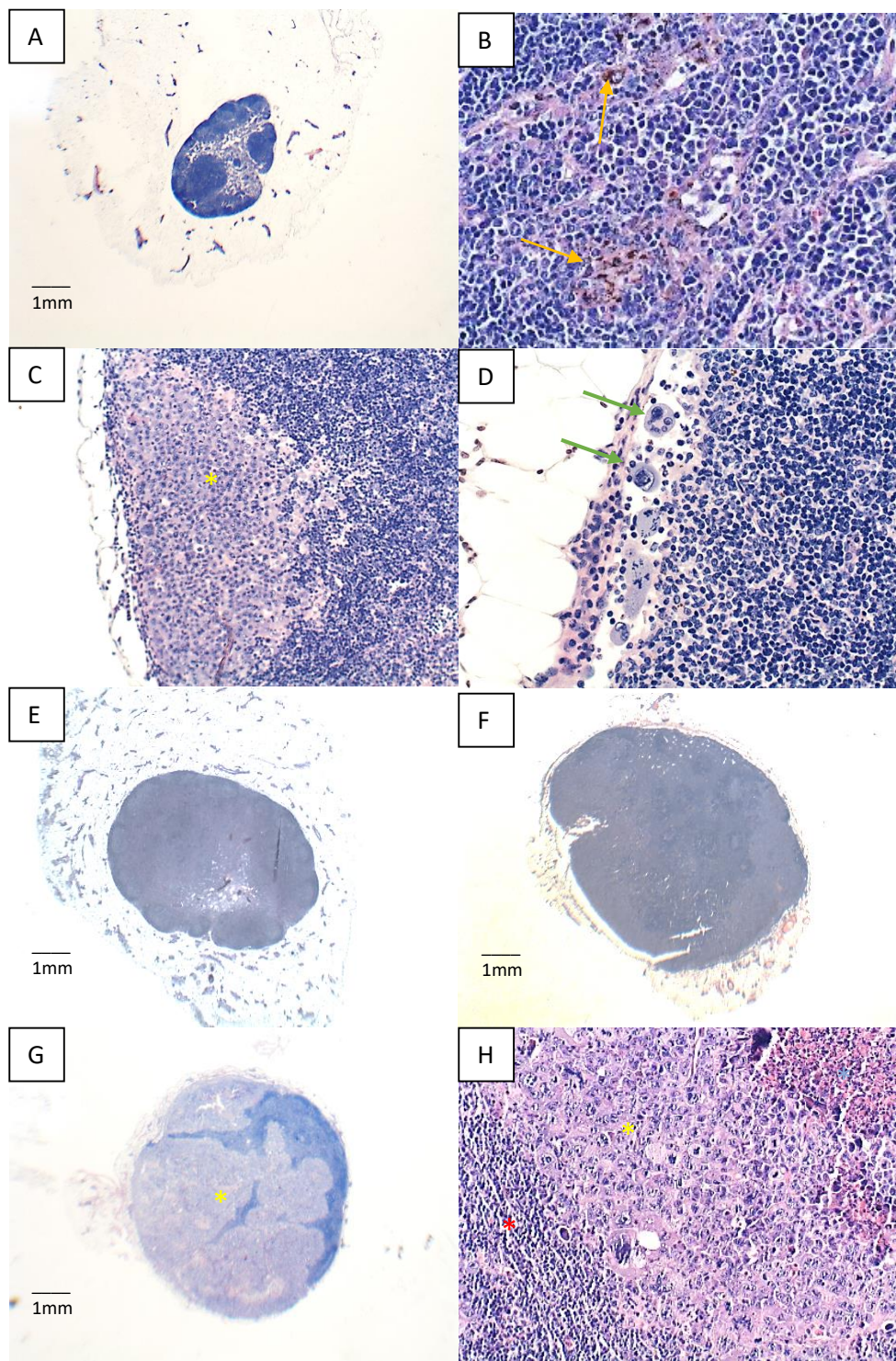


Figura 44 - Fotomicrografia do linfonodo em Ctr (A), NP(EV) (B), T-Ctr (C) T-NP(IT) (D), T-NP(EV)AFM (E), T-NP(IT)AFM (F), T-AFM (G) e T-NP(EV) (H). Mestástase (*) em T-Ctr, T-AFM e T-NP(EV). Hemossiderose. Micrometástase, células isoladas (seta verde) em G3. * tecido linfoide, * necrose. B, e D (HE, 200X); C e H Ctr: Camundongos sem tumor que receberam administração endovenosa de soro fisiológico 0,9%; NP(EV): Camundongos sem tumor que receberam a administração endovenosa da NPM-HFn; T-Ctr: Camundongos com tumor que receberam a administração intratumoral de soro fisiológico 0,9%; T-NP(IT): Camundongos com tumor que receberam a administração intratumoral da NPM-HFn; T-NP(EV): Camundongos com tumor que receberam a administração endovenosa da NPM-HFn; T-AFM: Camundongos com tumor que receberam a administração intratumoral de soro fisiológico 0,9% e foram expostos ao campo magnético alternado; T-NP(IT)-AFM: Camundongos com tumor que receberam a administração intratumoral da NPM-HFn e foram expostos ao campo magnético alternado; T-NP(EV)-AFM: Camundongos com tumor que receberam a administração endovenosa da NPM-HFn e foram expostos ao campo magnético alternado (HE, 100X).

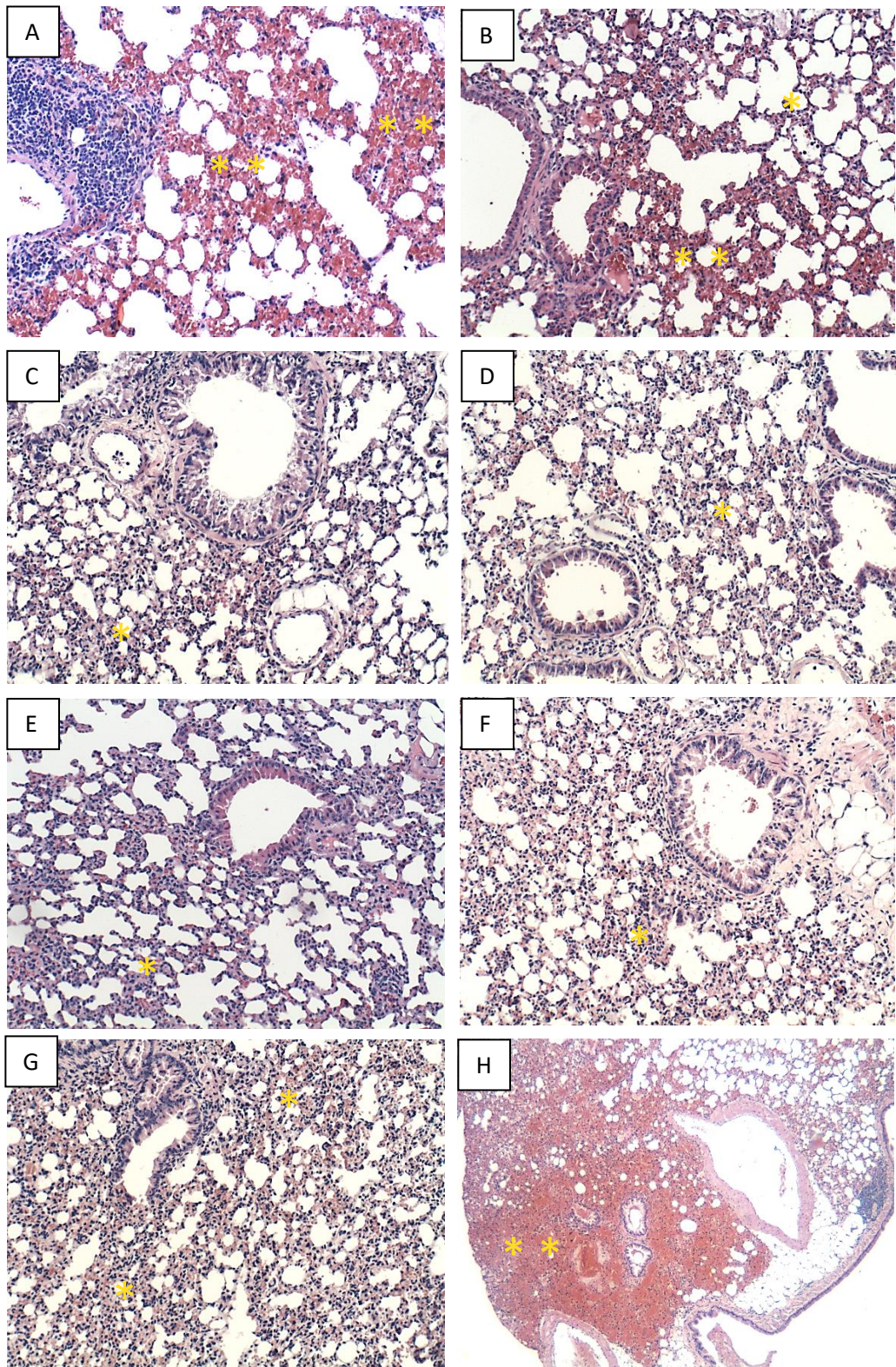


Figura 45 - Fotomicrografia do pulmão. Congestão (*) em Ctr (A), NP(EV) (B), T-Ctr (C) T-NP(IT) (D), T-NP(EV)AFM (E), T-NP(IT)AFM (F), T-AFM (G) e T-NP(EV) (H). Hemorragia (**) em Ctr (A), NP(EV) (B), e T-NP(EV) (H). Ctr: Camundongos sem tumor que receberam administração endovenosa de soro fisiológico 0,9%; NP(EV): Camundongos sem tumor que receberam a administração endovenosa da NPM-HFn; T-Ctr: Camundongos com tumor que receberam a administração intratumoral de soro fisiológico 0,9%; T-NP(IT): Camundongos com tumor que receberam a administração intratumoral da NPM-HFn; T-NP(EV): Camundongos com tumor que receberam a administração endovenosa da NPM-HFn; T-AFM: Camundongos com tumor que receberam a administração intratumoral de soro fisiológico 0,9% e foram expostos ao campo magnético alternado; T-NP(IT)-AFM: Camundongos com tumor que receberam a administração intratumoral da NPM-HFn e foram expostos ao campo magnético alternado; T-NP(EV)-AFM: Camundongos com tumor que receberam a administração endovenosa da NPM-HFn e foram expostos ao campo magnético alternado A, B, C, D, E, F e G (HE, 100X); H (HE, 25X).

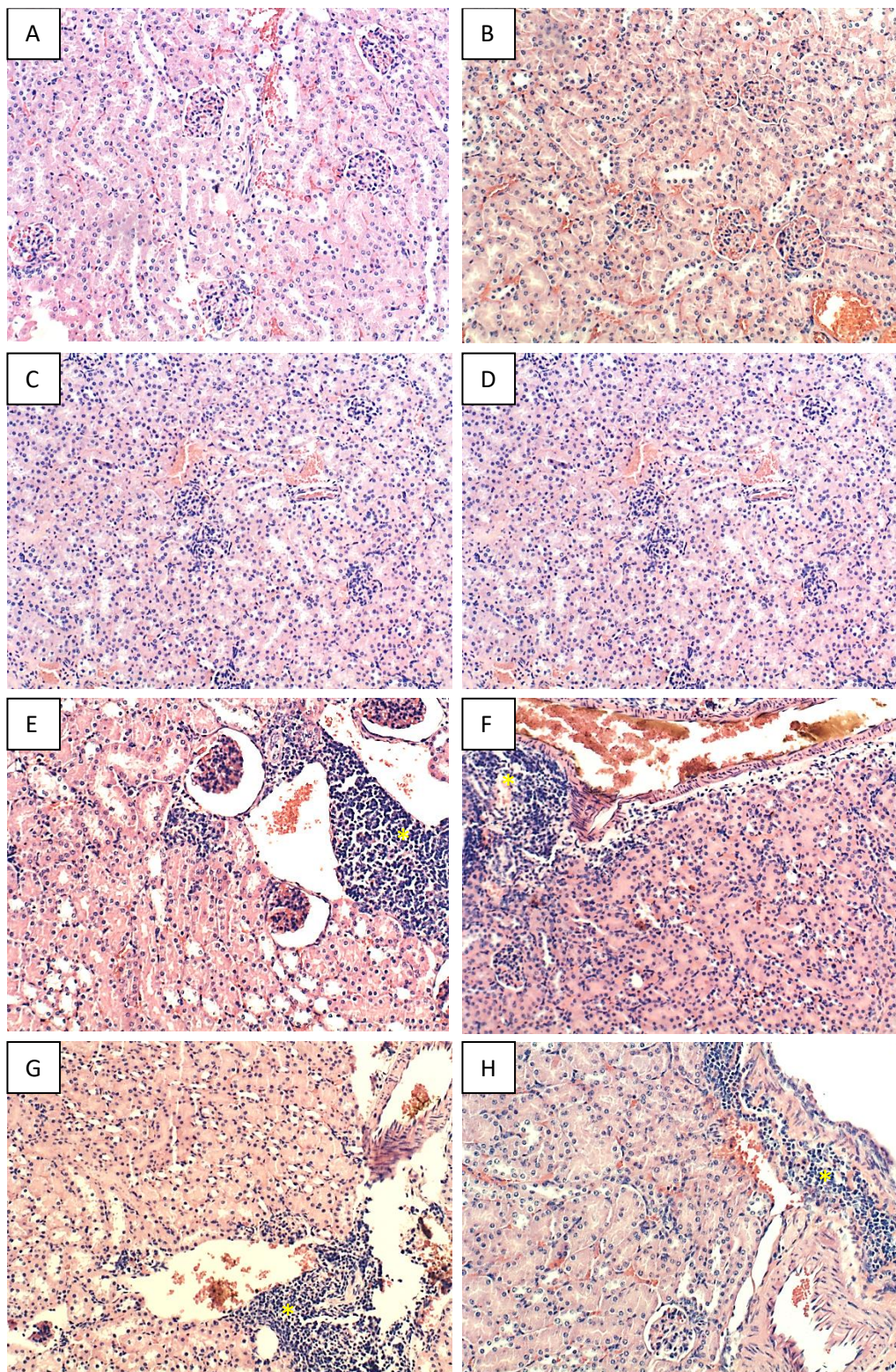


Figura 46 - Fotomicrografia do rim em Ctr (A), NP(EV) (B), T-Ctr (C) T-NP(IT) (D), T-NP(EV)AFM (E), T-NP(IT)AFM (F), T-AFM (G) e T-NP(EV) (H). Inflamação (*) em T-NP(EV)AFM (E), T-NP(IT)AFM (F), T-AFM (G) e T-NP(EV) (H). Ctr: Camundongos sem tumor que receberam administração endovenosa de soro fisiológico 0,9%; NP(EV): Camundongos sem tumor que receberam a administração endovenosa da NPM-HFn; T-Ctr: Camundongos com tumor que receberam a administração intratumoral de soro fisiológico 0,9%; T-NP(IT): Camundongos com tumor que receberam a administração intratumoral da NPM-HFn; T-NP(EV): Camundongos com tumor que receberam a administração endovenosa da NPM-HFn; T-AFM: Camundongos com tumor que receberam a administração intratumoral de soro fisiológico 0,9% e foram expostos ao campo magnético alternado; T-NP(IT)-AFM: Camundongos com tumor que receberam a administração intratumoral da NPM-HFn e foram expostos ao campo magnético alternado; T-NP(EV)-AFM: Camundongos com tumor que receberam a administração endovenosa da NPM-HFn e foram expostos ao campo magnético alternado A, B, C, D, E, F, G e H (HE, 100X).

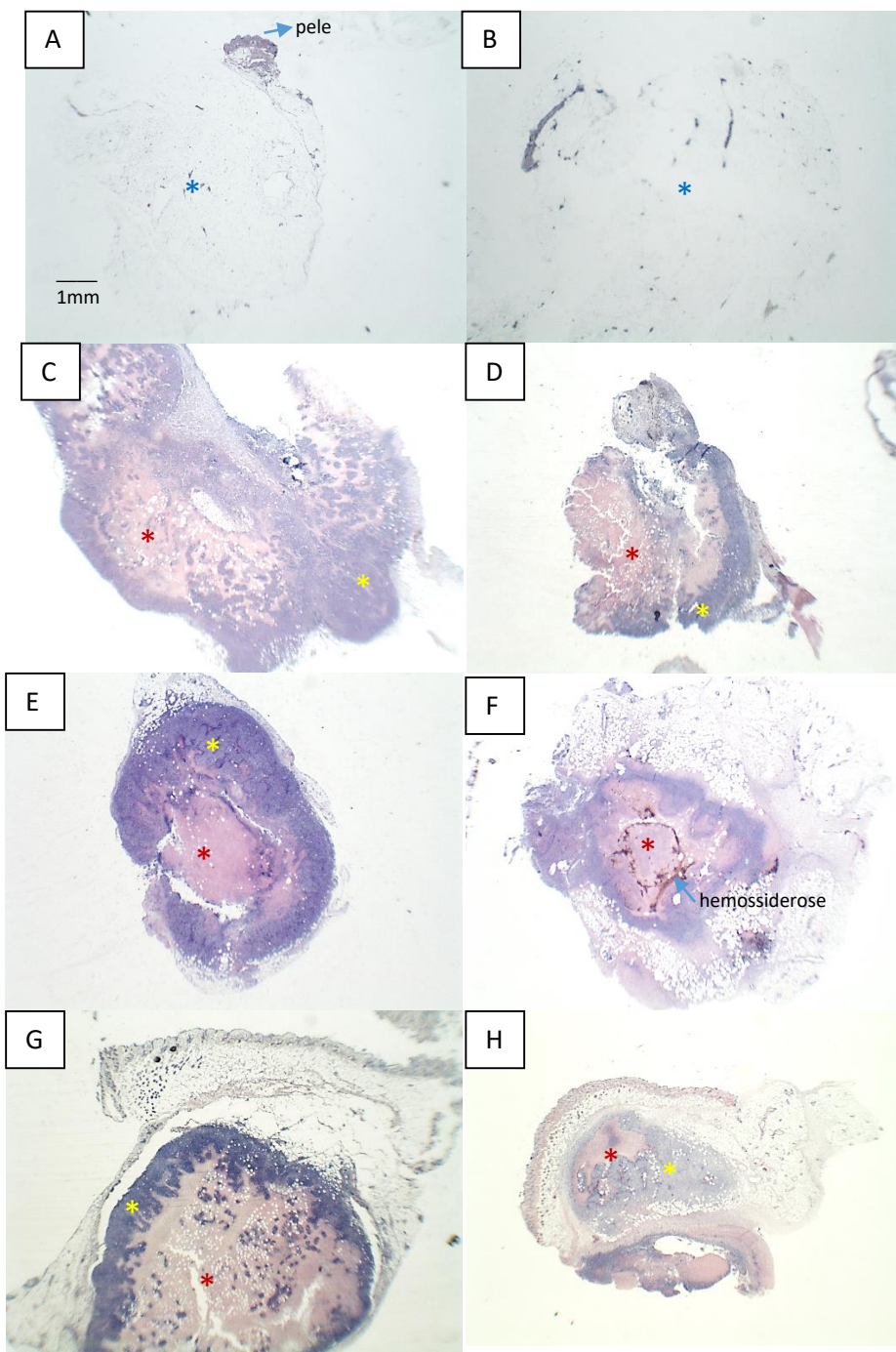


Figura 47 - Fotomicrografia do tumor na mama em Ctr-2 (A), NP(EV)-28 (B), T-Ctr-28 (C) T-NP(IT)-28 (D), T-NP(EV)AFM-28 (E), T-NP(IT)AFM-2 (F), T-AFM-2 (G) e T-NP(EV)-28 (H). Mama(*), tumor(*), necrose(*). Ctr: Camundongos sem tumor que receberam administração endovenosa de soro fisiológico 0,9%; NP(EV): Camundongos sem tumor que receberam a administração endovenosa da NPM-HFn; T-Ctr: Camundongos com tumor que receberam a administração intratumoral de soro fisiológico 0,9%; T-NP(IT): Camundongos com tumor que receberam a administração intratumoral da NPM-HFn; T-NP(EV): Camundongos com tumor que receberam a administração endovenosa da NPM-HFn; T-AFM: Camundongos com tumor que receberam a administração intratumoral de soro fisiológico 0,9% e foram expostos ao campo magnético alternado; T-NP(IT)-AFM: Camundongos com tumor que receberam a administração intratumoral da NPM-HFn e foram expostos ao campo magnético alternado; T-NP(EV)-AFM: Camundongos com tumor que receberam a administração endovenosa da NPM-HFn e foram expostos ao campo magnético alternado

DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

Este trabalho teve como objetivo testar a biocompatibilidade/toxicidade, biodistribuição e eficácia antitumoral de NPM-HFn, amostra magnética nanoestruturada, recentemente sintetizada, constituída por nanopartículas de magnetita recobertas com ferritina humana. Antes dos testes biológicos, a amostra foi extensivamente estudada em suas características dimensionais, físico-químicas, magnéticas, hipertérmicas, coloidais, entre outras, tendo-se concluído que possui características adequadas para mediar a magnetohipertermia (MHT) (GUERRINI, 2017), escolhida como forma terapêutica no presente estudo.

6.1. CONSIDERAÇÕES SOBRE AS CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DA NPM-HFn

Já está bem estabelecido na literatura que biocompatibilidade, biodistribuição e eficácia das NP dependem de suas características físico-químicas, em especial da composição, incluindo a cobertura, carga superficial, dimensão e morfologia das NP (PORTILHO-CORRÊA, 2011).

O grupo de pesquisadores do Centro de Nanociência e Nanobiotecnologia - CNANO - (IB, UnB) tem investigado a biocompatibilidade de amostras magnéticas com naturezas químicas diferentes, como magnetita (GARCIA, 2002, 2005; FREITAS *et al.*, 2002; LACAVA, 2002; CHAVES *et al.*, 2005; BARBOSA, 2004; SADEGHIANI, 2004; AVELINO, 2013), maghemita (PORTILHO-CORRÊA, 2007, 2011; BRUGIN, 2007; ESTEVANATO, 2008; SALDANHA, 2008; CAMPOS DA PAZ, 2012; ROMERO, 2015) e ferrita de cobalto (KÜCKELHAUS, 2003), tendo mostrado que entre elas as NP de maghemita são as mais biocompatíveis (GARCIA, 2002; BRUGIN, 2007), o que se deve ao fato de já estarem oxidadas, diferentemente das de magnetita (GARCIA, 2002; SOUZA, 2015).

Entretanto, além de serem as únicas aprovadas para uso clínico (WATANABE *et al.*, 2013), as constituídas de magnetita apresentam maior capacidade de aumentar o calor quando submetidas a campo magnético alternado, sendo, portanto, mais promissoras para realizar o processo de magnetohipertermia (GUPTA, 2007; GUARDIA *et al.*, 2010), razão porque foram escolhidas para o desenvolvimento deste trabalho.

De fato, o teste de termometria mostrou que os volumes passíveis de serem aplicados intratumoral, endovenosa ou intraperitonealmente da amostra NPM-HFn (60 a 100 μ L) proporcionaram rápido aumento da temperatura, sendo este adequado (42-45 °C) para realização da hipertermia (HILGER & KAISER, 2012).

Estudos prévios mostraram que nanopartículas de magnetita sem cobertura apresentam toxicidade relevante (LACAVA *et al.*, 1998; GUPTA & CURTIS, 2004) e que este efeito é dose dependente (WATANABE *et al.* 2013). Como a ferritina é uma proteína natural do organismo presente no interior das células e no sangue que não ativa respostas inflamatórias e imunológicas (ROMAGNANI, 2006), foi selecionada para a funcionalização das nanopartículas de magnetita da amostra NPM-HFn. Em conformidade, os resultados dos testes de toxicidade mostraram poucas alterações bioquímicas e hematológicas e ausência de genotoxicidade nessa amostra, como previamente observado após funcionalização de nanopartículas de magnetita por diferentes moléculas biocompatíveis (GUPTA & GUPTA, 2005; LACAVA, 2004; PETRI-FINK *et al.*, 2005; WAN *et al.*, 2007; SINGH *et al.*, 2010; KIM *et al.*, 2012,) capazes de promover a estabilidade, ao evitar a aglomeração das nanopartículas (WILSON *et al.*, 2002).

Além disto, com a superexpressão de receptores apropriados nas células tumorais, a cobertura de ferritina pode favorecer o direcionamento da amostra para o tumor, como observado após administração endovenosa da amostra. Estratégias que promovam o direcionamento da formulação para o tumor, seja anticorpo (CAMPOS DA PAZ, 2012) ou uma simples cobertura usada para funcionalizar a NP com propriedades como a da ferritina, aumentam a chance de sucesso do tratamento, ou seja, sua eficácia, enquanto minimizam os efeitos adversos, ou seja, aumentam a eficiência do tratamento (CAVALLÉ & PUNTES, 2015). Por vezes ao associar uma cobertura às nanopartículas, aquela perde a função de reconhecer ou ser reconhecida pelo alvo. As moléculas de ferritina da amostra NPM-HFn continuaram aptas a serem reconhecidas pelo receptor de transferina TfR1, como comprovado por estudos *in vitro* (GUERRINI, 2017).

As nanopartículas de magnetita da amostra NPM-HFn apresentaram diâmetro de $12,7 \pm 0,7$ nm, eram monodispersas e quando funcionalizadas por ferritina apresentaram o diâmetro hidrodinâmico de 70 nm. Estas características são interessantes do ponto de vista de aplicação biomédica, especialmente quando visando a hipertermia para tratamento dos tumores porque o tamanho das NP influencia nas interações com proteínas, biodistribuição e velocidade de eliminação (*clearance*), penetração e acúmulo no tumor e seu destino para outros alvos. Sabe-se que partículas maiores acumulam mais nos tumores, mas ficam restritas às regiões da periferia, próximas aos capilares sanguíneos, enquanto as NP menores podem penetrar mais profundamente nos tumores (CAVALLÉ & PUNTES, 2015). Partículas menores que 6 nm (*core* + surfactante) são rapidamente eliminadas pelos rins, enquanto as maiores que 100 nm são rapidamente retiradas da circulação pelo sistema imunitário, a menos que tenham uma cobertura para atrasar seu reconhecimento, como a feita por PEG.

Nanopartículas na faixa intermediária, como as da NPM-HFn, apresentam as melhores capacidades de penetração e acumulação no tumor (SPERLING *et al.*, 2009), outro fator a explicar

a presença de ferro nas lâminas histológicas do tumor após injeção endovenosa. Para que os resultados de MHT após administração endovenosa observados neste trabalho levassem a uma redução do tumor de 89% era imprescindível que as NP estivessem acumuladas no tumor.

De acordo com Skotland e colaboradores (2010), nanopartículas com diâmetro hidrodinâmico maior que 30 nm têm maior absorção pelo fígado e baço, órgãos em que a maior parte das NPM foi encontrada. É esperado que após a administração intraperitoneal, como a feita na primeira etapa deste trabalho, as NPM sejam captadas por macrófagos do SER (sistema reticuloendotelial), reduzindo o tempo de circulação sanguínea e sendo acumuladas no fígado (VARNA *et al.*, 2012), para depois serem redistribuídas para os demais órgãos (KIM *et al.*, 2008). A grande concentração de ferro encontrada no fígado poderia ser devida às repetidas doses da NPM-HFn ao longo do tempo, (AGOTEGARAY *et al.* 2016); o fígado atuaria como um sistema de desintoxicação e as repetidas doses poderiam causar bioacumulação hepática.

As propriedades das NP são também influenciadas por sua morfologia. Embora o formato esférico ou arredondado das NP estudadas seja comumente escolhido devido à simplicidade de síntese e fácil funcionalização, outros formatos podem também ter interesse para aplicações biomédicas porque levam a diferentes propriedades, como por exemplo maior extravasamento de NP semelhantes a hastes (*rod-like*). (SMITH *et al.*, 2012).

6.2. CONSIDERAÇÕES SOBRE A TOXICIDADE E BIODISTRIBUIÇÃO DA NPM-HFn

Testes de toxicidade foram realizados após administração intraperitoneal da amostra (etapa 1). Alguns deles foram feitos também após administrações endovenosa e intratumoral da amostra (etapa 2).

Em princípio, NP desenvolvidas a partir de magnetita são biocompatíveis. Entretanto, NP podem ser tóxicas devido à contaminação com bactérias ou simplesmente pelo uso de reagentes de baixa qualidade durante sua síntese. Testes *in vitro* realizados previamente (GUERRINI, 2017) mostraram ausência de toxicidade, eliminando estas possibilidades.

Ainda que a amostra NPM-HFn tenha sido delineada para apresentar biocompatibilidade e os testes *in vitro* tenham mostrado ausência de toxicidade, quando não expostas a campo magnético, testes de sua biocompatibilidade/toxicidade são imprescindíveis, atendendo à demanda pelo aumento dos conhecimentos relacionados à crescente exposição dos seres vivos às nanoestruturas e porque mínimas diferenças entre suas características podem levar a funções diferentes.

Em especial, o potencial das nanopartículas em causar danos ao DNA é um aspecto que tem merecido atenção (KARLSSON *et al.*, 2015). Entre os testes de genotoxicidade, o teste cometa e o teste de micronúcleo são os mais frequentemente utilizados. Enquanto o teste cometa detecta, pela migração dos fragmentos do DNA em um gel, lesões causadas por fragmentação e/ou modificações no DNA (ARALDI *et al.*, 2015), e esses danos podem ser reparados sem resultar em alterações permanentes (BRENDLER-SCHWAAB *et al.*, 2005), o teste de micronúcleo avalia danos irreparáveis no cromossomo (KRISHNA & HAYASHI, 2000). Considerando que cada um desses testes detecta danos no DNA causados por mecanismos de ação diferentes (SINGH *et al.*, 2009), para evitar possível resultado falso negativo de um só teste, ambos foram usados para estudar a amostra NPM-HFn em camundongos Swiss fêmeas.

O Metil Metanosulfonata (MMS), por ser agente de alquilação de DNA que causa pareamento incorreto das bases e bloqueio da replicação através da troca da guanina por 7-metilguanina e da adenina por 3-metiladenina, e em consequência tem efeito citotóxico e mutagênico, foi escolhido como controle positivo (QURESHI *et al.*, 1989; LUNDIN *et al.*, 2005). Nishikawa e colaboradores (1999) demonstraram que o tratamento com MMS em uma única administração induz a formação de micronúcleos mais do que quando administrado por mais de três vezes consecutivas. Diante disso, optou-se por utilizar uma única dose do MMS. Entretanto, na dose e parâmetros utilizados no trabalho, ainda que tenha sido o que mais micronúcleos induziu, o MMS não apresentou efeito tóxico significativo. Entretanto, no teste cometa, o MMS foi genotóxico e serviu, portanto, como controle adequado.

Administrada a camundongos saudáveis, a NPM-HFn não apresentou efeitos genotóxicos ou mutagênicos. Esses resultados estão em acordo com os de Xia e colaboradores (2015) em que a cobertura de nanopartículas de magnetita com ouro, prata, platina, quitosana ou sílica, reduz consideravelmente a formação de micronúcleo e de danos no DNA, quando em comparação com a magnetita pura, sem cobertura. O fato de que três diferentes doses da NPM-HFn não tenham levado a genotoxicidade e ou citotoxicidade também é interessante, pois diferem dos relatos de Freitas *et al* (2002) que mostram que nanopartículas de magnetita com dupla cobertura de ácido dodecanoico e álcool etoxilado induzem genotoxicidade dose-dependente.

De forma similar, à exceção de redução temporária do consumo de ração no grupo com maior administração da NPM-HFn (C3) até o quinto dia, não foram observadas diferenças significativas no peso corporal dos animais entre todos os grupos, nem ulceração na pele, perda de peso, ou outras alterações evidentes. Não foi observada perda de peso nem mesmo nos animais portando tumores tratados com NPM-HFn, na ausência ou presença de campo magnético. Já é bem estabelecido que alta toxicidade leva à perda de peso (FERNANDEZ-SALGUERO *et al.*, 1996). Este, portanto, é outro aspecto a indicar boa tolerância dos camundongos à administração da NPM-

HF_n, em concordância com outros testes e estudos que utilizaram nanopartículas de magnetita ou nanopartículas de ferritina (GU *et al.*, 2012; RUIZ *et al.*, 2013; LIANG *et al.*, 2014).

Análises hemolíticas e bioquímicas também foram realizadas para avaliar o potencial de toxicidade da amostra NPM-HF_n. O hemograma consegue detectar anemias, processos inflamatórios, alérgicos e parasitológicos e também distúrbios na coagulação sanguínea (EVERDS, 2006). Apesar de redução significativa de HCM e CHCM terem sido observados após os tratamentos com 12,5 mg/Kg da NPM-HF_n (grupo C2: HCM e CHCM) e 25 mg/Kg da NPM-HF_n (grupo C3: CHCM), os valores médios destas variáveis permaneceram dentro (CHCM) ou ligeiramente abaixo (HCM) dos valores de referência para camundongos (EVERDS, 2007; THRALL *et al.*, 2007). De forma similar, nos animais saudáveis (grupo controle) que receberam administração da NPM-HF_n por via endovenosa também ocorreu diminuição significativa da concentração de hemoglobina corpuscular média, tanto no subgrupo 2 quanto no subgrupo 28.

Segundo a literatura, a diminuição de CHCM pode ser devida ao inchaço dos eritrócitos (MORSY *et al.*, 2016). Isoladamente, esses resultados sugerem que as dosagens mais altas poderiam induzir alguma hematotoxicidade, principalmente em termos de redução da capacidade transportadora de oxigênio, a principal função da hemoglobina. Entretanto, como MCH indica a quantidade média de hemoglobina que transporta oxigênio dentro de um eritrócito, sendo seu valor calculado a partir dos resultados da contagem de eritrócitos e dosagem de hemoglobina ($HGB \times 10 / \text{Eritrócitos}$), enquanto CHCM indica a concentração média de hemoglobina dentro dos glóbulos vermelhos (em relação a 1 dL de eritrócitos), sendo seu valor calculado a partir dos resultados da dosagem de hemoglobina e hematócrito ($HGB \times 100 / HCT$) (EVERDS, 2007; COSTA *et al.*, 2004), e não foram observadas alterações significativas no número de eritrócitos, hemoglobina (HGB) ou hematócrito (HCT), em conjunto, esses resultados mostram que, nas concentrações utilizadas, a NPM-HF_n não foi citotóxica.

Foi identificada diminuição significativa dos linfócitos no grupo com tumor que recebeu a administração da NPM-HF_n por via IT seguida pela exposição ao campo magnético alternado. A mesma observação foi feita no grupo saudável que recebeu a administração da NPM-HF_n, porém este parâmetro estava normalizado no subgrupo 28. Outros estudos também encontraram que nanopartículas metálicas diminuem a proliferação e viabilidade de linfócitos (MAŁACZEWSKA, 2014; SLIWINSKA *et al.*, 2015) e pode ocorrer devido ao poder imunossupressor da ferritina sobre a proliferação e maturação das mesmas (RECALCATI *et al.*, 2008).

Além disso, a quantidade de plaquetas sofreu grande aumento no grupo com tumor que recebeu a administração da NPM-HF_n por via EV. O aumento de plaquetas pode estar relacionado a lesões no vaso sanguíneo ocasionadas por sucessivas injeções e ao próprio acúmulo de nanopartículas observado na veia caudal dos animais que receberam a administração endovenosa

(RADOMSKI *et al.*, 2005). Nanopartículas magnéticas tendem a se aglomerar na solução dispersante, devido a dois fenômenos, floculação, pequenos agregados de NPM, ou coagulação, agregados mais densos de NPM (SHAW, 1975) e provavelmente é o que explica o ferro visível nas lâminas histológicas coradas por Perls.

A redução do ferro sérico no subgrupo 2 saudável que recebeu a administração da NPM-HFn é condizente com a redução de hemácias observada (MCH e MCHC), as quais são constituídas principalmente por ferro. Entretanto, essa redução não foi observada no subgrupo 28, evidenciando ter sido uma alteração temporária.

Uma das alterações encontradas nos testes bioquímicos, foi o aumento de AST nos grupos C1 e C3 e no grupo que recebeu a amostra por via endovenosa. Em camundongos, a AST é encontrada em uma variedade de tecidos, incluindo fígado, músculo esquelético, músculo cardíaco, eritrócitos, vasos sanguíneos, cérebro, intestino, rins e testículos. A maior atividade específica de AST é encontrada no músculo cardíaco e a menor, no músculo esquelético. No fígado, é encontrada principalmente em hepatócitos periportais (QUIMBY & LUONG, 2007). O aumento de AST não foi acompanhado por alterações da ALT, enzima usada para avaliar o dano hepatocelular (QUIMBY & LUONG, 2007), encontrada principalmente no fígado, mas também ativa no intestino, nos rins, no coração, nos músculos esqueléticos e no cérebro. O aumento do AST observado neste trabalho também não foi acompanhado por alteração histopatológica, sendo o acúmulo de NPM-HFn no fígado observado apenas nas células de Kupfer e não dentro dos hepatócitos.

Ao contrário de AST, ALT e ADH, que são enzimas citoplasmáticas (ALT e ADH) e mitocondriais (AST), e apresentam atividade sérica aumentada quando há ruptura de membranas danificadas, a fosfatase alcalina é uma enzima induzível, cuja atividade sérica aumenta devido ao aumento de sua síntese. Sua função fisiológica exata não é conhecida, mas sabe-se que atua no transporte de metabólitos através das membranas celulares (QUIMBY & LUONG, 2007). A atividade da fosfatase alcalina plasmática é um parâmetro clínico frequentemente avaliado em estudos de toxicidade (HATAYAMA *et al.*, 2011). Em camundongos, sua atividade plasmática resulta da atividade total de isoenzimas individuais derivadas de diferentes tecidos, como intestinal, ósseo, hepático, renal e trofoblastos da placenta (QUIMBY & LUONG, 2007). A diminuição da fosfatase alcalina observada no grupo C3 poderia ser devido a hepatotoxicidade, mas como a alteração da AST, não foi acompanhada por alterações histopatológicas no fígado.

Ao mesmo tempo, a amostra NPM-HFN não alterou os níveis séricos de enzimas associadas à função renal (creatinina e ureia).

Nos exames histopatológicos, a NPM-HFn não causou alterações severas nos órgãos analisados. A congestão e hemorragia pulmonar encontradas provavelmente decorrem da coleta do órgão, uma vez que foram encontradas também no grupo controle.

O excesso de ferro intracelular está relacionado ao aumento de radicais livres que podem causar danos oxidativos e desencadear processos patológicos, como a degeneração hidrópica, que é o aumento de água intracelular (SILVA *et al.*, 2008; ABDELHALIM & JARRAR, 2011), observada no fígado de alguns animais.

Em conjunto, os resultados dos testes de genotoxicidade, das análises bioquímicas, hematológicas e histopatológicas são concordantes com os dos testes *in vitro* prévios (GUERRINI, 2017) e sugerem a não-toxicidade da amostra NPM-HFn.

Estudos da biodistribuição da NPM-HFn foram feitos nas duas etapas, ou seja, após administrações intraperitoneal, endovenosa e intratumoral.

O destino e biodistribuição das nanoestruturas dependem de suas características físico-químicas, mas também da via de entrada (RUENRAROENGSAK *et al.*, 2010).

Capilares descontínuos presentes no fígado, baço e medula óssea têm poros entre 100 e 1000 nm e permitem a passagem de nanopartículas entre o plasma e interstício. NP entre 6 e 40 nm seguem os caminhos das proteínas ou de seus agregados e finalmente acumulam-se nos órgãos do sistema fagocítico mononuclear, especialmente fígado e baço. NP maiores do que 40 nm são facilmente reconhecidas pelo sistema imunitário e também acabam no fígado e baço, mas por caminhos diferentes, após fagocitose (CAVALLÉ & PUNTES, 2015).

Ainda, o destino e biodistribuição das nanoestruturas dependem também de sua estabilidade coloidal. Quando há agregação e sedimentação, as NP adquirem propriedades diferentes (CAVALLÉ & PUNTES, 2015). Neste trabalho foi possível visualizar a presença de ferro no baço, fígado, tumor e, em alguns casos, no pulmão. Os pontos de visualização ao microscópio de luz provavelmente refletem agregação das nanopartículas e não somente do ferro advindo delas, como comentado acima.

Alguns fatores são importantes para determinar a biodistribuição das nanopartículas no organismo, fatores como a via de administração, propriedades físico-químicas, o ambiente fisiológico onde são introduzidos, o tamanho, o formato e a carga superficial das nanopartículas (ALMEIDA *et al.*, 2011). Tais propriedades dependem da cobertura do núcleo magnético (AGOTEGARAY *et al.*, 2016).

Analisando a biodistribuição da NPM-HFn, foi notada retenção das nanopartículas no fígado e no baço, como nos testes em animais saudáveis previamente realizados e também no tumor, principalmente após injeção intratumoral da amostra NPM-HFn. Como discutido anteriormente, vários estudos já demonstraram retenção de partículas magnéticas no fígado e no

baço (LACAVA *et al.*, 2004; CHAVES *et al.*, 2005; SADEGHIANI *et al.*, 2005). Por ser o órgão com maior quantidade de macrófagos (células de Kupffer), o fígado está associado à captação de NPM (LACAVA, 2004; GARCIA *et al.*, 2005; MORNET *et al.*, 2006; ALALAIWE *et al.*, 2017), o que justifica o aumento de ferro no fígado dos animais que receberam a administração da NPM-HFn.

O baço de todos os animais apresentava ferro, pois parte do ferro detectado vem da destruição de eritrócitos senescentes e da consequente liberação do ferro no grupo heme. Os grupos tratados com a NPM-HFn apresentaram maior concentração de ferro na polpa vermelha, onde há grande presença de macrófagos e linfócitos. Este aumento de ferro está de acordo com o aumento no peso relativo do baço em todos os animais que receberam a amostra. Entretanto, vale ressaltar que nenhum efeito histopatológico devido à administração da NPM-HFn foi encontrado.

A concentração de ferro aumentada vista no pulmão, por sua vez, pode ser atribuída à alta irrigação sanguínea do órgão. O endotélio dos capilares pulmonares apresenta morfologia contínua permitindo que pequenas moléculas sejam transportadas através da parede capilar (CHRASTINA *et al.*, 2011). Observação similar foi também previamente observada com NPM recobertas com citrato (GARCIA, 2002, SOUZA, 2015).

A baixa concentração de ferro encontrada no cérebro sugere que a NPM-HFn não consegue atravessar a barreira hematoencefálica (BHE) em grande quantidade.

O rim dos animais do grupo que recebeu a NPM-HFn por via intratumoral e o grupo do tratamento com campo magnético e também o de administração das nanopartículas por via endovenosa apresentaram um leve aumento de ferro, o que indica que a NPM-HFn pode estar sendo excretada pela urina. Outro estudo mostrou que nanopartículas de ferritina foram excretadas tanto pelas fezes quanto pela urina (LIANG *et al.*, 2014). A alteração observada no rim, a pielonefrite crônica discreta, está relacionada à implantação tumoral e não à administração da NPM-HFn, uma vez que, foi encontrada apenas nos animais com tumor.

Foi observado discreto acúmulo de NPM no linfonodo sublíaco de todos os animais que receberam a amostra. Ainda, todos os animais que apresentaram micrometástases no linfonodo e apenas eles também apresentaram hiperplasia linfoide. Este tipo de hiperplasia ocorre em resposta tanto a danos no tecido, quanto a uma neoplasia ou invasão de microrganismos (HALEY, 2017).

Em conjunto, os resultados demonstraram a biocompatibilidade da amostra NPM-HFn, pois não causa danos ao DNA, não é citotóxica, não mostrou alterações hematológicas e bioquímicas significativas e nem alterações histopatológicas, em camundongos saudáveis, características importantes para o fluido magnético ser utilizado no tratamento de tumor.

6.3. CONSIDERAÇÕES SOBRE A EFICÁCIA DA NPM-HFn PARA O TRATAMENTO DE ADENOCARCINOMA MAMÁRIO DE EHRLICH

Muito do que se conhece atualmente sobre o processo de carcinogênese em humanos é resultante de estudos utilizando modelos de desenvolvimento de tumor em camundongos. Entre os vários modelos experimentais disponíveis (MOGNETTI *et al.*, 2006; BAHR *et al.*, 2015), foi escolhido o tumor de Ehrlich, que apresenta rápido crescimento, facilidade de manuseio e agressividade (NASCIMENTO *et al.*, 2006; ELBIALY & MADY, 2015) e é proveniente do adenocarcinoma mamário em camundongo (VIOLATO *et al.*, 2014). O tumor de Ehrlich tem sido usado com sucesso para estudo da eficácia de tratamento com estratégias nanotecnológicas (MIRANDA-VILELA, 2013, 2014; SOUZA, 2015) e permitiu investigação da eficácia da amostra NPM-HFn.

Em particular, nesse estudo foi escolhido o modelo ortotópico em que as células tumorais de Ehrlich são inoculadas na glândula mamária, o local de origem desse tumor (KUBOTA, 1994), e que recentemente foi aperfeiçoado por nosso grupo de pesquisa (ROMERO, 2015).

O tecido tumoral é caracterizado por possuir vasculatura irregular. As células tumorais superexpressam fatores de crescimento que induzem a formação de novos vasos (angiogênese), o que provoca uma desorganização dos vasos podendo induzir à estagnação do fluxo sanguíneo. Essa condição provoca hipóxia, diminuição do pH e a incapacidade de dissipar o calor com eficiência, provocando maior susceptibilidade ao dano causado pelo aumento da temperatura (NIELSEN *et al.*, 2001). Adicionalmente, o desbalanceamento na expressão de moléculas pró-angiogênicas e anti-angiogênicas promove descontinuidade da camada endotelial, formando janelas de 300 nm a 4700 nm entre as células endoteliais (NEHOFF *et al.*, 2014), possibilitando, assim, acúmulo de partículas menores de 200 nm no sítio tumoral, chamado de efeito de permeabilidade e retenção aumentada (efeito EPR) (MATSUMURA & MAEDA, 1986). Devido a essas peculiaridades, o aumento da temperatura para 42 - 45 °C induz a morte das células tumorais por necrose ou apoptose (KOBAYASHI *et al.*, 2014), como observado em nossos experimentos. Ainda que não afete as células normais, pode induzir também desnaturação de proteínas, as quais estão envolvidas na sinalização, na membrana celular, no citoesqueleto, na manutenção do DNA, entre outras funções, causando inibição do crescimento celular e apoptose (GAZEAU *et al.*, 2008).

Neste trabalho foram comparadas, ainda de forma preliminar, duas formas de administração da NPM-HFn, via endovenosa e via intratumoral. Os dados apresentados ressaltam que o tratamento utilizando magnetohipertermia mediada por nanopartículas magnéticas de

magnetita funcionalizadas com ferritina humana possibilitou a regressão tumoral, tanto com a administração intratumoral quanto pela administração endovenosa.

O tratamento da NPM-HFn por via endovenosa e exposição ao campo magnético levou a retardamento do desenvolvimento tumoral, tanto no subgrupo 2 quanto no subgrupo 28. Conforme discutido anteriormente, as NPM da amostra testada têm diâmetro adequado para serem administradas por via endovenosa (SINGH *et al.*, 2010). Dados da literatura mostram que nanopartículas de ferritina carreando doxorubicina (LIANG *et al.* 2014), sem nenhum ligante, conseguem entregar o fármaco especificamente às células tumorais, após a administração endovenosa, devido à superexpressão de seu receptor TfR1 nas células tumorais (FAN *et al.*, 2013; ZHAO *et al.*, 2016). No entanto, estudos adicionais são necessários para confirmar a captação da NPM-HFn facilitada pela TfR1 e sobre a superexpressão de TfR1 no tumor de Ehrlich.

Também foi mostrado (FAN *et al.*, 2013; ZHAO *et al.*, 2016) que 24 horas após a administração das nanopartículas havia acúmulo da amostra especificamente ao tumor, sendo pouco acumulado no restante do organismo, diferentemente das NP de magnetita que também se acumulam no fígado e baço.

Embora a coloração de Perls não tenha possibilitado a visualização expressiva de ferro no tumor após administração por via endovenosa, esta forma foi eficaz na MHT, do que se deduz a presença de NP na região tumoral. É possível que aglomerados passíveis de serem observados ao microscópio de luz não tenham sido formados, o que é uma condição desejável, ou que o corte histológico não tenha capturado a área de concentração da nanopartículas. Além disso, um estudo mostrou que 70% das nanopartículas de ferritina carreando um fármaco são eliminadas do organismo após 4 dias, principalmente pelo fígado (LIANG *et al.*, 2014). Dessa forma, as NPM-HFn já teriam sido eliminadas do tumor na hora da coleta dos órgãos quando administradas endovenosamente. Estudos espectroscópicos dos tumores poderiam clarear este aspecto.

Acompanhar a biodistribuição *in vivo* da NPM-HFn por ressonância magnética seria uma estratégia para poder aplicar o campo magnético no momento de maior concentração das nanopartículas no tumor, o que aumentaria sua eficácia.

Apesar de não ter sido possível detectar diminuição do volume tumoral, quando mensurado por paquímetro, no subgrupo 2 que recebeu a NPM-HFn por via intratumoral seguida pela exposição ao campo magnético, quando o tumor *ex vivo* foi analisado por microscopia de luz, foi possível notar grande área de necrose e diminuição de 88% da área tumoral em comparação com o grupo controle tumor. Este resultado é, portanto, equivalente à diminuição de 89% observada no grupo que recebeu o tratamento da NPM-HFn por via endovenosa seguido pela exposição ao campo magnético.

Este trabalho expõe que a medição do volume tumoral utilizando paquímetro não é fidedigna para mensurar clinicamente o volume tumoral, uma vez que não é possível diferenciar o volume tumoral do volume da NPM-HFn injetada no tumor, nem do volume da necrose ou do infiltrado de inflamatório. Vale lembrar que como a massa tumoral cresce em uma velocidade maior que a vascularização, a necrose ocorre de forma espontânea também nos tumores não tratados.

As análises *ex vivo* dos tumores do subgrupo 28 que recebeu a NPM-HFn por via intratumoral seguida pela exposição ao campo magnético, mostram que houve grande aumento da área tumoral e, portanto, reincidência tumoral. Os dados sugerem que na forma intratumoral de administração, a penetração no tumor pode ter rompido vasos e facilitado o extravasamento de células tumorais. O fato de não terem sido encontradas micrometástases quando a administração é endovenosa reforça essa ideia.

Tais achados, assim como a não indução de micrometástases, indicam a administração da NPM-HFn por via endovenosa bastante vantajosa.

Embora a multimodalidade ou terapias associadas seja mais estudada atualmente, inclusive na nanotecnologia (CAVALLÉ & PUNTES, 2015), neste trabalho apenas uma terapia foi testada, a MHT. O fato de não se ter obtido cura total do tumor de Ehrlich nas circunstâncias usadas está em acordo com o estado de arte das modalidades simples de tratamento em que se verifica não serem capazes de curar o câncer por si mesmas (CAVALLÉ & PUNTES, 2015). Entretanto, o fato de se ter obtido 89% de eficácia com o uso da NPM-HFn é bastante relevante. O uso concomitante de um quimioterápico, como observado em relatos da literatura (ROMERO, 2015), poderia elevar a eficácia do tratamento a 100%.

Uma vez que a utilização concomitante da magnetohipertermia com a quimioterapia pode aumentar a captação e a sensibilidade das células tumorais aos quimioterápicos (RAO & DENG, 2010), o uso da MHT mediada por NPM-HFN, que por si só levou à regressão tumoral de até 89%, poderia funcionar como adjuvante e aumentar a eficácia do tratamento, levando à regressão completa do tumor. Adicionalmente, encapsular uma substância antioxidante ou anti-tumoral na NPM associada à ferritina poderia também aumentar a eficácia do tratamento.

Na realidade, uma só plataforma nanotecnológica pode apresentar multifunções no tratamento do câncer. Em consonância, a síntese de NPM-HFn foi alterada para que também seja usada como carreador do quimioterápico doxorrubicina (GUERRINI, 2017). Dados preliminares mostram que essa nova formulação leva à diminuição da viabilidade de células tumorais, especialmente quando associada à MHT, representando, portanto, uma perspectiva promissora no tratamento do câncer de mama.

As expectativas para que novos sistemas nanoestruturados sejam rapidamente desenvolvidos e levem à melhoria da qualidade de vida, em especial por meio do diagnóstico precoce e tratamento do câncer são enormes. Em síntese, o presente trabalho contribui para aumentar os conhecimentos sobre nanopartículas e assim para a tão necessária e desafiante regulação dos nanofármacos e nanossistemas.

CONCLUSÃO

7. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos no presente trabalho permitem as seguintes conclusões:

- a amostra NPM-HFn (nanopartículas magnéticas de magnetita funcionalizadas com ferritina humana), quando exposta a campo magnético alternado, apresentou aquecimento adequado para a magnetohipertermia;
- NPM-HFn não induziu citotoxicidade e nem genotoxicidade após 8 inoculações intraperitoneais consecutivas nos camundongos;
- os parâmetros bioquímicos analisados indicaram possível hepatotoxicidade devido a administração de altas concentrações da NPM-HFn;
- nos parâmetros hematológicos, NPM-HFn induziu tendência à diminuição linfocitária e do MCH e MCHC;
- as NPM acumularam preferencialmente no fígado, baço, linfonodo e pulmão quer a administração de NPM-HFn tenha sido pela via intraperitoneal, endovenosa ou intratumoral;
- a administração da NPM-HFn não causou alteração morfológica significativa nos órgãos analisados;
- a administração endovenosa de NPM-HFn causou acúmulo de nanopartículas na veia da cauda, provavelmente devido à agregação das plaquetas;
- a administração intratumoral de NPM-HFn pode facilitar a metástase;
- a magnetohipertermia mediada pela NPM-HFn, nas condições experimentais deste estudo, reduziu o crescimento tumoral em até 89%;
- o tratamento por magnetohipertermia após administração endovenosa de NPM-HFn foi eficaz em evitar metástases.

REFERÊNCIAS

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDELHALIM, Mohamed Anwar K.; JARRAR, Bashir M. Gold nanoparticles induced cloudy swelling to hydropic degeneration, cytoplasmic hyaline vacuolation, polymorphism, binucleation, karyopyknosis, karyolysis, karyorrhexis and necrosis in the liver. **Lipids in Health and Disease**, v. 10, n. 1, p. 166, 2011.

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.

AGOTEGARAY, Mariela *et al.* Influence of chitosan coating on magnetic nanoparticles in endothelial cells and acute tissue biodistribution. **Journal of Biomaterials science**, Polymer edition, v. 27, n. 11, p. 1069-1085, 2016.

AHN, J. Y., CHOI, H., KIM, Y. H., HAN, K. Y., PARK, J. S., HAN, S. S., LEE, J. Heterologous gene expression using self-assembled supra-molecules with high affinity for HSP70 chaperone. **Nucleic acids research**, 33(12), 3751-3762, 2005.

ALALAIWE, Ahmed *et al.* Influence of PEG coating on the oral bioavailability of gold nanoparticles in rats. **Drug delivery**, v. 24, n. 1, p. 591-598, 2017.

ALEKSEENKO, Alexandra V.; WASEEM, Tatyana V.; FEDOROVICH, Sergei V. Ferritin, a protein containing iron nanoparticles, induces reactive oxygen species formation and inhibits glutamate uptake in rat brain synaptosomes. **Brain research**, v. 1241, p. 193-200, 2008.

ALKHATEEB, A. A.; HAN, B.; CONNOR, J. R. Ferritin stimulates breast cancer cells through an iron-independent mechanism and is localized within tumor-associated macrophages. **Breast cancer research and treatment**, v. 137, n. 3, p. 733-744, 2013.

ALMEIDA, J. PM, Chen, A. L., Foster, A. & Drezek, R. vivo biodistribution of nanoparticles. **Nanomed**, v. 6, p. 815-835, 2011.

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.

ARALDI, Rodrigo Pinheiro *et al.* Using the comet and micronucleus assays for genotoxicity studies: a review. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 72, p. 74-82, 2015.

AROSIO P., LEVI S. Ferritin, iron homeostasis, and oxidative damage. **Free Radic Biol Med** 33:457–463, 2002.

AVELINO, L. C. M. **Aplicação de nanopartículas magnéticas funcionalizadas com Selol no tratamento do câncer de pele e como contraste em exames de microtomografia computadorizada.** 2013. 160p. Tese (Doutorado em Patologia Molecular) – Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília, Brasília, 2013.

AWARA, Wageh M. *et al.* The potential role of cyclooxygenase-2 inhibitors in the treatment of experimentally-induced mammary tumour: does celecoxib enhance the anti-tumour activity of doxorubicin? **Pharmacological research**, v. 50, n. 5, p. 487-498, 2004.

BAHR, Hoda I. *et al.* Chemopreventive effect of leflunomide against Ehrlich's solid tumor grown in mice: Effect on EGF and EGFR expression and tumor proliferation. **Life sciences**, v. 141, p. 193-201, 2015.

BALASUBRAMANYAM, A. *et al.* In vivo genotoxicity assessment of aluminium oxide nanomaterials in rat peripheral blood cells using the comet assay and micronucleus test. **Mutagenesis**, v. 24, n. 3, p. 245-251, 2009.

BARBOSA, L.S. **Avaliação *in vivo* da toxicidade de nanopartículas magnéticas revestidas por ácido glucônico.** 2004. 64p. Dissertação (Mestrado em Patologia Molecular) – Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília, Brasília, 2004.

BEAUMONT, C.; VAULONT, S. Iron homeostasis. In: Disorders of iron homeostasis, erythrocytes, erythropoiesis. Genova, Italy: **Forum Service Editore**. p. 393-406, 2006.

BHAGAT, Jacky. Combinations of genotoxic tests for the evaluation of group 1 IARC carcinogens. **Journal of Applied Toxicology**, 2017.

- BONASSI, Stefano *et al.* An increased micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of cancer in humans. **Carcinogenesis**, v. 28, n. 3, p. 625-631, 2007.
- BRASIL. Instituto Nacional de Câncer. **Estimativa 2016: incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA, 2015. 122p.
- BRENDLER-SCHWAAB, S., *et al.* The in vivo comet assay: use and status in genotoxicity testing. **Mutagenesis**, v. 20, n. 4, p. 245-254, 2005.
- BUSCH, W. Uber den einfluss Welch heftigere Erysipeln auf organisiente Neubildungen aususuben. **Verhandl naturh Preuss Rein Westphal**, v. 23, p. 28, 1866.
- CAMPOS DA PAZ, M. **Conjugação de anticorpo anti-antígeno carcinoembrionário a nanopartículas magnéticas: avaliação do potencial para detecção e tratamento de câncer**. 135p. Tese (Doutorado em Patologia Molecular) – Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília, Brasília, 2012.
- CAMPOS DA PAZ, M.; SANTOS, M. DE F.; SANTOS, C. M.; DA SILVA, S. W.; DE SOUZA, L. B.; LIMA E. C.; SILVA, R. C.; LUCCI, C. M.; MORAIS, P. C.; AZEVEDO, R. B.; LACAVAL, Z. G. M. Anti-CEA loaded maghemite nanoparticles as a theragnostic device for colorectal cancer. **Int J Nanomedicine**, v. 7, p. 5271-82, Out. 2012.
- CANDIDO, N. M.; CALMOM, M. F.; BONILHA, J. L.; DOS SANTOS, M. C.; LIMA, E. C. D.; SOUSA, C. R. S.; LACAVAL, Z. G. M.; RAHAL, P. High Efficacy in Hyperthermia-associated with Polyphosphate Magnetic Nanoparticles for Oral Cancer Treatment. **J Nanomedicine & Nanotechnology**, v.5, p.1000205, 2014.
- CARNEIRO, M. L.; PEIXOTO, R. C.; JOANITTI, G. A.; OLIVEIRA, R. G.; TELLES, L. A.; MIRANDA-VILELA, A. L.; BOCCA, A. L.; VIANNA, L. M.; DA SILVA, I. C.; DE SOUZA, A. R.; LACAVAL, Z. G.; BAO, S. N. Antitumor effect and toxicity of free rhodium (II) citrate and rhodium (II) citrate-loaded maghemite nanoparticles in mice bearing breast cancer. **J Nanobiotechnology**, v. 11, p. 4, Fev 2013.
- CENTER, Sharon A. Interpretation of liver enzymes. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 37, n. 2, p. 297-333, 2007.

CHAMMAS R. Biologia do Câncer: uma breve introdução. In: P. M. G. Hoff; A. Katz; R. Chammas; V. Odone-Filho; Y.S. Novis. (Org.). **Tratado de Oncologia**. 1ed. São Paulo: Editora Atheneu. v. 1, p. 3-8, 2013.

CHAN, Francis Ka-Ming; MORIWAKI, Kenta; DE ROSA, María José. Detection of necrosis by release of lactate dehydrogenase activity. **Immune Homeostasis: Methods and Protocols**, p. 65-70, 2013.

CHAUDHRY, Hammad S.; KASARLA, Madhukar Reddy. Anemia, Microcytic Hypochromic. 2017.

CHAUHAN, V. P.; STYLIANOPOULOS, T.; MARTIN, J. D.; POPOVIĆ, Z.; CHEN, O.; KAMOUN, W. S.; BAWENDI, M. G.; FUKUMURA, D.; JAIN, R. K. Normalization of tumour blood vessels improves the delivery of nanomedicines in a size-dependent manner. **Nature nanotechnology**, 7(6), 383-388, 2012.

CHAVES, S. B. *et al.* Interleukin-1 and interleukin-6 production in mice's lungs induced by 2, 3 meso-dimercaptosuccinic-coated magnetic nanoparticles. **Journal of applied physics**, v. 97, n. 10, p. 10Q915, 2005.

CHRASTINA, Adrian; MASSEY, Kerri A.; SCHNITZER, Jan E. Overcoming in vivo barriers to targeted nanodelivery. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology**, v. 3, n. 4, p. 421-437, 2011.

CHUNFU, Z.; JINQUAN, C.; DUANZHI, Y.; YONGXIAN, W.; YANLIN, F.; JIAJÜ, T. Preparation and radiolabeling of human serum albumin (HSA) coated magnetite nanoparticles for magnetically targeted therapy. **Applied Radiation and Isotopes**. v. 61, n. 6, p. 1255-1259, 2004

CINTRA E SILVA, D. O.; ESTEVANATO, L. L.; SIMIONI, A. R.; RODRIGUES, M. M.; LACAVA, B. M.; LACAVA, Z. G.; TEDESCO, A. C.; MORAIS, P. C.; BÁO, S. N. Successful strategy for targeting the central nervous system using magnetic albumin nanospheres. **J Biomed Nanotechnol**, v. 8, n. 1, p. 182-9, Feb 2012.

- COSTA, Fernando Ferreira *et al.* Hematologia: fundamentos e prática. **São Paulo: Atheneu**, 2004.
- CRICH, S. G.; BUSSOLATI, B.; TEI, L.; GRANGE, C.; ESPOSITO, G.; LANZARDO, S.; CAMUSSI, G.; AIME, S. Magnetic resonance visualization of tumor angiogenesis by targeting neural cell adhesion molecules with the highly sensitive gadolinium-loaded apoferritin probe. **Cancer research**, 66(18), 9196-9201, 2006.
- CRICH, S. G.; CADENAZZI, M.; LANZARDO, S.; CONTI, L.; RUIU, R.; ALBERTI, D.; CAVALLO, F.; CUTRIN, J.S.; AIME, S. Targeting ferritin receptors for the selective delivery of imaging and therapeutic agents to breast cancer cells. **Nanoscale**, 7(15), 6527-6533, 2015.
- DANIELS, T. R.; DELGADO, T.; RODRIGUEZ, J. A.; HELGUERA, G.; PENICHER, M. L. The transferrin receptor part I: Biology and targeting with cytotoxic antibodies for the treatment of cancer. **Clinical immunology**, 121(2), 144-158, 2006a.
- DANIELS, T. R.; DELGADO, T.; HELGUERA, G.; PENICHER, M. L. The transferrin receptor part II: targeted delivery of therapeutic agents into cancer cells. **Clinical immunology**, 121(2), 159-176, 2006b.
- DEHAL, P. K.; LIVINGSTON, C. F.; DUNN, C. G.; BUICK, R.; LUXTON, R.; PRITCHARD, D. J. Magnetizable antibody-like proteins. **Biotechnology journal**, 5(6), 596-604, 2010.
- DONOVAN, A.; ROY, C. N.; ANDREWS, N. C. The ins and outs of iron homeostasis. **Physiology**, v. 21, n. 2, p. 115-123, 2006.
- DUMALA, Naresh *et al.* Genotoxicity study of nickel oxide nanoparticles in female Wistar rats after acute oral exposure. **Mutagenesis**, v. 32, n. 4, p. 417-427, 2017.
- DUSINSKA, Maria *et al.* Safety of nanoparticles in medicine. **Nanomedicine in Health and Disease**. CRC Press, Boca Raton, FL, USA, p. 203-226, 2011.
- ELBIALY, Nihal Saad; MADY, Mohsen Mahmoud. Ehrlich tumor inhibition using doxorubicin containing liposomes. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 23, n. 2, p. 182-187, 2015.

ELMORSI, Y. M. et al. Effect of ketoprofen and indomethacin on methotrexate pharmacokinetics in mice plasma and tumor tissues. **European journal of drug metabolism and pharmacokinetics**, v. 38, n. 1, p. 27-32, 2013.

ESTEVANATO, L. L. C. **Nanocápsulas magnéticas de Selol para tratamento do câncer de mama experimental: avaliação *in vitro* e *in vivo***. 134p. Tese (Doutorado em Patologia Molecular) – Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília, Brasília, 2012.

ESTEVANATO, L. L.; DA SILVA, J. R.; FALQUEIRO, A. M.; MOSINIEWICZ-SZABLEWSKA, E.; SUCHOCKI, P.; TEDESCO, A. C.; MORAIS, P. C.; LACAVA, Z. G. Co-nanoencapsulation of magnetic nanoparticles and selol for breast tumor treatment: in vitro evaluation of cytotoxicity and magnetohyperthermia efficacy. **Int J Nanomedicine**, v. 7, p. 5287-99, Out 2012b.

ESTEVANATO, L. L.; LACAVA, L. M.; CARVALHO, L. C.; AZEVEDO, R. B.; SILVA, O.; PELEGRINI, F.; BAO, S. N.; MORAIS, P. C.; LACAVA, 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. 301-8, Apr 2012a.

ESTEVANATO, L.; CINTRA, D.; BALDINI, N.; PORTILHO, F.; BARBOSA, L.; MARTINS, O.; LACAVA, B.; MIRANDA-VILELA, A. L.; TEDESCO, A. C.; BAO, S.; MORAIS, P. C.; LACAVA, Z. G. Preliminary biocompatibility investigation of magnetic albumin nanosphere designed as a potential versatile drug delivery system. **Int J Nanomedicine**, v. 6, p. 1709-17, Out 2011.

EVERDS, Nancy E. Hematology of the laboratory mouse. In: **The Mouse in Biomedical Research** (Second Edition). 2007. p. 133-XVIII.

FAIRBAIRN, D. W.; OLIVE, P. L.; O'NEILL, K. L. The comet assay: a comprehensive review. **Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology**, v. 339, n. 1, p. 37-59, 1995.

FAIRBANKS, V. G.; BEUTLER E. Iron metabolism. In: Beutler E., Lichtman M. A.; Coller B. S.; Kipps T. J.; Seligsohn U. editors. **Williams- Hematology**. 6th ed. New York: Mcgraw-Hill p. 295-304, 2001.

FALVO, E.; TREMANTE, E.; FRAIOLI, R.; LEONETTI, C.; ZAMPARELLI, C.; BOFFI, A.; MOREA, V.; CECI, P.; GIACOMINI, P. Antibody–drug conjugates: targeting melanoma with cisplatin encapsulated in protein-cage nanoparticles based on human ferritin. **Nanoscale**, 5(24), 12278-12285, 2013.

FAN, K.; CAO, C.; PAN, Y.; LU, D.; YANG, D.; FENG, J.; SONG, L.; LIANG, M.; YAN, X. Magnetoferritin nanoparticles for targeting and visualizing tumour tissues. **Nature nanotechnology**, 7(7), 459-464, 2012.

FAN, K.; GAO, L.; YAN, X. Human ferritin for tumor detection and therapy. Wiley Interdisciplinary Reviews: **Nanomedicine and Nanobiotechnology**, v. 5, n. 4, p. 287-298, 2013.

FANTECHI, Elvira *et al.* A smart platform for hyperthermia application in cancer treatment: cobalt-doped ferrite nanoparticles mineralized in human ferritin cages. **ACS nano**, v. 8, n. 5, p. 4705-4719, 2014.

FENECH, M. *et al.* Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells. **Mutagenesis**, v. 26, n. 1, p. 125-132, 2011.

FERLAY, J.; SOERJOMATARAM, I. E. M.; DIKSHIT, R.; ESER, S.; MATHERS, C.; REBELO, M.; PARKIN, D. M.; FORMAN, D.; BRAY, F. **Globocan 2012 v1.1**, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11.

FERNANDEZ-SALGUERO, Pedro M. *et al.* Aryl-hydrocarbon receptor-deficient mice are resistant to 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-induced toxicity. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 140, n. 1, p. 173-179, 1996.

FORD, G. C.; HARRISON, P. M.; RICE, D. W.; SMITH, J. M.; TREFFRY, A.; WHITE, J. L.; YARIV, J. Ferritin: Design and Formation of an Iron-Storage Molecule. **Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.** 304, 551-565, 1984.

FREITAS, M. L. L. *et al.* A double-coated magnetite-based magnetic fluid evaluation by cytometry and genetic tests. **Journal of magnetism and magnetic materials**, v. 252, p. 396-398, 2002.

GANZ T. Iron homeostasis: Fitting the puzzle pieces together. **Cell Metab** 7:288–290, 2008.

GARCIA, V. A. P. **Avaliação da biocompatibilidade/toxicidade e biodistribuição de fluido magnético estabilizado por ácido cítrico e de magnetolipossomas convencionais em camundongos.** 2002. 155p. Tese (Doutorado em Patologia Molecular) – Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília, Brasília, 2002.

GARCIA, Mônica Pereira *et al.* Morphological analysis of mouse lungs after treatment with magnetite-based magnetic fluid stabilized with DMSA. **Journal of magnetism and magnetic materials**, v. 293, n. 1, p. 277-282, 2005.

GAZEAU, Florence; LÉVY, Michael; WILHELM, Claire. Optimizing magnetic nanoparticle design for nanothermotherapy. 2008.

GLEITER, H. Nanostructured materials: basic concepts and microstructure. **Acta materialia**, v. 48, n. 1, p. 1-29, 2000.

GOLBAMAKI, Nazanin *et al.* Genotoxicity of metal oxide nanomaterials: review of recent data and discussion of possible mechanisms. **Nanoscale**, v. 7, n. 6, p. 2154-2198, 2015.

GOYA, Gerardo F. *et al.* Magnetic Hyperthermia With Fe₃O₄ Nanoparticles: The Influence of Particle Size on Energy Absorption. **IEEE Transactions on Magnetics**, v. 44, n. 11, p. 4444-4447, 2008.

GROTTO, H. Z. Metabolismo do ferro: uma revisão sobre os principais mecanismos envolvidos em sua homeostase. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia.** 2008.

GU, Luo *et al.* In vivo clearance and toxicity of monodisperse iron oxide nanocrystals. **ACS nano**, v. 6, n. 6, p. 4947-4954, 2012.

GUARDIA, Pablo; LABARTA, Amilcar; BATLLE, Xavier. Tuning the size, the shape, and the magnetic properties of iron oxide nanoparticles. **The Journal of Physical Chemistry C**, v. 115, n. 2, p. 390-396, 2010.

GUEDES, M. H. A.; GUEDES, M. E. A.; MORAIS, P. C.; da SILVA, M. F.; SANTOS, T. S.; ALVES Jr, J. P.; BERTELLI, C. E.; AZEVEDO, R.B.; LACAVA, Z.G.M. Proposal of a

- magnetohyperthermia system: preliminary biological tests, **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 272–276, p. 2406–2407, 2004.
- GUERRINI, A. Protein-based multifunctional magnetic nanoparticles for theranostic applications. 140p. **Dissertação (Dottorato di ricerca in Ingegneria Industriale), Università degli studi Firenze**, 2017.
- GUIDELINE, Performance-Based Test. OECD guideline for the testing of chemicals. **The Hershberger**, v. 601, 2016.
- GULEC, S.; ANDERSON, G. J.; COLLINS, J. F. Mechanistic and regulatory aspects of intestinal iron absorption. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 307, n. 4, p. G397-G409, 2014.
- GUPTA, Ajay Kumar; CURTIS, Adam SG. Surface modified superparamagnetic nanoparticles for drug delivery: interaction studies with human fibroblasts in culture. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 15, n. 4, p. 493-496, 2004.
- GUPTA, Ajay Kumar; GUPTA, Mona. Cytotoxicity suppression and cellular uptake enhancement of surface modified magnetic nanoparticles. **Biomaterials**, v. 26, n. 13, p. 1565-1573, 2005a.
- GUPTA, Ajay Kumar; GUPTA, Mona. Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. **Biomaterials**, v. 26, n. 18, p. 3995-4021, 2005b.
- GUPTA, Ajay Kumar *et al.* Recent advances on surface engineering of magnetic iron oxide nanoparticles and their biomedical applications. 2007.
- GWINN, Maureen R.; VALLYATHAN, Val. Nanoparticles: health effects—pros and cons. **Environmental health perspectives**, v. 114, n. 12, p. 1818, 2006.
- HALEY, Patrick J. The lymphoid system: a review of species differences. **Journal of toxicologic pathology**, v. 30, n. 2, p. 111-123, 2017.
- HALLIWELL B.; GUTTERIDGE J. M. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. **Biochem J** 219:1–14, 1984.

HANAHAN, Douglas; WEINBERG, Robert A.; HANAHAN, PhD Douglas. 2 Biological hallmarks of cancer. 2017.

HARRISON, P. M.; AROSIO, P. The ferritins: Molecular properties, iron storage function and cellular regulation. **Biochim Biophys Acta** 1275:161–203, 1996.

HATAYAMA, Kazuhisa *et al.* Alkaline phosphatase isoenzymes in mouse plasma detected by polyacrylamide-gel disk electrophoresis. **The Journal of toxicological sciences**, v. 36, n. 2, p. 211-219, 2011.

HAYASHI, MAKOTO; SOFUNI, TOSHIO; MORITA, TAKESHI. Simulation study of the effects of multiple treatments in the mouse bone marrow micronucleus test. **Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects**, v. 252, n. 3, p. 281-287, 1991.

HAYASHI, MAKOTO *et al.* In vivo erythrocyte micronucleus assay: III. Validation and regulatory acceptance of automated scoring and the use of rat peripheral blood reticulocytes, with discussion of non-hematopoietic target cells and a single dose-level limit test. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 627, n. 1, p. 10-30, 2007.

HAYASHI, Makoto. The micronucleus test—most widely used in vivo genotoxicity test—. **Genes and Environment**, v. 38, n. 1, p. 18, 2016.

HERMAN, T. S. *et al.* Rationale for use of local hyperthermia with radiation therapy and selected anticancer drugs in locally advanced human malignancies. **International Journal of Hyperthermia**, v. 4, n. 2, p. 143-158, 1988.

HILGER, Ingrid; KAISER, Werner A. Iron oxide-based nanostructures for MRI and magnetic hyperthermia. **Nanomedicine**, v. 7, n. 9, p. 1443-1459, 2012.

HOFFBRAND A. V.; PETTIT F. E.; MOSS P. A. H. **Essential Haematology**. 5th ed. Oxford (UK): Blackwell Publishing. Chapter 3, Hypochromic anaemias and iron overload; p. 28-43, 2006.

HUANG, Xing-Jiu *et al.* Aspartate aminotransferase (AST/GOT) and alanine aminotransferase (ALT/GPT) detection techniques. **Sensors**, v. 6, n. 7, p. 756-782, 2006.

HUANG, H. S.; HAINFELD, J. F. Intravenous magnetic nanoparticle cancer hyperthermia. **Int J Nanomedicine**; 8: 2521-2532, 2013.

HUANG, Yue-Wern; CAMBRE, Melissa; LEE, Han-Jung. The Toxicity of Nanoparticles Depends on Multiple Molecular and Physicochemical Mechanisms. **International journal of molecular sciences**, v. 18, n. 12, p. 2702, 2017.

HUBBS, Ann F. *et al.* Nanotechnology: toxicologic pathology. **Toxicologic pathology**, v. 41, n. 2, p. 395-409, 2013.

INCA. Instituto Nacional do Câncer. Tipos de câncer - mama. 2018. Disponível em <http://www.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/mama>. Acesso em 08 de fevereiro de 2018.

ITO, A.; HONDA, H.; KOBAYASHI, T. Cancer immunotherapy based on intracellular hyperthermia using magnetite nanoparticles: a novel concept of "heat-controlled necrosis" with heat shock protein expression. **Cancer Immunol Immunother**, v. 55, n. 3, p. 320-8, 2006.

JAGANATHAN, S. K. *et al.* Effect of honey and eugenol on ehrlich ascites and solid carcinoma. **Bio Med Research International**, v. 2010, 2010.

JAIN, Tapan K. *et al.* Biodistribution, clearance, and biocompatibility of iron oxide magnetic nanoparticles in rats. **Molecular pharmaceutics**, v. 5, n. 2, p. 316-327, 2008.

JEON, J. O.; KIM, S.; CHOI, E.; SHIN, K.; CHA, K.; SO, I. S.; KIM, S. J.; JUN, E.; KIM, D.; AHN, H. J.; LEE, B. .H; LEE, S. H.; KIM, I. S. Designed nanocage displaying ligand-specific peptide bunches for high affinity and biological activity. **ACS nano**, 7(9), 7462-7471, 2013.

JEZEQUEL, P.; CAMPION, L.; SPYRATOS, F.; LOUSSOUARN, D.; CAMPONE, M.; GUERIN-CHARBONNEL, C.; JOALLAND, M. P.; ANDRE, J.; DESCOTES, F.; GRENOT, C.; ROY, P.; CARLIOZ, A.; MARTIN, P. M.; CHASSEVENT, A.; JOURDAN, M. L.; RICOLLEAU, G. Validation of tumor-associated macrophage ferritin light chain as a prognostic biomarker in node-negative breast cancer tumors: a multicentric 2004 national PHRC study. **Int J Cancer**, 131:426–437, 2012.

JOHANNSEN, Manfred *et al.* Clinical hyperthermia of prostate cancer using magnetic nanoparticles: presentation of a new interstitial technique. **International journal of hyperthermia**, v. 21, n. 7, p. 637-647, 2005.

JOSEP SALDAÑA CAVALLÉ; PR. VICTOR PUNTES. Livro Nano-Oncology: discover the wave of knowledge that makes fighting cancer with nanotechnology real. **Barcelona**, 2015.

KABEL, Ahmed M. *et al.* Effect of metformin and adriamycin on transplantable tumor model. **Tissue and cell**, v. 47, n. 5, p. 498-505, 2015.

KAFROUNI, L.; SAVADOGO, O. Recent progress on magnetic nanoparticles for magnetic hyperthermia. **Progress in Biomaterials**, v. 5, n. 3-4, p. 147-160, 2016.

KANG, H. J., KANG, Y. J., LEE, Y. M., SHIN, H. H., CHUNG, S. J., & KANG, S. Developing an antibody-binding protein cage as a molecular recognition drug modular nanoplatfrom. **Biomaterials**, 33(21), 5423-5430, 2012.

KARLSSON, Hanna L. The comet assay in nanotoxicology research. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 398, n. 2, p. 651-666, 2010.

KARLSSON, Hanna L. *et al.* Can the comet assay be used reliably to detect nanoparticle-induced genotoxicity?. **Environmental and molecular mutagenesis**, v. 56, n. 2, p. 82-96, 2015.

KASAMOTO, Sawako; MASUMORI, Shoji; HAYASHI, Makoto. In vivo micronucleus assay in mouse bone marrow and peripheral blood. **Genotoxicity Assessment: Methods and Protocols**, p. 179-189, 2013.

KIDA, Y. *et al.* Hyperthermia of metastatic brain tumor with implant heating system: a preliminary clinical results. No shinkei geka. **Neurological surgery**, v. 18, n. 6, p. 521-526, 1990.

KIM, In-Yong *et al.* Chitosan and its derivatives for tissue engineering applications. **Biotechnology advances**, v. 26, n. 1, p. 1-21, 2008.

KIM, Ji-Eun; SHIN, Ji-Young; CHO, Myung-Haing. Magnetic nanoparticles: an update of application for drug delivery and possible toxic effects. **Archives of toxicology**, v. 86, n. 5, p. 685-700, 2012.

KLEM, M. T.; MOSOLF, J.; YOUNG, M.; DOUGLAS, T. Photochemical mineralization of europium, titanium, and iron oxyhydroxide nanoparticles in the ferritin protein cage. **Inorganic chemistry**, 47(7), 2237-2239, 2008.

KNOVICH, M. A.; STOREY, J. A.; COFFMAN, L. G.; TORTI, S. V.; TORTI, F. M. Ferritin for the clinician. **Blood reviews**, 23(3), 95-104, 2009.

KOBAYASHI, Takeshi *et al.* Antitumor immunity by magnetic nanoparticle-mediated hyperthermia. **Nanomedicine**, v. 9, n. 11, p. 1715-1726, 2014.

KOPPEN, Gudrun *et al.* The next three decades of the comet assay: **a report of the 11th International Comet Assay Workshop**. 2017.

KRISHNA, Gopala; HAYASHI, Makoto. In vivo rodent micronucleus assay: protocol, conduct and data interpretation. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 455, n. 1, p. 155-166, 2000.

KUBOTA, Tetsuro. Metastatic models of human cancer xenografted in the nude mouse: the importance of orthotopic transplantation. **Journal of cellular biochemistry**, v. 56, n. 1, p. 4-8, 1994.

LACAVA, Z. G. M. *et al.* Biological effects of magnetic fluids: toxicity studies. **Journal of magnetism and magnetic materials**, v. 201, n. 1-3, p. 431-434, 1998.

LACAVA, L. M.; LACAVA, B. M.; AZEVEDO, R. B.; LACAVA, Z. G. M.; BUSKE, M.; TRONCONI, A. L.; MORAIS, P. C. Nanoparticle sizing: a comparative study using atomic force microscopy, transmission electron microscopy, and ferromagnetic resonance. **J Magn Magn Mater**, v. 225, p. 79-83, 2001.

LACAVA, L. M. *et al.* Long-term retention of dextran-coated magnetite nanoparticles in the liver and spleen. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 272, p. 2434-2435, 2004.

LACAVA, Zulmira Guerrero Marques; MORAIS, Paulo César. Aplicações biomédicas de nanopartículas magnéticas. **Parcerias estratégicas**, v. 9, n. 18, p. 73-86, 2012.

LEE, Jae-Hyun *et al.* Artificially engineered magnetic nanoparticles for ultra-sensitive molecular imaging. **Nature medicine**, v. 13, n. 1, p. 95, 2007.

LEVI, S.; LUZZAGO, A.; CESARENI, G.; COZZI, A.; FRANCESCHINELLI, F.; ALBERTINI, A.; AROSIO, P. Mechanism of ferritin iron uptake: Activity of the H-chain and deletion mapping of the ferro-oxidase site. A study of iron uptake and ferro-oxidase activity of human liver, recombinant H-chain ferritins, and of two H-chain deletion mutants. **J Biol Chem** 263:18086–18092, 1988.

LI, L.; FANG, C. J.; RYAN, J. C.; NIEMI, E. C.; LEBRÓN, J. A.; BJÖRKMAN, P. J.; ARASE, H.; TORTI, F. M.; TORTI, S. V.; NAKAMURA, M. C.; SEAMAN, W. E. Binding and uptake of H-ferritin are mediated by human transferrin receptor-1. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 107(8), 3505-3510, 2010.

LI, K.; ZHANG, Z. P.; LUO, M.; YU, X.; HAN, Y.; WEI, H. P.; CUI, Z. Q.; ZHANG, X. E. Multifunctional ferritin cage nanostructures for fluorescence and MR imaging of tumor cells. **Nanoscale**, 4(1), 188-193, 2012.

LIANG, M.; FAN, K.; ZHOU, M.; DUAN, D.; ZHENG, J.; YANG, D.; FENGA, J.; YAN, X. H-ferritin–nanocaged doxorubicin nanoparticles specifically target and kill tumors with a single-dose injection. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 111(41), 14900-14905, 2014.

LIN, X.; XIE, J.; NIU, G.; ZHANG, F.; GAO, H.; YANG, M. QUAN, Q.; ARONOVA, M. A.; ZHANG, G.; LEE, S.; LEAPMAN, R.; CHEN, X. Chimeric ferritin nanocages for multiple function loading and multimodal imaging. **Nano Lett.** 11(2): 814–819, 2011.

LOVELL, David P.; OMORI, Takashi. Statistical issues in the use of the comet assay. **Mutagenesis**, v. 23, n. 3, p. 171-182, 2008.

LUNDIN, Cecilia *et al.* Methyl methanesulfonate (MMS) produces heat-labile DNA damage but no detectable in vivo DNA double-strand breaks. **Nucleic acids research**, v. 33, n. 12, p. 3799-3811, 2005.

MACHADO, A. E. H. Terapia fotodinâmica: princípios, potencial de aplicação e perspectivas. **Química Nova**, v. 23, n. 2, 2000.

MACKENZIE E. L., IWASAKI K., TSUJI Y. Intracellular iron transport and storage: From molecular mechanisms to health implications. **Antioxid Redox Signal** 10:997–1030, 2008.

MAGDOLENOVA, Zuzana *et al.* Mechanisms of genotoxicity. A review of in vitro and in vivo studies with engineered nanoparticles. **Nanotoxicology**, v. 8, n. 3, p. 233-278, 2014.

MAKINO, A., HARADA, H., OKADA, T., KIMURA, H., AMANO, H., SAJI, H., HIRAOKA, M.; KIMURA, S. Effective encapsulation of a new cationic gadolinium chelate into apoferritin and its evaluation as an MRI contrast agent. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, 7(5), 638-646, 2011.

MAŁACZEWSKA, J. Effect of 28-day oral administration of silver nanocolloid on the peripheral blood leukocytes in mice. **Polish journal of veterinary sciences**, v. 17, n. 2, p. 263-273, 2014.

MALAS, O. 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.

MANDAL, S.; HOSSAIN, M.; DEVI, P. S.; KUMAR, G. S.; CHAUDHURI, K. Interaction of carbon nanoparticles to serum albumin: elucidation of the extent of perturbation of serum albumin conformations and thermodynamical parameters. **J Hazard Mater**; 248-249: 238-245, 2013.

MANDAL, S.; CHAUDHURI, K. Engineered magnetic core shell nanoprobe: Synthesis and applications to cancer imaging and therapeutics. **World journal of biological chemistry**, v. 7, n. 1, p. 158, 2016.

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.

MANZ, D. H.; BLANCHETTE, N. L.; PAUL, B. T.; TORTI, F. M.; TORTI, S. V. Iron and cancer: recent insights. **Annals of the New York Academy of Sciences**, 1368(1), 149-161, 2016.

MARCUS, D. M.; ZINBERG, N. Isolation of ferritin from human mammary and pancreatic carcinomas by means of antibody immunoadsorbents. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 162, n. 2, p. 493-501, 1974.

MARKS, G.; MOHIUDDIN, M.; EITAN, A. Sphincter preservation surgery for rectal-cancer utilizing high-dose preoperative radiation. **Lyon Chirurg.**, v. 87, p. 25-28, 1991.

MATSUMURA, Yasuhiro; MAEDA, Hiroshi. A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: mechanism of tumorotropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs. **Cancer research**, v. 46, n. 12 Part 1, p. 6387-6392, 1986.

MELDRUM, F. C.; HEYWOOD, B. R.; MANN, S. Magnetoferritin: in vitro synthesis of a novel magnetic protein. **Science**, v. 257, n. 5069, p. 522-524, 1992.

MELLMAN, Ira; COUKOS, George; DRANOFF, Glenn. Cancer immunotherapy comes of age. **Nature**, v. 480, n. 7378, p. 480, 2011.

MEYRON-HOLTZ, E. G.; MOSHE-BELIZOWSKI, S.; COHEN, L. A. A possible role for secreted ferritin in tissue iron distribution. **Journal of neural transmission**, v. 118, n. 3, p. 337-347, 2011.

MICHAEL, Riediker. **Compendium of projects in the European nanosafety cluster**. 2013.

MIRANDA-VILELA, A. L.; PEIXOTO, R.C.A.; LONGO, J. P.; CINTRA, D. O. S.; PORTILHO, F.A.; CAIADO, K. L.; SARTORATTO, P.P.C.; BAO, S.N.; AZEVEDO, R. B.; LACAVA, Z.G.M. Dextran-Functionalized Magnetic Fluid Mediating Magnetohyperthermia Combined with Preventive Antioxidant Pequi-Oil Supplementation: Potential Use Against Cancer. **J Biomedical Nanotechnology**. v.9, p.1261 - 1271, 2013.

MIRANDA-VILELA, Ana Luisa *et al.* Oil rich in carotenoids instead of vitamins C and E as a better option to reduce doxorubicin-induced damage to normal cells of Ehrlich tumor-bearing

- mice: hematological, toxicological and histopathological evaluations. **The Journal of nutritional biochemistry**, v. 25, n. 11, p. 1161-1176, 2014.
- 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.
- MOGNETTI, B.; DI CARLO, F.; BERTA, G. N. Animal models in oral cancer research. **Oral oncology**, v. 42, n. 5, p. 448-460, 2006.
- MONGE-FUENTES, V. Estudo da biodistribuição e biocompatibilidade de nanopartículas magnéticas à base de maguemita recobertas com DMSA em macacos-prego (*Cebus spp.*) juvenis mediante análise morfológica. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde), Universidade de Brasília, Brasília, 2009.
- MORAIS, P. C. *et al.* Preparation and characterization of ultra-stable biocompatible magnetic fluids using citrate-coated cobalt ferrite nanoparticles. **Thin solid films**, v. 515, n. 1, p. 266-270, 2006.
- MORNET, Stéphane *et al.* Magnetic nanoparticle design for medical applications. **Progress in Solid State Chemistry**, v. 34, n. 2-4, p. 237-247, 2006.
- MORSY, Gamal M.; EL-ALA, Kawther S. Abou; ALI, Atef A. Studies on fate and toxicity of nanoalumina in male albino rats: Some haematological, biochemical and histological aspects. **Toxicology and industrial health**, v. 32, n. 4, p. 634-655, 2016.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL. Guide for the care and use of laboratory animals. **National Academies Press**, 2010.
- NAVARRETE, Matilde H. *et al.* A fast comet assay variant for solid tissue cells. The assessment of DNA damage in higher plants. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 389, n. 2, p. 271-277, 1997.
- NAYA, Masato *et al.* In vivo genotoxicity study of titanium dioxide nanoparticles using comet assay following intratracheal instillation in rats. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 62, n. 1, p. 1-6, 2012.

NEHOFF, Hayley *et al.* Nanomedicine for drug targeting: strategies beyond the enhanced permeability and retention effect. **International journal of nanomedicine**, v. 9, p. 2539, 2014.

NEUWELT, Edward A. *et al.* Imaging of iron oxide nanoparticles by MR and light microscopy in patients with malignant brain tumours. **Neuropathology and applied neurobiology**, v. 30, n. 5, p. 456-471, 2004.

NIELSEN, Ole Steen; HORSMAN, M.; OVERGAARD, J. A future for hyperthermia in cancer treatment?. 2001.

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.

NISHIKAWA, Takashi *et al.* Study of a rat skin in vivo micronucleus test: data generated by mitomycin C and methyl methanesulfonate. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 444, n. 1, p. 159-166, 1999.

OBERDÖRSTER, Günter; OBERDÖRSTER, Eva; OBERDÖRSTER, Jan. Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. **Environmental health perspectives**, v. 113, n. 7, p. 823, 2005.

OHGAMI, R. S.; CAMPAGNA, D. R.; GREER, E. L.; ANTIOCHOS, B.; MCDONALD, A.; CHEN, J.; SHARP, J. J.; FUJIWARA, Y.; BARKER, J. E.; FLEMING, M. D. Identification of a ferrireductase required for efficient transferrin-dependent iron uptake in erythroid cells. **Nature genetics**, 37(11), 1264-1269, 2005.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Health topics**. Cancer. Disponível em: <<http://www.who.int/topics/cancer/en/>>. Acesso em: jan. 2018.

ÖSTLING, O.; JOHANSON, K. J. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 123, n. 1, p. 291-298, 1984.

- 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.
- PARDOLL, Drew M. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. **Nature Reviews Cancer**, v. 12, n. 4, p. 252, 2012.
- PATT, Harvey M.; STRAUBE, Robert L. Measurement and nature of ascites tumor growth. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 63, n. 5, p. 728-737, 1956.
- PETRI-FINK, A. *et al.* Development of functionalized superparamagnetic iron oxide nanoparticles for interaction with human cancer cells. **Biomaterials**, v. 26, n. 15, p. 2685-2694, 2005.
- 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.
- POHLMANN, P. R.; SCHWARTSMANN, G. Novas Combinações Terapêuticas. **In Oncologia Molecular**. Ferreira, C. G., Rocha, J.C. (Eds) São Paulo, Brasil. Editora Atheneu. PP 415-427, 2004.
- PORTILHO, F. A. **O uso de nanoesferas de albumina na terapia fotodinâmica e magnetohipertermia do tumor de Ehrlich**. 126p. Tese (Doutorado em Patologia Molecular) - Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília, Brasília, 2011.
- PORTILHO, F. A.; ESTEVANATO, L.L.C.; MIRANDAV, A.L; ALMEIDA, S.M.F.M.; LACAVA, B.M.; SIMIONI, A.; TEDESCO, A.C.; MORAIS, P.C.; LACAVA, Z.G.M. Investigation of a magnetohyperthermia system efficacy. **J Appl Phys**. 109:07B307, 2007a.
- PORTILHO-CORRÊA, F. A. **Avaliação da biocompatibilidade de fluido magnético à base de nanopartículas de maghemita recobertas por polifosfato em camundongos**. 74p. Dissertação (Mestrado em Patologia Molecular) – Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília, Brasília, 2007b.
- QUIMBY, Fred W.; LUONG, Richard H. Clinical chemistry of the laboratory mouse. In: **The Mouse in Biomedical Research** (Second Edition). 2007. p. 171-216.

QURESHI, Muquarrab A. *et al.* Toxic effects of methyl methanesulfonate (MMS) on activated macrophages from chickens. *Environmental and molecular mutagenesis*, v. 13, n. 3, p. 253-262, 1989.

RADOMSKI, Anna *et al.* Nanoparticle-induced platelet aggregation and vascular thrombosis. **British journal of pharmacology**, v. 146, n. 6, p. 882-893, 2005.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; MOORE, P. K. **Farmacologia**. 5ª edição. Rio de Janeiro: Elsevier, p. 789-809, 2004.

RAO, Wei; DENG, Zhong-Shan. A review of hyperthermia combined with radiotherapy/chemotherapy on malignant tumors. **Critical Reviews™ in Biomedical Engineering**, v. 38, n. 1, 2010.

RECALCATI, Stefania *et al.* New functions for an iron storage protein: the role of ferritin in immunity and autoimmunity. **Journal of autoimmunity**, v. 30, n. 1-2, p. 84-89, 2008.

RICHMOND, Ann; SU, Yingjun. Mouse xenograft models vs GEM models for human cancer therapeutics. 2008.

ROMAGNANI, S. Immunological tolerance and autoimmunity. **Internal and emergency medicine**, v. 1, n. 3, p. 187-196, 2006.

ROMERO, C. S. S. **Nanopartículas magnéticas recobertas com citrato e nanocápsulas contendo Selol no tratamento do adenocarcinoma mamário de Ehrlich ortotópico em camundongo Swiss**. 147p. Dissertação (Doutorado em Biologia Animal) - Instituto de Biologia, Universidade de Brasília, Brasília, 2015.

ROSENBERG, Steven A.; YANG, James C.; RESTIFO, Nicholas P. Cancer immunotherapy: moving beyond current vaccines. **Nature medicine**, v. 10, n. 9, p. 909, 2004.

ROSENWEIG, R. E., *Ferrohydrodynamics*, **Cambridge University Press**, New York, 1985.

- ROSSIELLO, R.; CARRIERO, M. V.; GIORDANO, G. G. Distribution of ferritin, transferrin and lactoferrin in breast carcinoma tissue. **Journal of clinical pathology**, v. 37, n. 1, p. 51-55, 1984.
- RUENRAROENGSACK, P.; COOK, J.M.; FLORENCE, A.T. Nanosystem drug targeting: facing up to complex realities. **J. Control Release**, 141(3), 265-276, 2010.
- RUIZ, A. *et al.* Biodistribution and pharmacokinetics of uniform magnetite nanoparticles chemically modified with polyethylene glycol. **Nanoscale**, v. 5, n. 23, p. 11400-11408, 2013.
- SADEGHIANI, N. **Avaliação *in vivo* da biocompatibilidade/toxicidade e biodistribuição de fluido magnético à base de nanopartículas de magnetita recobertas com ácido poliaspártico.** Op. Dissertação (Mestrado em Patologia Molecular) – Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília, Brasília, 2004.
- SADEGHIANI, N. *et al.* Genotoxicity and inflammatory investigation in mice treated with magnetite nanoparticles surface coated with polyaspartic acid. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 289, p. 466-468, 2005.
- SAMANTA, Swapan; DEY, Pranab. Micronucleus and its applications. **Diagnostic cytopathology**, v. 40, n. 1, p. 84-90, 2012.
- SANZ, Beatriz *et al.* Magnetic hyperthermia enhances cell toxicity with respect to exogenous heating. **Biomaterials**, v. 114, p. 62-70, 2017.
- SCHEFFER, Jean Francisco; GONZÁLEZ, Félix HD. Enzimologia clínica em medicina veterinária. Monografia Graduação, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 23p, 2003.
- SCHUH, J. C. L. Trials, tribulations, and trends in tumor modeling in mice. **Toxicologic pathology**, v. 32, n. 1 suppl, p. 53-66, 2004.
- SEO, W. S.; LEE, J. H.; SUN, X.; SUZUKI, Y.; MANN, D.; LIU, Z.; TERASHIMA, M.; YANG, P. C.; MCCONNELL, M. V.; NISHIMURA, D. G.; DAI, H. FeCo/graphitic-shell nanocrystals as advanced magnetic-resonance-imaging and near-infrared agents. **Nature materials**, 5(12), 971-976, 2006.

SHAW, B. L.; BATTLE, H. I. The gross and microscopic anatomy of the digestive tract of the oyster *Crassostrea virginica* (Gmelin). **Canadian Journal of Zoology**, v. 35, n. 3, p. 325-347, 1957.

SHAW, Duncan James. **Introdução à Química dos Colóides e de Superfícies**. E. Blücher, 1975.

SKOTLAND, Tore; IVERSEN, Tore-Geir; SANDVIG, Kirsten. New metal-based nanoparticles for intravenous use: requirements for clinical success with focus on medical imaging. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 6, n. 6, p. 730-737, 2010.

SLIWINSKA, Agnieszka *et al.* Genotoxicity and cytotoxicity of ZnO and Al₂O₃ nanoparticles. **Toxicology mechanisms and methods**, v. 25, n. 3, p. 176-183, 2015.

SILVA, Máisa *et al.* Iron overload alters glucose homeostasis, causes liver steatosis, and increases serum triacylglycerols in rats. **Nutrition research**, v. 28, n. 6, p. 391-398, 2008.

SINGH, Narendra P. *et al.* A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental cell research**, v. 175, n. 1, p. 184-191, 1988.

SINGH, Neenu *et al.* NanoGenotoxicology: the DNA damaging potential of engineered nanomaterials. **Biomaterials**, v. 30, n. 23, p. 3891-3914, 2009.

SINGH, Neenu *et al.* Potential toxicity of superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPION). **Nano reviews**, v. 1, n. 1, p. 5358, 2010.

SMITH, B. R.; KEMPEN, P.; BOULEY, D.; XU, A.; LIU, Z.; MELOSH, N.; DAI, H. J.; SINCLAIR, R.; GAMBHIR, S. S. Shape matters: intravital microscopy reveals surprising geometrical dependence for nanoparticles in tumor models of extravasation. **Nano Lett**, 12(7), 3369-3377, 2012.

SON, S. J.; REICHEL, J.; HE, B.; SCHUCHMAN, M.; LEE S. B. Magnetic nanotubes for magnetic-field-assisted bioseparation, biointeraction, and drug delivery. **J Am Chem Soc**; 127: 7316-7317, 2005.

- SONG, Ming-Fen *et al.* Metal nanoparticle-induced micronuclei and oxidative DNA damage in mice. **Journal of clinical biochemistry and nutrition**, v. 50, n. 3, p. 211-216, 2012.
- SOUSA, M. H. *et al.* Chemical analysis of size-tailored magnetic colloids using slurry nebulization in ICP-OES. **Microchemical Journal**, v. 97, n. 2, p. 182-187, 2011.
- SPERLING, R. A.; CASALS, E.; COMENGE, J.; BASTUS, N. G.; PUNTES, V.F. Inorganic Engineered Nanoparticles and their Impact on the Immune System. **Curr Drug. Metab** , 10(8), 895-904, 2009.
- STROHBEHN, John W.; DOUPLE, Evan B. Hyperthermia and cancer therapy: A review of biomedical engineering contributions and challenges. **IEEE Transactions on biomedical engineering**, n. 12, p. 779-787, 1984.
- STUCKEY, A. Breast cancer: epidemiology and risk factors. **Clin Obstet Gynecol**, v. 54, n.1, p. 96-102, 2011.
- SUN, SHOUHENG; ZENG, HAO. Size-controlled synthesis of magnetite nanoparticles. **Journal of the American Chemical Society**, v. 124, n. 28, p. 8204-8205, 2002.
- SUN, SHOUHENG *et al.* Monodisperse mfe₂o₄ (m= fe, co, mn) nanoparticles. **Journal of the American Chemical Society**, v. 126, n. 1, p. 273-279, 2004.
- SUN, Conroy *et al.* In vivo MRI detection of gliomas by chlorotoxin-conjugated superparamagnetic nanoprobos. **small**, v. 4, n. 3, p. 372-379, 2008.
- TANEICHI, M.; ISHIDA, H.; KAJINO, K.; OGASAWARA, K.; TANAKA, Y.; KASAI, M.; MORI, M.; NISHIDA, M.; YAMAMURA, H.; MIZUGUCHI, J.; UCHIDA, T. Antigen chemically coupled to the surface of liposomes are cross-presented to CD8⁺ T cells and induce potent antitumor immunity. **The Journal of Immunology**, 177(4), 2324-2330, 2006.
- THEIL, E. C. Ferritin: Structure, Gene Regulation, and Cellular Function in Animals, Plants, and Microorganisms. **Annu. Rev. Biochem.** 56, 289-315, 1987.
- THRALL, Mary Anna. Hematologia e bioquímica clínica veterinária. **Editora Roca**, 2007.

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

TORTI, F. M., TORTI, S. V. Regulation of ferritin genes and protein. **Blood** 99:3505–3516, 2002.

TORTI, S. V.; TORTI, F. M. Iron and cancer: more ore to be mined. **Nat. Rev. Cancer** 13: 342–355, 2013.

TOURINHO, F. A. *et al.* Electric Double Layered Magnetic Fluids (EDL-MF) based on spinel ferrite nanostructures [(M_{1-x}+ 2Fe_x+ 3) A [(Fe_{2-x}+ 3 M_x+ 2) BO₄-2]. **Brazilian journal of physics**, v. 28, n. 4, p. 00-00, 1998.

UCHIDA, M.; FLENNIKEN, M. L.; ALLEN, M.; WILLITS, D. A.; CROWLEY, B. E.; BRUMFIELD, S.; WILLIS, A. F.; JACKIW, L.; JUTILA, M.; YOUNG, M. J.; DOUGLAS, T. Targeting of cancer cells with ferrimagnetic ferritin cage nanoparticles. **Journal of the American Chemical Society**, 128(51), 16626-16633, 2006.

UCHIDA, M.; WILLITS, D. A.; MULLER, K.; WILLIS, A. F.; JACKIW, L.; JUTILA, M.; YOUNG, M. J.; PORTER, A. E.; DOUGLAS, T. Intracellular distribution of macrophage targeting ferritin-iron oxide nanocomposite. **Adv Mater**. 21(4):458–462, 2009.

VALERO, E.; TAMBALO, S.; MARZOLA, P.; ORTEGA-MUÑOZ, M.; LÓPEZ-JARAMILLO, F. J.; SANTOYO-GONZÁLEZ, F.; DE DIOS LÓPEZ, J.; DELGADO, J. J.; CALVINO, J. J.; CUESTA, R.; DOMÍNGUEZ-VERA, J. M.; GÁLVEZ, N. Magnetic nanoparticle-templated assembly of protein subunits: a new platform for carbohydrate-based MRI nanoprobes. **J Am Chem Soc**. 133(13):4889–4895, 2011.

VANNUCCI, L.; FALVO, E.; FORNARA, M.; DI MICCO, P.; BENADA, O.; KRIZAN, J.; SVOBODA, J.; HULIKOVA-CAPKOVA, K.; MOREA, V.; CECI, P. Selective targeting of melanoma by PEG-masked protein-based multifunctional nanoparticles. **Int J of Nanomed**, 7, 2012.

VAN VULPEN, M. *et al.* Radiotherapy and hyperthermia in the treatment of patients with locally advanced prostate cancer: preliminary results. **BJU international**, v. 93, n. 1, p. 36-41, 2004.

VARNA, Mariana *et al.* In vivo distribution of inorganic nanoparticles in preclinical models. **Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology**, v. 3, n. 02, p. 269, 2012.

VECCHIO, Mary M. *et al.* Breast cancer screening in the high-risk population. **Asia-Pacific Journal of Oncology Nursing**, v. 5, n. 1, p. 46, 2018.

VIANA, Fernando A. Bretas. Guia terapêutico veterinário. **CEM: Belo Horizonte, Brazil**, 2007.

VIOLATO, N. M. *et al.* Higher insulin sensitivity and impaired insulin secretion in cachectic solid Ehrlich tumour-bearing mice. **Hormone and Metabolic Research**, v. 46, n. 09, p. 615-620, 2014.

XIA, Dong-Lin *et al.* Comparative Study of Biosafety, DNA, and Chromosome Damage of Different-Materials-Modified Fe₃O₄ in Rats. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 177, n. 5, p. 1069-1082, 2015.

WAN, Shourong *et al.* Biocompatible superparamagnetic iron oxide nanoparticle dispersions stabilized with poly (ethylene glycol)–oligo (aspartic acid) hybrids. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 80, n. 4, p. 946-954, 2007.

WANG, W.; KNOVICH, M. A.; COFFMAN, L. G.; TORTI, F. M.; TORTI, S. V. Serum ferritin: past, present and future. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, 1800(8), 760-769, 2010.

WATANABE, Masatoshi *et al.* Effects of Fe₃O₄ magnetic nanoparticles on A549 cells. **International journal of molecular sciences**, v. 14, n. 8, p. 15546-15560, 2013.

WEINBERG, Robert. **The biology of cancer**. Garland science, 2013.

WEINSTEIN, R. E.; BOND, B. H.; SILBERBERG, B. K. Tissue ferritin concentration in carcinoma of the breast. **Cancer**, v. 50, n. 11, p. 2406-2409, 1982.

WEINSTEIN, R. E.; BOND, B. H.; SILBERBERG, B. K.; VAUGHN, C. B.; SUBBAIAH, P.; PIEPER, D. R. Tissue ferritin concentration and prognosis in carcinoma of the breast. **Breast cancer research and treatment**, v. 14, n. 3, p. 349-353, 1989.

WIJAYANTI, N.; KATZ, N.; IMMENSCHUH, S. Biology of heme in health and disease. **Current medicinal chemistry**, v. 11, n. 8, p. 981-986, 2004.

WILSON, K. S. *et al.* A generalized method for magnetite nanoparticle steric stabilization utilizing block copolymers containing carboxylic acids. **European cells and materials**, v. 3, n. 2, p. 206-209, 2002.

WONG, K. K. W; MANN, S. Biomimetic synthesis of cadmium sulfide-ferritin nanocomposites. **Advanced Materials**, v. 8, n. 11, p. 928-932, 1996.

YANG, Ta-I.; CHANG, Su-Hua. Controlled synthesis of metallic iron nanoparticles and their magnetic hyperthermia performance in polyaniline composite nanofibers. **Nanotechnology**, v. 28, n. 5, p. 055601, 2016.

YU, M.; PARK, J.; JON, S. Targeting Strategies for Multifunctional Nanoparticles in Cancer Imaging and Therapy. **Theranostics**, v. 2, n. 1, p. 3-44, 2012.

ZHAO, Yanzhao *et al.* Bioengineered magnetoferritin nanoprobos for single-dose nuclear-magnetic resonance tumor imaging. **ACS nano**, v. 10, n. 4, p. 4184-4191, 2016.

ZHEN, Z., TANG, W., CHEN, H., LIN, X., TODD, T., WANG, G., COWGER, T.; CHEN, X.; XIE, J. RGD-modified apoferritin nanoparticles for efficient drug delivery to tumors. **ACS nano**, 7(6), 4830-4837, 2013a.

ZHEN, Zipeng *et al.* Ferritin nanocages to encapsulate and deliver photosensitizers for efficient photodynamic therapy against cancer. **ACS nano**, v. 7, n. 8, p. 6988-6996, 2013b.



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

Brasília, 19 de maio de 2016.



DECLARAÇÃO

Declaramos que o projeto intitulado “**AVALIAÇÃO IN VIVO DE NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS RECOBERTAS COM FERRITINA NO TRATAMENTO DE CÂNCER DE MAMA.**”, UnBDoC n.º 29574/2016, sob responsabilidade da Professora Zulmira Guerrero Marques Lacava foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) da Universidade de Brasília. Este projeto foi aprovado para utilização de SWISS: 105. A presente aprovação é válida pelo período de 01/05/2016 a 11/04/2020.

Prof. Dra. Paula Diniz Galera
Coordenadora da CEUA – UnB



*Este documento se restringe à avaliação ética do projeto supracitado e não substitui outras licenças e permissões que porventura se façam necessárias.

ANEXO 2: - Fotomicrografia do baço em CP, C1, C2 e C3

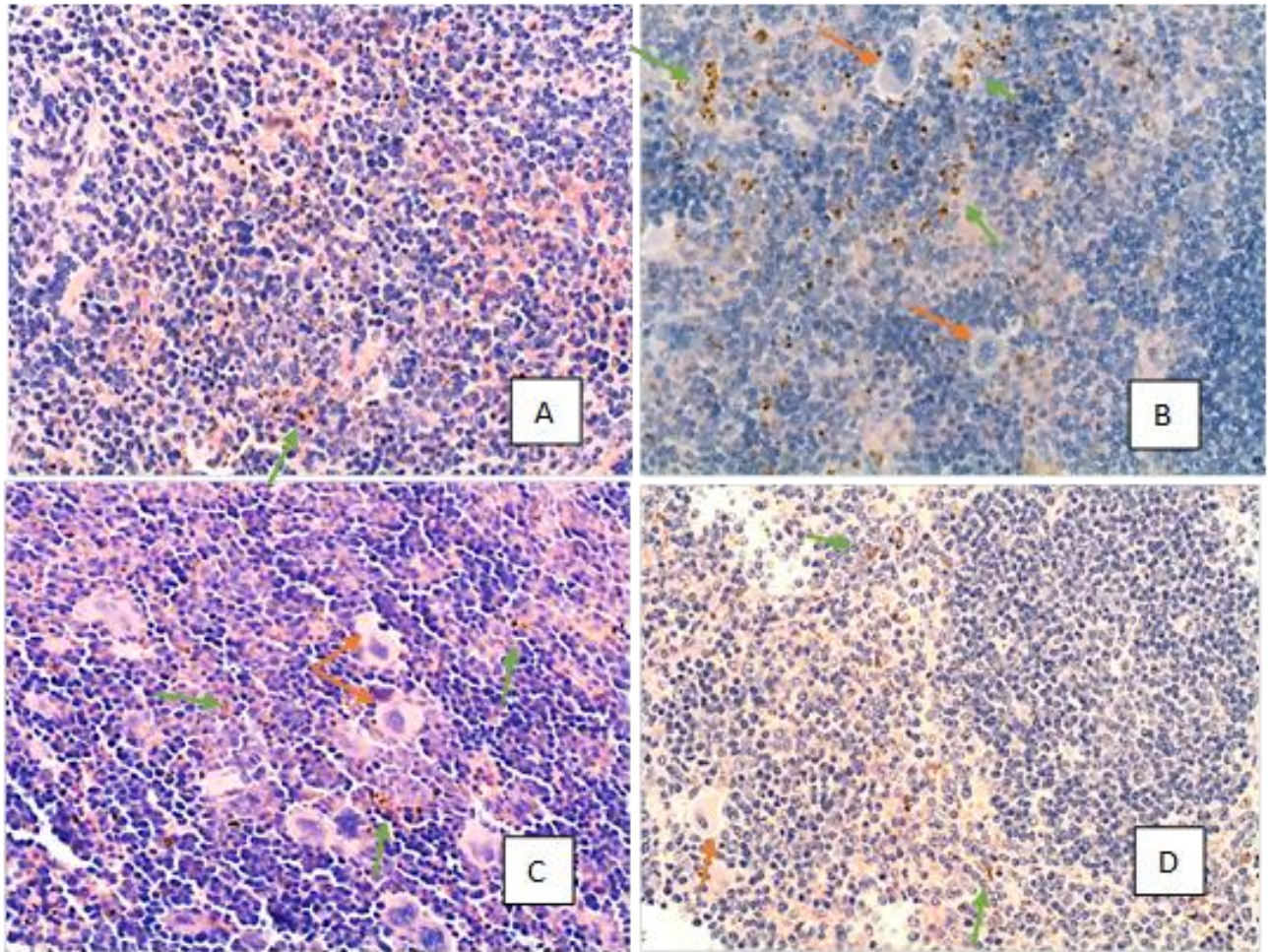


Figura 48 - - Fotomicrografia do baço em CP (A), C1 (B), C2(C) e C3(D). Hemossiderose (seta verde) e hematopoiese (seta laranja). A, B, C e D (HE, 200X);

ANEXO 3: Fotomicrografia do cérebro em CP, C1, C2 e C3

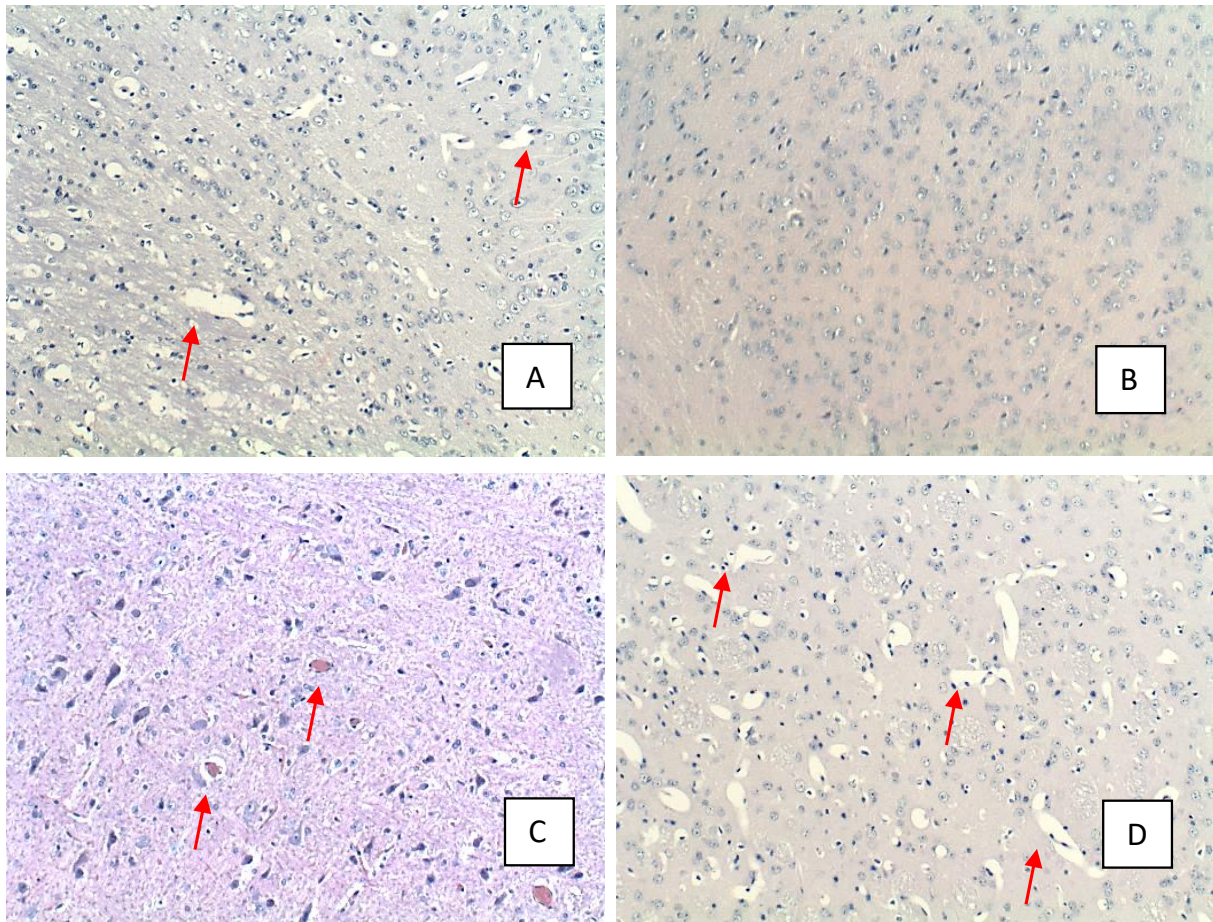


Figura 49 - Fotomicrografia do cérebro em CP (A), C1 (B), C2(C) e C3(D). Congestão e edema perivascular (seta vermelha) em A, C e D. (HE 100X) em A, B, C e D.

ANEXO 4: Fotomicrografia do fígado em CP (A), C1 (B), C2(C) e C3

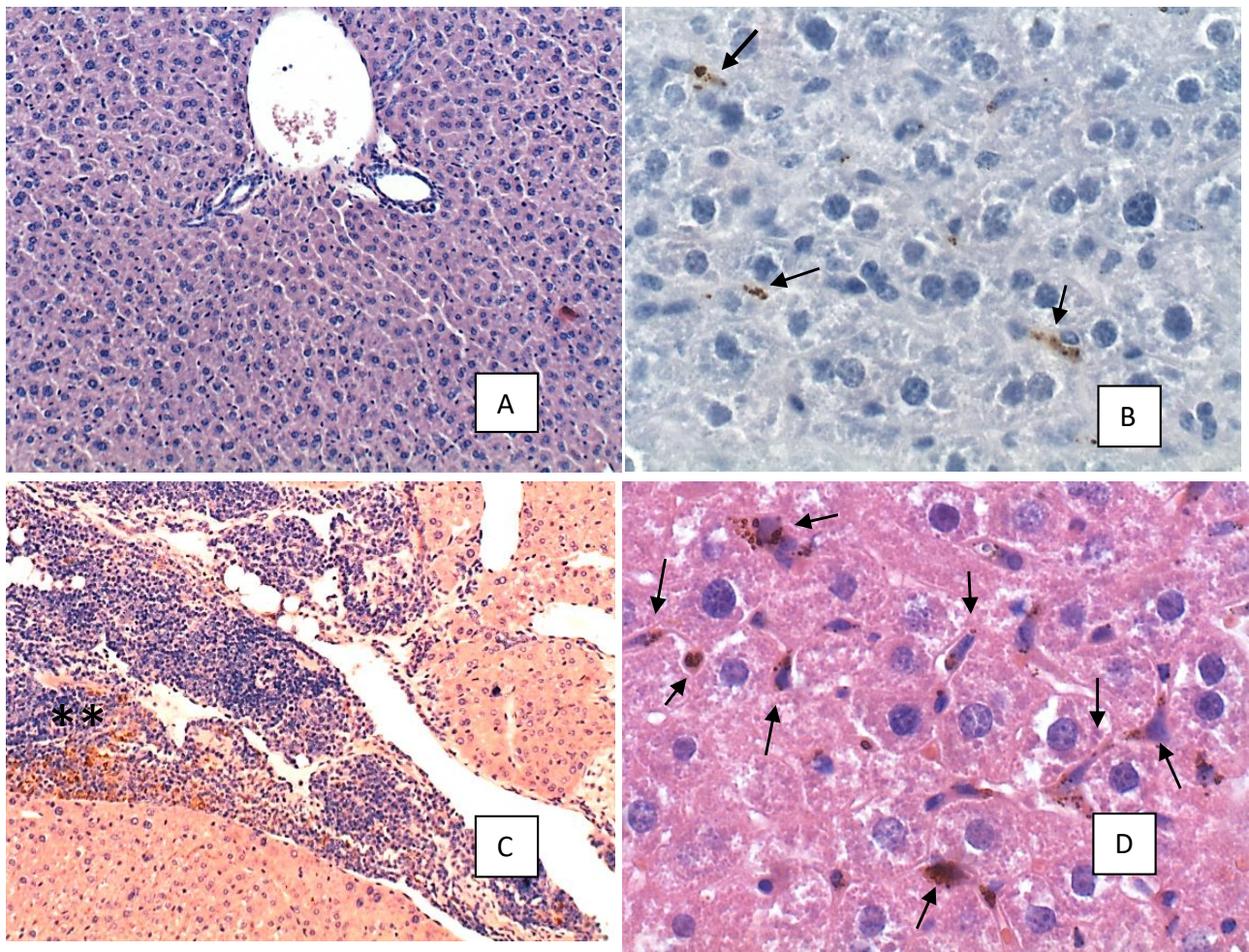


Figura 50 - Fotomicrografia do fígado em CP (A), C1 (B), C2(C) e C3(D). Hemossiderose intra-hepática (seta preta em células de kupffer) em B e D. (**) Inflamação com hemossiderose no tecido conjuntivo peri-hepático (C); tecido normal em A. HE, A (200X), B e D(400X) e C (100X).

ANEXO 5: Fotomicrografia do linfonodo normal em CP, C1, C2 e C3

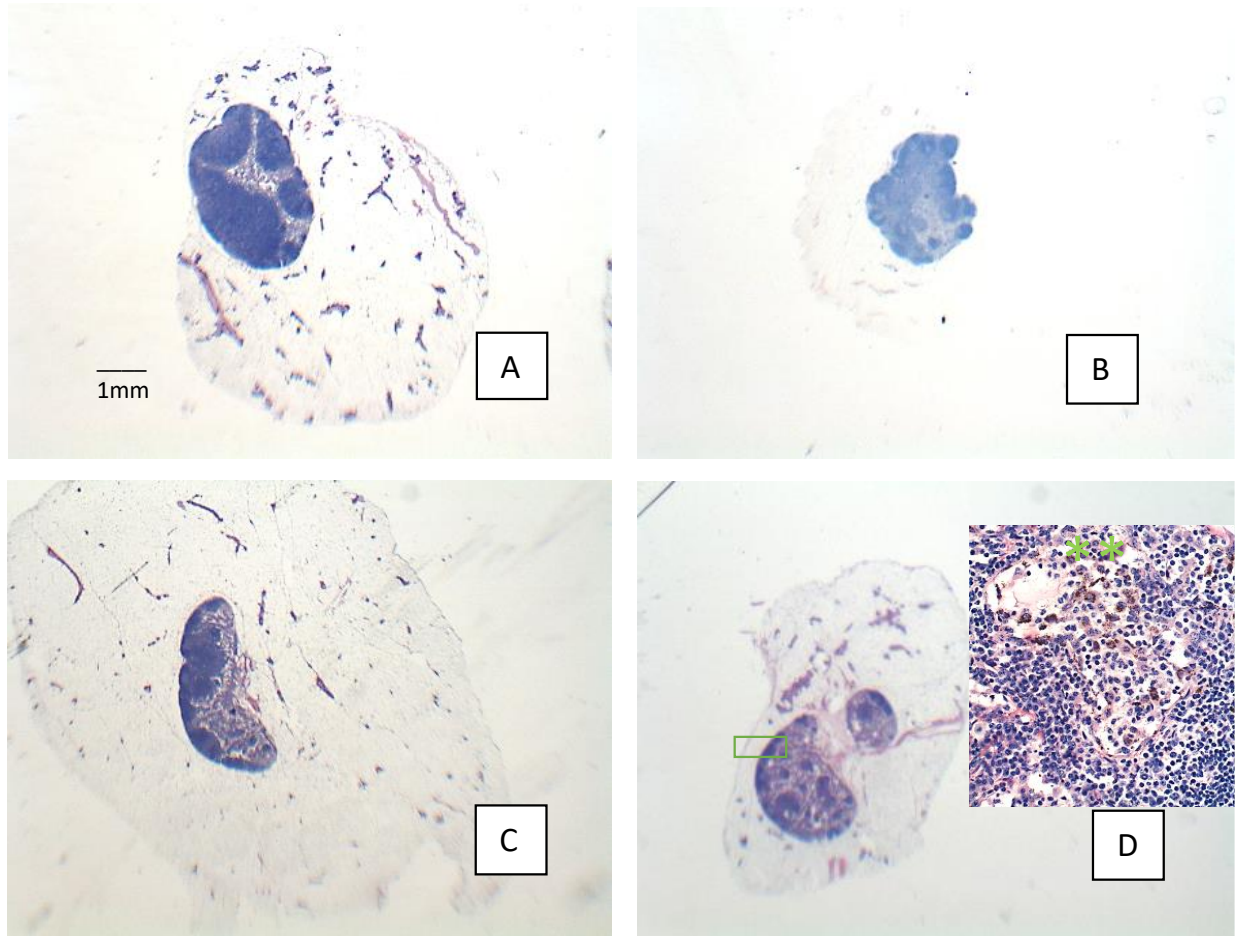


Figura 51 - Fotomicrografia do linfonodo normal em CP (A), C1 (B) e C2 (C). Em D (C3), hemossiderose.

ANEXO 6: Fotomicrografia do pulmão em CP, C1, C2 e C3

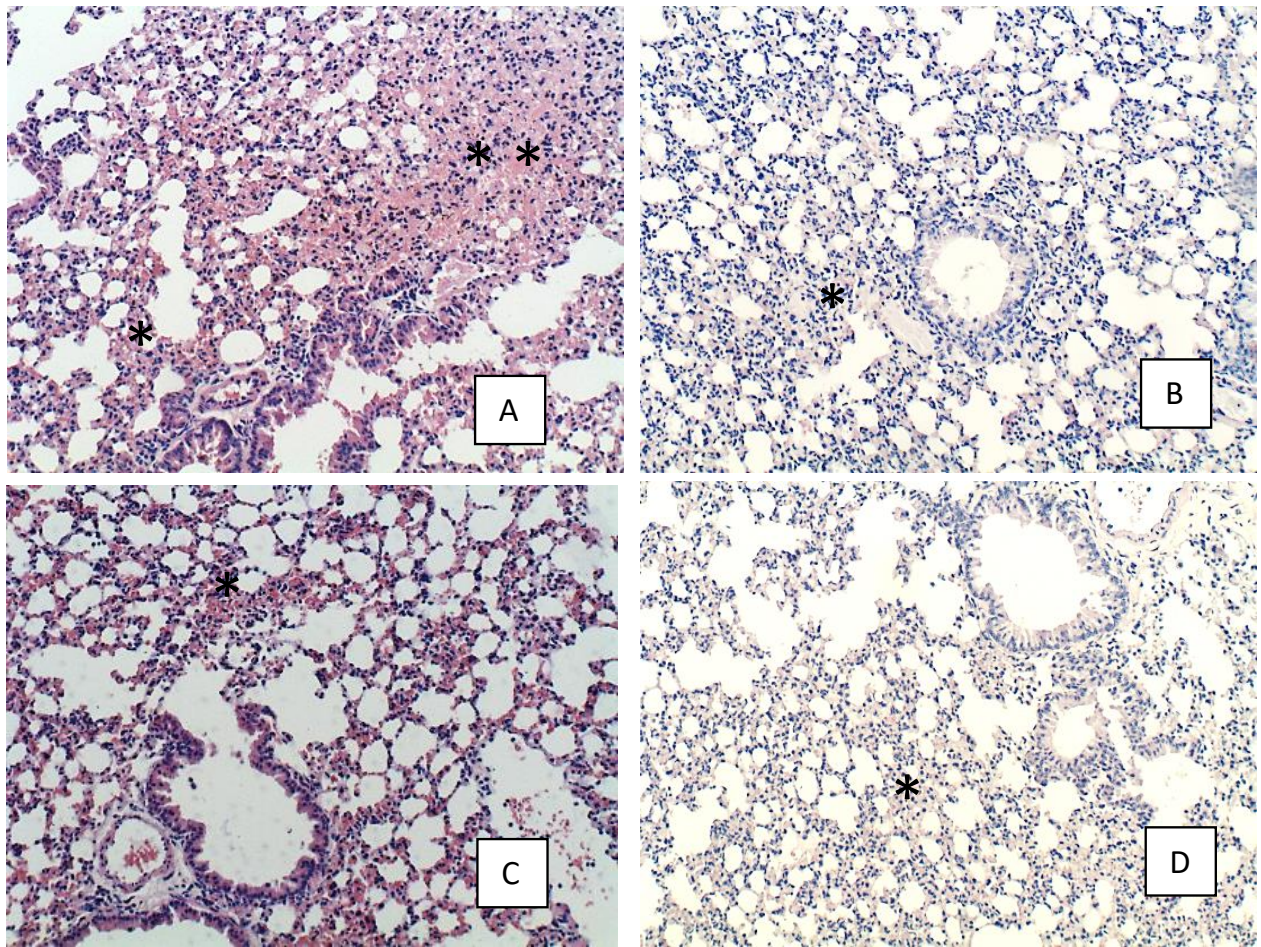


Figura 52 - Fotomicrografia do pulmão em CP (A), C1 (B), C2(B) e C3(D); *congestão, **congestão com hemorragia. A, B, C e D (HE, 100X).

ANEXO 7: Fotomicrografia do rim em CP (A), C1 (B), C2(B) e C3

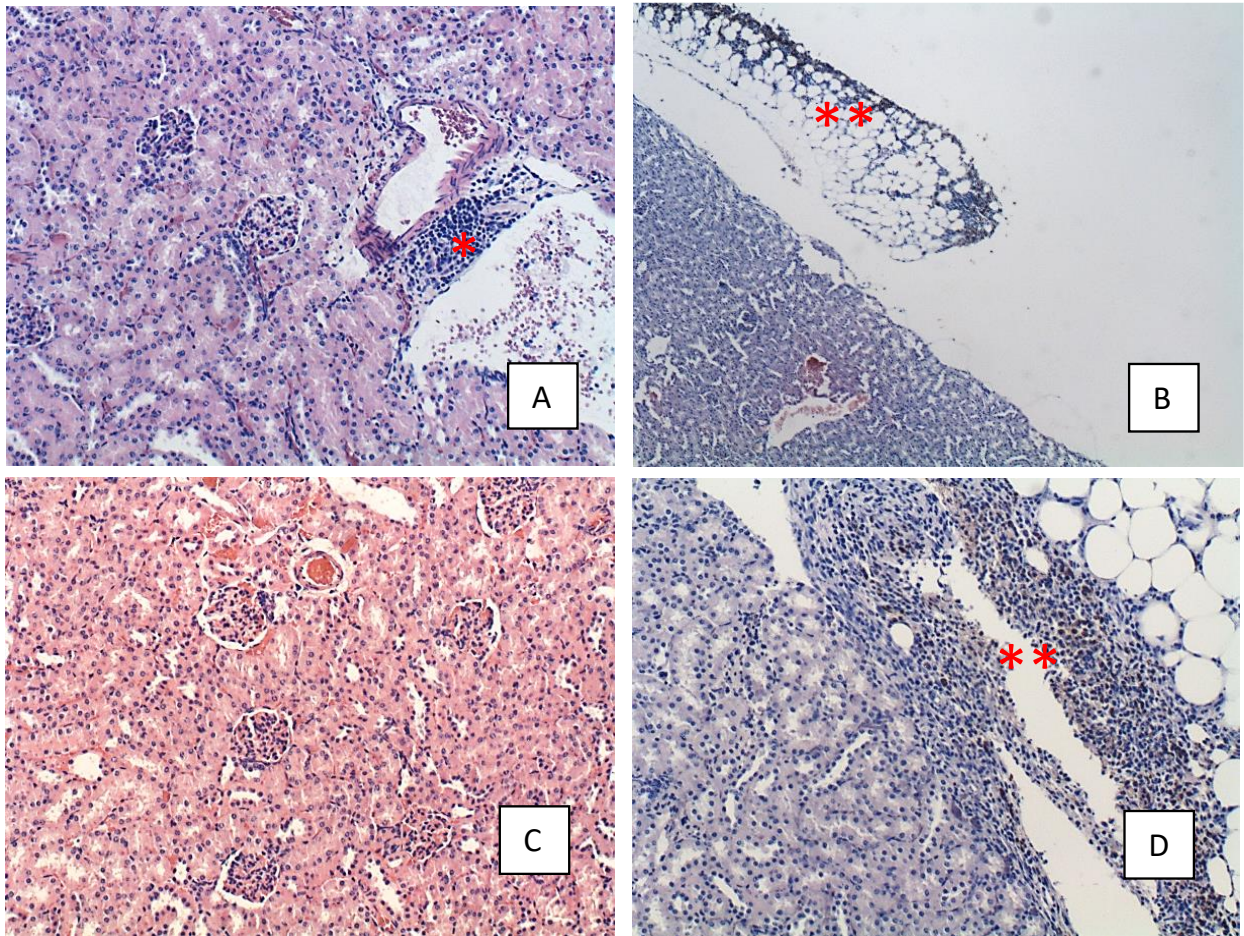


Figura 53 - Fotomicrografia do rim em CP (A), C1 (B), C2(B) e C3(D); *inflamação, ** inflamação com hemossiderose no tecido perirrenal. A, C e D (HE, 100X); B (HE,25X)