

**Universidade de Brasília
Faculdade de Medicina**

Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular

**BIODISTRIBUIÇÃO E EFICÁCIA TERAPÊUTICA DE
NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS RECOBERTAS COM CITRATO E
NANOCÁPSULAS DE SELOL NO TRATAMENTO DO
ADENOCARCINOMA MAMÁRIO EM CAMUNDONGOS IDOSAS**

Brasília, 2019



Universidade de Brasília

Faculdade de Medicina

Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular

WILLIE OLIVEIRA PINHEIRO

Tese de Doutorado

**BIODISTRIBUIÇÃO E EFICÁCIA TERAPÊUTICA DE
NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS RECOBERTAS COM CITRATO E
NANOCÁPSULAS DE SELOL NO TRATAMENTO DO
ADENOCARCINOMA MAMÁRIO EM CAMUNDONGOS IDOSAS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular da Universidade de Brasília como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Doutor em Patologia Molecular

Área de concentração: Genética

Orientadora: Profa. Dra. Zulmira Guerrero Marques Lacava

Brasília, 2019

Willie Oliveira Pinheiro

Título: Biodistribuição e eficácia terapêutica de nanopartículas magnéticas recobertas com citrato e nanocápsulas de Selol no tratamento do adenocarcinoma mamário em camundongos idosos

Data: 18/03/2019

Horário: 14h: 30min

Local: Auditório da Pós Graduação da Faculdade de Medicina

Banca Examinadora

Profa. Dra. Zulmira Guerrero Marques Lacava (Presidente)

Instituição: UnB

Profa. Dra. Rosangela Vieira de Andrade (Membro)

Instituição: UCB

Prof. Dr. Márcio José Poças Fonseca (Membro)

Instituição: UnB

Profa. Dra. Maria de Fátima Menezes Almeida Santos (Membro)

Instituição: UnB

Prof. Dr. Nicholas Zufelato (Suplente)

Instituição: CNPq/UnB

Dedicatória

À minha família, de maneira especial ao meu pai, seu Valdeci, minha esposa Lalinha e minha sogra, dona Helena, que com muito amor, carinho e apoio, não mediram esforços para que eu cumprisse mais esta etapa em minha vida, à memória da minha mãe, dona Maria, que sempre acreditou em mim e me incentivou a buscar a realização dos meus sonhos.

Agradecimentos

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela oportunidade de realização do curso, mediante a concessão da bolsa.

A minha orientadora Professora Dra. Zulmira Guerrero Marques Lacava pelas orientações, apoio, compreensão e pela amizade.

Aos Professores, Dra. Kelly Grace Magalhães, Dr. Marcelo Henrique Sousa, Dr. Paulo Eduardo Narcizo de Souza, Dr. Marcos Célio de Almeida, Dr. César Koppe Grisolia e Dra. Emília Célia de Oliveira Lima e Dr. Ricardo Bentes de Azevedo pela colaboração nos experimentos, revisões de escrita e análises dos dados.

Aos meus colegas e amigos colaboradores, Maria Luiza, Khellida, Laíse, Gabriel, Fred, Maria e Jaqueline por compartilhar comigo momentos riquíssimos de aprendizagem e crescimento, assim como partilhar das angústias e medos.

Aos voluntários que participaram do projeto que com simplicidade se dispuseram a colaborar. A todos os professores e funcionários do Departamento de Genética e Morfologia. De maneira toda especial à dona Zélia.

A todos os amigos que sentiram minha ausência durante esses difíceis anos. Agradeço por não deixarem de me apoiar em nenhum momento.

Aos meus familiares que sempre me estimularam e ajudaram em especial à minha esposa Larisse que suportou comigo o estresse inerente do processo, ao meu pai, seu Valdeci, e minha sogra, dona Helena, que sempre estiveram comigo suprindo todas as necessidades materiais e emocionais.

Deus pela vida e por todas as bênçãos recebidas.

Resumo

Nanopartículas magnéticas (NPMs) têm sido testadas com sucesso em muitas aplicações biomédicas, como direcionamento sítio-específico, liberação controlada de fármacos e na magnetohipertermia (MHT) para tratamento do câncer. Entretanto, é notável que ainda seja escasso o conhecimento relacionado aos efeitos das nanoestruturas em organismos idosos, mais suscetíveis ao câncer e outras patologias. Visando contribuir para minimizar esta lacuna, a primeira etapa deste trabalho objetivou investigar aspectos da biocompatibilidade e biodistribuição de NPMs cobertos com citrato (NpCit) em camungos fêmeas saudáveis idosas e jovens. A amostra NpCit foi administrada intraperitonealmente e sua toxicidade foi avaliada por 28 dias através de exames clínicos, bioquímicos, hematológicos e histopatológicos. Além disso, sua biodistribuição foi avaliada pela espectrometria de emissão óptica de plasma acoplada por indutividade (ICP-OES) e métodos morfológicos. NpCit apresentou efeitos idade-dependentes. A amostra induziu alterações bioquímicas e hematológicas muito leves e temporárias nos animais jovens. Estas alterações eram ainda mais leves do que os efeitos do processo de envelhecimento, especialmente quando relacionados aos dados hematológicos e níveis de TNF- α e óxido nítrico (NO). Por outro lado, NpCit mostrou uma série de resultados diferentes no grupo idoso, algumas vezes reforçando (leucócitos), outras se opondo (eritrócitos) aos efeitos do envelhecimento. As alterações dos leucócitos foram observadas até o 28º dia de tratamento no grupo idoso. Uma ligeira evidência de decréscimo nas funções imunes e hepáticas foi detectada nos camundongos fêmeas idosas tratados ou não com a NpCit. Entretanto, danos teciduais ou alterações clínicas relacionadas com o envelhecimento ou tratamento com NpCit nunca foram observadas. O padrão de distribuição do ferro foi diferente em função da idade ou da administração da NpCit. As concentrações de ferro/NpCit foram maiores nos camundongos fêmeas idosas em todos os grupos observados. Os dados revelam diferenças importantes entre animais idosos e jovens administrados com NpCit que devem ser levadas em conta quando as estratégias nanobiotecnológicas são aplicadas para o tratamento de organismos idosos. Na segunda etapa do trabalho, a eficácia da MHT, o aumento de temperatura promovido pelas NPMs expostas a um campo magnético alternado, mediada pela NpCit combinada com a quimioterapia usando nanocápsulas de PLGA contendo Selol (NcSel) foi avaliada no tratamento do tumor de mama em camundongos *Swiss* idosas. Os resultados mostraram que a combinação da MHT e da NcSel reduziram, significativamente, o volume do tumor em comparação com todos os demais grupos especialmente o grupo tratados com paclitaxel (fármaco padrão utilizado no tratamento de câncer de mama). Além disso, observou-se aumento da sobrevida, ausência de metástases nos linfonodos, fígado e pulmões 45 dias após a indução. Notavelmente, foi observada a diminuição dos níveis de TNF α , pró-inflamatório, cujo aumento está associado ao estágio terminal no tumor sólido de Ehrlich. Os resultados evidenciam que NpCit é uma amostra biocompatível e seu uso potencial na MHT combinada com antioxidantes nanoencapsulados em pacientes idosos com tumor de mama. Em adição, os dados enfatizam a necessidade de mais estudos em animais idosos para melhor estender os benefícios da nanotecnologia para a população idosa.

Palavras-chave: Biodistribuição, Câncer de mama, Magnetohipertermia, envelhecimento, Nanotoxicidade, Terapias combinadas

Abstract

Magnetic nanoparticles (MNPs) have been successfully tested for several purposes in medical applications, such as targeting and controlled drug release, and magnetohyperthermia (MHT) for cancer treatment. However, it is noteworthy that there is still scarce knowledge concerning the effects of nanostructures on elderly organisms, more susceptible to cancer and other diseases. To contribute to minimize this gap, in its first step this work aimed to investigate biocompatibility and biodistribution aspects of MNPs coated with citrate (NpCit) in both elderly and young healthy female mice. The NpCit sample was administered intraperitoneally, and its toxicity was evaluated for 28 days through clinical, biochemical, hematological and histopathological examinations. In addition, its biodistribution was evaluated by spectrometric (Inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP OES) and morphological methods. NpCit presented age-dependent effects. The sample induced very slight and temporary biochemical and hematological changes in young animals. These changes were even weaker than the effects of the aging process, especially when related to the hematological data and TNF- α and nitric oxide (NO) levels. On the other hand, NpCit showed a distinct set of results in the elderly group, sometimes reinforcing (leukocytes), sometimes opposing (erythrocytes) the aging changes. Leukocyte changes were still observed on the 28th day after treatment in the elderly group. Slight evidence of a decrease in liver and immune functions was detected in elderly mice treated or not treated with NpCit. However, tissue damages or clinical changes related to aging or to the NpCit treatment were never observed. The pattern of iron distribution was different in function of aging or NpCit administration. Extra iron was detected until the 28th day after NpCit administration, but in different organs of elderly and young mice. Data reveal important differences between treated elderly and young animals that should be taken in account when apply nanotechnology strategies for aged organism treatment. In the second step, the efficacy of MHT mediated by NpCit combined with chemotherapy using nanocapsules of the antioxidant Selol (NcSel) was evaluated for breast tumor treatment of elderly *Swiss* mice. MHT, the increase in temperature promoted by MNPs exposed to an alternating magnetic field, was capable to reduce the tumor volume without affecting the adjacent healthy tissue or distant organs. The benefits of MHT against cancer were even improved by the association with the chemotherapeutic NcSel: reduction of tumor volume, even bigger than that of paclitaxel (pattern drug for breast cancer treatment); significant increased survival; absence of metastases in the lymph nodes, liver and lungs until 45 days after tumor induction; and decreased levels of TNF α that is associated with poor prognosis in Ehrlich tumor. Results evidenced the NpCit as a biocompatible sample and the potential use of MHT combined with nanoencapsulated antioxidants in elderly patients with breast cancer. In addition, data emphasizes the need for further studies in older animals to appropriately extend the benefits of nanotechnology to the elderly population.

Key words: Ageing, Biodistribution, Breast cancer, Combined therapy, Magnetohyperthermia, Nanotoxicity

LISTA DE FIGURAS

Figura 01. Múltiplos estágios da metastátese	16
Figura 02. Anatomia da mama humana.....	20
Figura 03. Representação esquemática de diferentes nanoestruturas	25
Figura 04. Metabolismo celular do ferro.....	28
Figura 05. Metabolismo sistêmico do ferro.....	30
Figura 06. Diagrama esquemático do tratamento de hipertermia.....	32
Figura 07. Caracterização de NpCit por microscopia de transmissão eletrônica (MET).....	50
Figura 08. Efeito do tratamento com NpCit (2,4 mg de ferro) sobre o peso corporal médio de camundongos fêmeas idosas (A) e jovens (B).....	50
Figura 09. Efeitos de NpCit (2,4 mg de ferro) sobre os níveis de TNF- α e NO no soro de camundongos fêmeas idosas e jovens	54
Figura 10. Efeitos do NpCit na morfologia do baço, fígado, rim, pulmão e cérebro de camundongos fêmeas idosas e jovens.	55
Figura 11. Biodistribuição de ferro obtida por espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP-OES)	57
Figura 12. Efeitos da NpCit na distribuição de ferro em idosas (coluna da esquerda) e jovens (coluna da direita) obtida por métodos morfológicos.....	58
Figura 13. Caracterização de nanopartículas de maghemita recobertas com citrato (NpCit)..	59
Figura 14. Termografias do NpCit.	60
Figura 15. Caracterização da amostra de nanocápsulas de PLGA contendo Selol (NcSel).....	61
Figura 16. Evolução do volume tumoral em camundongos fêmeas idosas submetidos a diferentes tratamentos.....	63
Figura 17. Pesos tumorais obtidos 30 dias após diferentes tratamentos.....	63
Figura 18. Tumores de mama em camundongos fêmeas idosas submetidos a diferentes tratamentos.	63

Figura 19. Curvas da taxa de sobrevivência de camundongos fêmeas idosas com tumor de mama submetidos a diferentes tratamentos	64
Figura 20. Histopatologia de animais portadores de tumor de Ehrlich induzido na mama, tratados com diferentes terapias e avaliados 30 dias após os tratamentos.....	64
Figura 21. Alteração do peso em camundongos fêmeas idosas submetidos a diferentes tratamentos.	66
Figura 22. Níveis de TNF- α em camundongos fêmeas idosas com tumor submetidos a diferentes tratamentos.....	70
Figura 23. Avaliação da fragmentação do DNA das células da medula óssea do fêmur de camundongos fêmeas idosas com tumor submetidos a diferentes tratamentos.....	70

LISTA DE TABELAS

Tabela 01. Caracterização das nanopartículas de maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) funcionalizadas com citrato (NpCit)	49
Tabela 02. Análise bioquímica de camundongos jovens e idosos após tratamento com NpCit.....	51
Tabela 03. Efeitos do tratamento com NpCit (2,4 mg de ferro) nos parâmetros Leucograma e Plaquetas de camundongos jovens e idosos.....	52
Tabela 04. Análise de eritrograma de camundongos fêmeas idosas e jovens observada em diferentes tempos após administração de NpCit (2,4 mg de ferro)	53
Tabela 05. Caracterização do fluido magnético com NpCit.....	60
Tabela 06. Caracterização de nanocápsulas de PLGA com Selol por <i>DSL</i>	61
Tabela 07. Análise bioquímica em camundongos fêmeas idosas portadoras de tumor com diferentes tratamentos durante duas semanas e eutanasiadas 07 ou 30 dias depois	67
Tabela 08. Eritrograma de camundongos fêmeas idosas portadoras de tumor com diferentes tratamentos durante duas semanas e eutanasiadas 07 ou 30 dias depois.....	68
Tabela 09. Leucograma e contagem de plaquetas em camundongos fêmeas idosas portadoras de tumor com diferentes tratamentos durante duas semanas e eutanasiadas 07 ou 30 dias depois.....	69

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALT	Alanina Aminotransferase
ANOVA	Análise de Variância
AST	Aspartato Aminotransferase
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CEMIB	Centro Multidisciplinar para investigação Biológica
CHCM	Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média
CT	Controle Tumoral
CTCs	Células tumorais circulantes
DLS	<i>Dynamics Light Scattering</i>
DMT-1	<i>Divalent metal transporter</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DRX	Difração de Raios X
EDTA	Etilenodiamino Tetra-acético
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FPT	Ferroportina
FM	Fluido Magnético
GEM	Departamento de Genética e Morfologia
HCM	Hemoglobina Corpuscular Média
HCPI	<i>Hem Carrier Protein 1</i>
HCT	Hematócrito
HE	Hematoxilina-Eosina
HGB	Hemoglobina
IB	Instituto de Ciências Biológicas
INCA	Instituto Nacional de Câncer
IRP	<i>Iron Regulatory Protein</i>
IRM	Imagem por Ressonância Magnética
IQ	Instituto de Química
LDH	Lactato Desidrogenase
MET	Microscópio Eletrônico de Transmissão
MEV	Microscópio Eletrônico de Varredura
MHT	Magnetohipertermia
NTBI	<i>Non-transferrin-bound serum iron</i>
NpSel	Nanocápsula de Selol

NpCit	Nanopartículas de maghemita recobertas com citrato
NPMs	Nanopartículas Magnéticas
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PDI	Índice de Polidispersão
pH	Potencial de Hidrogênio
PLGA	Ácido poli láctico-co-glicólico
PLT	Plaquetas
PTX	Paclitaxel
RBC	<i>Red Blood Cell</i>
RDW	<i>Red Cell Distribution Width</i>
RNL	Relação neutrófilo/límfocito
SPSS	<i>Statistical Package for the Social Sciences</i>
Tf	Transferrina
TNM	Tumor-Nodo-Metástase
UFG	Universidade Federal de Goiás
UICC	União Internacional Contra o Câncer
UnB	Universidade de Brasília
VCM	Volume Corpuscular Médio
WBC	<i>White Blood Cell</i>
WLCR	<i>White large cell rates</i>
WMCC	<i>White middle cell count</i>
WMCR	<i>White middle cell rates</i>
WSCC	<i>White small cell count</i>
WSCR	<i>White small cell rates</i>

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
1.1 Câncer e Metástase	15
1.2 Epidemiologia do câncer	17
1.3 Câncer: Diagnóstico e estadiamento	18
1.3.1 Câncer de Mama: Epidemiologia e diagnóstico	19
1.4 Nanotecnologia	24
1.4.1 Biodistribuição, metabolismo do ferro e suas aplicações em Nanomedicina	26
1.4.2 Magnetohipertermia como agente terapêutico	31
1.4.3 Selênio, Selol e Nanocapsulas de Selol	33
2. JUSTIFICATIVA	36
3. OBJETIVOS	37
3.1 Geral	37
3.2 Específicos	37
4. MATERIAIS E MÉTODOS	38
4.1 Nanopartículas magnéticas recobertas com citrato (NpCit)	38
4.1.1 Aquecimento dos fluidos magnéticos submetidos ao campo magnético alternado	39
4.2 Nanocápsulas de Selol	39
4.3 Animais	40
4.4 Etapas do Estudo	40
4.4.1 Análises da biodistribuição do NpCit e o uso na Magnetohipertermia	43
4.4.2 Administração do NcSel	44
4.4.3 Biocompatibilidade e eficácia terapêutica	44
4.5 Induções, medidas e tratamento do tumor	46
4.6 Avaliação da fragmentação do DNA	47
4.7 Análise imunohistoquímica	47
4.8 Análises estatísticas	48
5. RESULTADOS	49
Etapa 01: Biodistribuição e Biocompatibilidade de nanopartículas magnéticas recobertas com citrato (NpCit)	49
5.1 - Caracterização do NpCit	49
5.2 Avaliações da biocompatibilidade	50
5.3 Biodistribuição do NpCit	56
Etapa02: Resultados da eficácia terapêutica da Magnetohipertermia e nanocápsula de PLGA- contendo Selol no tratamento do tumor de mama	59
5.4 Caracterização do NpCit	59
5.5 Termometria <i>in vitro</i>	60
5.6 Caracterização de nanocápsulas de PLGA contendo Selol	61

5.7 Medidas tumorais, investigação histológica e análise imunohistoquímica	61
5.8 Aspectos clínicos e medidas do peso corporal.....	65
5.9 Análises Bioquímicas	66
5.10 Análises hematológicas.....	67
5. 11 Níveis de TNF- α por ELISA.....	69
5.12 Imuno-histoquímica e fragmentação de DNA	70
6. DISCUSSÃO	71
CONCLUSÕES	83
7. REFERÊNCIAS	84

1. INTRODUÇÃO

1.1 Câncer e Metástase

O câncer é um termo genérico utilizado para definir um grupo de mais de 100 doenças caracterizadas pela proliferação celular exacerbada, invasividade e formação de colônias metastáticas (WEINBERG, 2014). O desenvolvimento das neoplasias é resultado das interações de diversos fatores (multifatorial) que envolvem aspectos extrínsecos, como alcoolismo, microrganismos infecciosos (vírus e bactérias), exposição a agentes químicos mutagênicos, dieta pouco saudável e aspectos intrínsecos que abrangem desde condições hormonais e imunes até aspectos genéticos, como acúmulo de mutações e/ ou eventos epigenéticos.

Aproximadamente 90% de todos os tipos neoplásicos são de causas adquiridas, tanto por instabilidades naturais de oncogenes ou de genes supressores de tumor em consequência do envelhecimento, quanto por compostos físicos e químicos provenientes do meio ambiente, de hábitos pessoais, ou ainda mediante ação mutagênica causadas por alguns tipos de microrganismos. Apenas cerca de 5% dos cânceres são hereditários (por exemplo: câncer de mama por deficiência dos genes supressores BCRA1, BCRA 2 e p53) (NAOUM; NAOUM, 2016). De modo geral, o desenvolvimento tumoral ocorre durante vários anos e passa basicamente por três estágios, iniciação, promoção e progressão, até ser clinicamente detectável e interferir na sobrevivência do indivíduo (WEINBERG, 2014).

Durante o desenvolvimento neoplásico ocorrem competição entre as células cancerosas e as células normais por nutrientes e oxigênio, obstrução física causada pelo tumor e interferência no funcionamento dos órgãos afetados. Devido a estas características, proliferação celular acelerada e crescimento além dos limites habituais, as células transformadas podem invadir tecidos adjacentes e se espalhar para outros órgãos (Figura 01). Este processo é conhecido como metástase (OMS, 2015) e representa a principal causa de morte por câncer.

As metástases resultam de um processo de múltiplos estágios que incluem a invasão local pelas células do tumor primário, intravasamento para a corrente sanguínea ou para o sistema linfático, sobrevivência na circulação (sanguínea e/ou linfática), retenção em um órgão distante, extravasamento, sobrevivência em um novo ambiente e colonização metastática. Cada um destes passos se baseia em características fenotípicas específicas da

célula do tumor, bem como nas interações com o microambiente hospedeiro e o sistema imunitário (TURAJLIC; SWANTON, 2016).

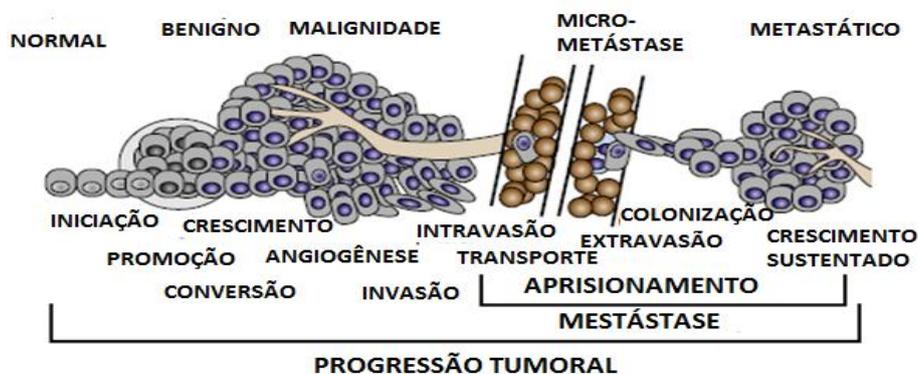


Figura 01. Múltiplos estágios da metástase. Adaptado de Mendelsohn et al. (2015).

Há uma clara tendência para tumores formarem lesões metastáticas em órgãos específicos (MENDELSON et al., 2015), sendo os sítios mais comuns o fígado e os pulmões. Essa propensão pode ser compreendida parcialmente devido ao direcionamento do fluxo sanguíneo, e explicada pelo aprisionamento das células tumorais no primeiro leito capilar ou linfático encontrado. Todavia, em muitos outros cânceres, a colonização metastática não pode ser explicada anatomicamente (MENDELSON et al., 2015). Paget (1889) analisou mulheres que morreram de câncer de mama e notou que as metástases para os ossos e pulmões eram as mais comuns e não poderiam ser explicadas pelos fatores supracitados. Assim, em 1889, foi criada a teoria conhecida como *semente e solo*. Esta teoria afirma que na metástase ocorre colonização seletiva de órgãos específicos mediante o encontro entre a célula tumoral migrante (semente) e o ambiente adequado (solo).

A partir dessa explicação, diversos trabalhos têm demonstrado como as células encontram um microambiente propício à formação de metástases. Foi evidenciado que exossomos, derivados de tumores primários, são capazes de preparar o futuro microambiente de colonização metastática (PECORINO, 2012). Em conformidade, Costa-Silva et al. (2015) demonstraram que exossomos derivados do adenocarcinoma ductal pancreático induziram o aumento das taxas de metástases no fígado.

A forma como as células saem do tumor primário e alcançam órgãos distantes é explicada atualmente por duas hipóteses: o modelo de progressão linear e o de progressão paralela. O primeiro afirma que apenas algumas células do tumor primário são capazes de sofrer todos os eventos mutacionais ou epigenéticos necessários para desencadear metástases, e por isso, tais células levariam muito tempo para deixar o tumor primário, caracterizando a

metástase como um evento tardio, em que se mantém a similaridade genética entre o tumor primário e secundário. O segundo se caracteriza pelo clone ou subclone metastático escapar do tumor primário precocemente e, desta forma, tanto o tumor primário quanto as células metastáticas continuam a evoluir em paralelo, resultando em divergência genética substancial entre a lesão primária e secundária (TURAJLIC; SWANTON, 2016).

Outro ponto importante a considerar é uma nova classe de genes denominados genes supressores de metástase, identificados por sua baixa expressão em células do tumor secundário e não identificadas no tumor inicial. Eles são definidos pela evidente habilidade para inibir metástases sem afetar o crescimento do tumor primário. NM23 e MKK4 são exemplos desta categoria de genes (PECORINO, 2012; POTEL; FASCI; HECK, 2018). Considerando o exposto, melhor entendimento dos fatores de risco, do desenvolvimento tumoral e dos estágios metastáticos pode propiciar o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas, possibilitando tratamentos mais eficazes e diminuição do número de mortes.

1.2 Epidemiologia do câncer

Aproximadamente 18,1 milhões de casos de câncer foram estimados em 2018, com cerca de 9,6 milhões de mortes no mundo (BRAY et al., 2018). Segundo a Organização Mundial de Saúde, o contínuo crescimento e o envelhecimento populacional afetarão de forma significativa o impacto do câncer na saúde (OMS, 2015). A perspectiva para as próximas décadas é ainda pior, com cerca de 20 milhões de novos casos para 2025 (INCA, 2018).

Os principais tipos de câncer que mais levam à morte no mundo são os de pulmão, mama, intestino, cólon e reto (ALBERTS, 2010; BRAY et al., 2018). Nos países com maior desenvolvimento, predominam os tipos de câncer associados à vida urbana (pulmão, próstata, mama feminina, cólon e reto), enquanto nos países em desenvolvimento, é alta a ocorrência de cânceres relacionados com infecções (colo do útero, estômago, esôfago, fígado) (FERLAY et al., 2015). No Brasil, a estimativa para o ano de 2019, aponta para a ocorrência de aproximadamente 600 mil novos casos. O câncer de pele do tipo não melanoma (170 mil casos novos) é o mais incidente na população brasileira, seguido pelos tumores de próstata (68 mil), mama feminina (60 mil), cólon e reto (33 mil), pulmão (27 mil), estômago (20 mil) e colo do útero (15 mil) (INCA, 2018).

1.3 Câncer: Diagnóstico e estadiamento

As neoplasias malignas constituem enfermidades com múltiplas localizações e aspectos clínico-patológicos variados e, muitas vezes, não possuem sinais patognomônicos, o que dificulta ou atrasa o diagnóstico em estágios iniciais, o tratamento e consequentemente a cura. O diagnóstico envolve múltiplos passos, como exames físicos, laboratoriais, exames de imagens (raios-X, PET Scan, ultrassom, IRM) e biópsia. Assim, o preciso diagnóstico requer não só a identificação do tipo de tumor, mas também seu estadiamento, o estágio em que se encontra a doença.

A importância da classificação dos cânceres em estádios é baseada no fato de que as taxas de sobrevivência, são diferentes quando o tumor está restrito ao órgão que o originou, ou quando este já gerou metástase (INCA, 2016). O estágio tumoral deve refletir a taxa de crescimento e extensão da doença, bem como o tipo de tumor e sua relação com o portador. Assim, localização, volume, histopatologia, comprometimento dos linfonodos, ausência ou presença de metástases, sexo, idade do paciente são variáveis importantes nesta classificação (BARBER; THOMAS; DIXON, 2012).

O sistema de estadiamento mais utilizado é o de classificação dos tumores malignos (TNM) adotado pela união internacional contra o câncer (UICC) a partir de 1950. No sistema TNM, “T” refere-se ao tamanho e extensão do tumor primário, “N” ao número de linfonodos próximos que têm câncer e “M” à presença de metástase. Quando as categorias T, N e M são agrupadas, geralmente ficam distribuídas em estádios que variam de zero a IV para expressar o nível de avanço da doença. No estágio “0”, chamado de carcinoma *in situ*, as células anormais estão presentes, mas não se espalharam para o tecido próximo. Nos estádios I, II e III o câncer está presente. Quanto maior o número, maior o tumor e mais espalhado nos tecidos adjacentes. Finalmente o estágio IV significa que o câncer está presente em partes distantes do corpo, ou seja, apresenta metástases, e constitui o estágio mais avançado da doença (BARBER; THOMAS; DIXON, 2012).

A determinação da extensão da enfermidade e a identificação dos órgãos comprometidos auxiliam na captação de informações e no entendimento em relação ao comportamento biológico tumoral, prognóstico, seleção terapêutica, avaliação do tratamento e na pesquisa clínica (INCA, 2016).

1.3.1 Câncer de Mama: Epidemiologia e diagnóstico

Dentre os diversos tumores malignos, o câncer de mama destaca-se como um dos principais tipos entre as mulheres. A mais recente estatística da OMS mostrou que ocorreram aproximadamente 2,1 milhões de novos casos de câncer de mama em 2018 (BRAY et al., 2018) que corresponde a aproximadamente 25% de todos os cânceres diagnosticados, em mulheres, durante esse ano.

No Brasil, assim como em todo o mundo, o câncer de mama é o mais comum entre as mulheres, atrás apenas do câncer de pele não melanoma, correspondendo também a cerca de 25% dos novos casos a cada ano. Segundo o INCA (2018), estima-se que em 2019 surjam 59.700 mil novos casos, com cerca de 15.000 óbitos.

O diagnóstico definitivo é realizado por um médico oncologista que, para precisar o grau de avanço da doença, utilizará exames como o físico, clínico, mamografia, ressonância magnética, ultrassonografia, além de exames laboratoriais, moleculares e biopsia, este último consistindo na remoção e estudo histopatológico do tecido.

1.3.1.1 Anatomia e classificações dos cânceres de mama

A mama humana é uma estrutura presente em ambos os sexos, sendo mais desenvolvida nas mulheres devido à ação de estrogênio, hormônio sexual feminino, liberado a partir da puberdade. O estrogênio estimula o desenvolvimento das glândulas mamárias e o depósito de tecido adiposo, feixes de tecido conjuntivo fibroso (ligamentos de Cooper) vão da pele sobre a mama até a parede torácica subjacente, fornecendo uma estrutura de suporte. As mamas localizam-se sobre a parede do tórax, no tecido subcutâneo, entre a segunda e a sexta costela e, no plano vertical, entre o esterno e a linha axilar média.

As glândulas mamárias femininas derivam de glândulas sudoríparas modificadas, cuja função biológica é a amamentação, têm 15 a 20 lobos e cada lobo tem muitas seções menores chamadas lóbulos. Cada lóbulo, separado dos demais pelo tecido conjuntivo denso e adiposo, com seu próprio ducto excretor constitui-se ductos lactíferos, e podem produzir leite (Figura 02). Os ductos mamários são revestidos por uma camada de células cuboides cercadas por uma rede de células mioepiteliais suportadas pelo estroma do tecido conjuntivo, e são incorporadas em uma quantidade variável de tecido adiposo (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013; BARBER; THOMAS; DIXON, 2012). Os lobos e lóbulos são ligados pelos ductos e estes desembocam no mamilo, localizado no centro de uma área escura da pele chamada

auréola. Os vasos linfáticos da mama drenam a linfa principalmente para os linfonodos das cadeias axilar e mamária interna (SOUSA, 2015).

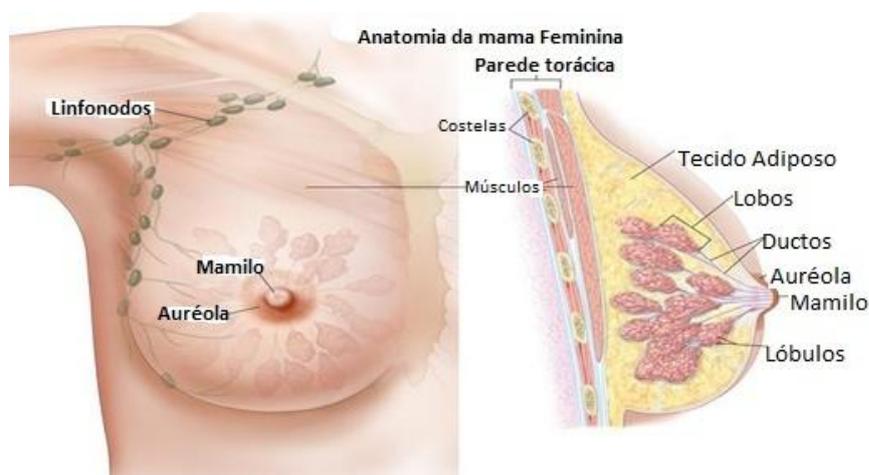


Figura 02. Anatomia da mama humana. . Fonte: Instituto Nacional do Câncer (2014).

Classicamente, o prognóstico do carcinoma de mama varia de acordo com o tamanho tumoral, o grau de diferenciação histológica, a presença de comprometimento axilar e o grau de invasão nos vasos linfáticos. Entretanto, tumores que apresentam as mesmas características patológicas clássicas podem ter comportamentos distintos expressos por suas características moleculares. Apesar das análises histopatológicas já reconhecerem o câncer de mama como uma doença heterogênea (sobretudo o carcinoma ductal e lobular *in situ* ou invasivo), com variações inter e intratumorais há mais de cinquenta anos, avanços recentes em análise molecular, genética e bioquímica mostraram uma diversidade de tumores de mama (subtipos) muito maior (HORTON et al., 2015; HÉQUET et al., 2017).

Por meio do uso de análises de microarranjos, sequenciamento de DNA, imunohistoquímica e hibridação fluorescente *in situ* (FISH), mapas de expressão gênica foram identificados e cinco subtipos intrínsecos de carcinoma de mama que se correlacionam com o prognóstico foram estabelecidos: luminal A, luminal B, HER-2 negativo, luminal HER-2 positivo e triplo negativo. Esta classificação leva em consideração a presença ou ausência e os níveis de expressão de receptores de estrógeno (RE), progesterona (RP), receptor do fator de crescimento epidérmico humano (HER-2) e os níveis de expressão de Ki-67, marcador nuclear de proliferação celular (SERRA et al., 2014).

Foram considerados tumores de melhor prognóstico os subtipos luminais A, onde RE é positivo, HER-2 negativo, Ki-67 <14% e RP positivo com expressão >20%; já o triplo-negativo, em que há ausência de expressão de RE, RP e HER-2, é considerado o de pior prognóstico, por não responder a terapia específica (SERRA et al., 2014; BARNARD; BOEKE; TAMIMI, 2015).

1.3.1.2 Fatores de risco para câncer de mama

Muitos fatores contribuem para aumentar o risco de câncer de mama, incluindo história familiar, estilo de vida e envelhecimento. Mulheres cujo histórico familiar (parentes de primeiro grau ou ascendência direta) apresentam casos de câncer de mama abaixo de 50 anos de idade bem como câncer de ovário em qualquer idade são consideradas com alto risco para desenvolvimento de neoplasia da mama (BRASIL, 2013). Além disso, segundo a *American Cancer Society* (2016), mulheres que testaram positivo para mutações herdadas em genes de suscetibilidade ao câncer de ovário, como BRCA1, BRCA2 e p53 correm maior risco, pois a inibição desses genes supressores de tumor comprometem os mecanismos de reparo de DNA e conseqüentemente predispõe ao acúmulo de mutações e à tumorigênese, embora estes fatores herdáveis contribuam com cerca de apenas 5% entre todos os cânceres de mama em mulheres. Em relação ao estilo de vida, dieta rica em gordura animal, sedentarismo, tabagismo e etilismo são fatores que podem aumentar as chances de se desenvolver câncer de mama. A exposição prolongada do tecido mamário aos hormônios femininos (menarca precoce, menopausa tardia, obesidade e uso de hormônios) aumentam os riscos, pois os hormônios (estrogênio e progesterona) estimulam a proliferação celular, aumentando assim a probabilidade de danos ao DNA (LIU; NGUYEN; COLDITZ, 2015).

Em relação à idade, devido às alterações demográficas, a proporção de idosos com câncer de mama tem aumentado constantemente em muitos países (RADES et al., 2015). Apesar do fato de que a maioria dos novos diagnósticos de câncer de mama ainda ocorrem em mulheres com menos de 65 anos de idade (58%), a maioria das mortes (60%) ocorre em mulheres com mais de 65 anos (37% em mulheres com 75 anos ou mais) (KARUTURI; VANDERWALDE; MUSS, 2016). Nas últimas duas décadas, o risco absoluto de morte por câncer de mama diminuiu 15,3% para as mulheres com idade entre 50 a 64 anos, mas apenas 7,5% para as mulheres de 75 anos ou mais velhas.

Dentre as possíveis explicações para a maior taxa de morte em mulheres com idade acima dos 65 anos, está o fato de que a terapia adjuvante não tem sido tão frequentemente administrada a doentes idosas em comparação com as mais jovens, principalmente por causa do viés de idade, preocupações com a toxicidade e os efeitos do tratamento na qualidade de vida (KARUTURI; VANDERWALDE; MUSS, 2016). Embora o fato de receber terapia menos agressiva possa ser apropriado em alguns casos, muitas das pacientes idosas são subtratadas (FREEDMAN, 2015). Alguns estudos demonstram sub-representação de idosas doentes em ensaios clínicos e, conseqüentemente, a falta de tratamentos padronizados e

diretrizes de gestão claras para esses pacientes (ORUCEVIC et al., 2015). Mahipal et al. (2015) destacam que em um ensaio clínico com 16.396 pacientes, apenas 25% dos participantes tinham 65 anos de idade ou mais.

O envelhecimento é um fenômeno complexo que envolve defeitos no genoma, diminuições na síntese de enzimas, receptores celulares e transcrição de fatores que afetam negativamente a capacidade da célula absorver e utilizar nutrientes e reparar defeitos no DNA. Além disso, o declínio progressivo na atividade mitocondrial nos idosos ocasiona mudanças importantes no metabolismo energético, favorecendo o desenvolvimento de diversas enfermidades, incluindo-se as neoplasias (HASTY; VIJG, 2002).

De fato, o tratamento do câncer em pacientes geriátricos pode ser difícil por causa de vários fatores, como mudanças fisiológicas e genéticas relacionadas à idade, comorbidades e possíveis interações medicamentosas. Estas complexidades podem influenciar a decisão médica em incluir pacientes idosos com câncer em ensaios clínicos. Além disso, muitos destes pacientes apresentam um padrão triplo negativo para ER, PR e Her 2, tendo pior prognóstico e indicação de quimioterapia mais agressiva (JENKINS et al., 2014).

Por estas razões, dados disponíveis relativos à biodistribuição, farmacocinética, toxicidade e eficácia dos tratamentos contra o câncer são, embora extremamente importantes, ainda limitados para este grupo etário quando comparado com populações mais jovens, o que enfatiza a necessidade da realização de estudos específicos para idosos.

1.3.1.3 Tratamento do câncer de mama

De modo geral, esta neoplasia maligna apresenta um bom prognóstico quando diagnosticada em fase inicial. No entanto, devido principalmente ao diagnóstico tardio da doença, o câncer de mama é o tipo que mais leva a óbito na população feminina brasileira (LEE; NAN, 2012).

Os tratamentos tradicionais do câncer de mama baseiam-se principalmente em cirurgia, quimioterapia, radioterapia e terapia hormonal. Embora estes tratamentos tenham papel importante na área da saúde, nem sempre são eficazes no processo de cura.

A cirurgia é a principal modalidade para tratamento e controle do câncer de mama, mas em inúmeros casos apresenta limitações, por não ser possível realizar a retirada total ou parcial do tumor, além dos riscos de sequelas físicas e emocionais pós-operatórias com resultado estético ruim (XU et al., 2015).

A radioterapia utiliza radiação ionizante, que danifica o material genético, e induz a morte celular. Todavia, células dos tecidos adjacentes normais são afetadas por este tratamento, levando a vários efeitos adversos indesejáveis.

A quimioterapia é o tratamento sistêmico mais utilizado contra o câncer, e tem sido crescente a sua realização com dois ou mais fármacos. Os fármacos mais utilizados no tratamento do câncer de mama metastático são os taxanos (Paclitaxel) e as antraciclina, como a Adriamicina e Doxorubicina. Porém, assim como a radioterapia, a inespecificidade causa danos às células normais, uma vez que as doses elevadas necessárias para atingir o objetivo são extremamente tóxicas, o que limita o uso terapêutico (FENG; CHIEN, 2003).

Na terapia hormonal, os pacientes com câncer de mama positivos para receptores de hormônios (ER + / PR +) podem ser tratados com fármacos como o tamxifeno para diminuir os níveis de estrogênio ou para bloquear os efeitos do estrogênio no crescimento das células de câncer de mama. O tratamento geralmente perdura por 05 anos e está relacionado com risco aumentado de câncer do endométrio em mulheres acima de 50 anos, bem como a eventos de trombose e embolia pulmonar (TANAKA et al., 2009).

Mais recentemente, a imunoterapia também vem sendo usada para tratamento do câncer de mama. Este tratamento se consiste em estimular as células de defesa (os leucócitos), a gerar ou aumentar sua resposta contra o câncer (KHALIL et al., 2016). É diferente da quimioterapia e da radioterapia, que tem como objetivo atacar diretamente as células do tumor. Cerca de 14% dos cânceres da mama superproduzem a proteína promotora de crescimento HER2 e vários medicamentos estão aprovados para o tratamento deste subtipo. Dentre estes, Trastuzumabe (Herceptina) é um anticorpo monoclonal humanizado que tem como alvo a proteína HER2. Os resultados combinados de dois grandes estudos indicam que a adição de trastuzumabe à quimioterapia padrão para câncer de mama HER2-positivo em estágio inicial reduz o risco de recorrência e morte em 52% e 33%, respectivamente, em comparação à quimioterapia isolada. Este fármaco também é uma parte padrão do tratamento para o câncer de mama HER2-positivo avançado (ROMOND et al., 2005; WOLFF et al., 2013). Todavia, apesar dos promissores avanços nessa área, a imunoterapia pode apresentar alguns efeitos adversos como, insuficiência cardíaca temporária (RICCIO et al., 2016) além de ainda não poder ser aplicada em todos os subtipos de câncer de mama como o triplo negativo.

As diversas desvantagens apresentadas pelo modelo de terapia convencional empregado no tratamento do câncer, têm estimulado a busca de novas alternativas terapêuticas, que atenuem os efeitos tóxicos e sistêmicos nos tratamentos de neoplasias que

afetam principalmente os pacientes idosos. Dentre elas, a nanotecnologia propõe o uso de nanopartículas magnéticas (NPMs), que têm sido consideradas como ferramenta inovadora e promissora, com várias aplicações na área biomédica e com potencial para produzir avanços importantes em diagnóstico por imagem e na terapêutica dos tumores (DURÁN et al., 2006; (PAVON; OKAMOTO, 2007).

1.4 Nanotecnologia

A nanotecnologia é um ramo científico e tecnológico multidisciplinar com aplicações em inúmeras áreas, como nas de materiais, energia, meio ambiente e medicina (ALENCAR; BOCHNER; DIAS, 2014). O prefixo "nano" vem do grego (*nanos*, anão), no qual um nanômetro (1nm) corresponde à bilionésima parte de um metro (10^{-9} m). Trata-se de um conjunto de processos que envolvem diversas técnicas, que visam à preparação, caracterização e manipulação de materiais em escala nanométrica (nanomaterial), nos quais menos um dos componentes tem dimensões físicas entre 1 e 100 nanômetros (nm). Isso se deve aos efeitos quânticos que dominam as propriedades da matéria em escala nanométrica e, assim, aspectos como fluorescência, condutividade elétrica, comportamento magnético e reatividade química mudam em função do tamanho da partícula, podendo oferecer vantagens em relação aos sistemas convencionais (GAJEWICZ et al., 2012). O ouro, por exemplo, quando em nanoescala apresenta cores variadas, incluindo a vermelha e a roxa, diferentes do tradicional amarelo observado em macro escala.

Avaliada em US\$ 300 bilhões, em 2011, US\$ 1,6 trilhão em 2013, a indústria mundial de nanotecnologia tende a crescer ainda mais, podendo atingir, em 2019, US\$ 6 bilhões, o setor de maior crescimento. O Orçamento Federal Americano de 2019 disponibilizará mais de US\$ 1,4 bilhão para a Iniciativa Nacional de Nanotecnologia (NNI) com mais de US\$ 440.7 milhões para o Instituto Nacional de Saúde (*National Institute of Health – NIH*) para investimento em pesquisa biomédica. Cumulativamente, o investimento do governo americano em nanotecnologia chega a quase US\$ 27 bilhões desde o início do NNI, em 2001 (NATIONAL NANOTECHNOLOGY INITIATIVE, 2018).

Dessa forma, devido ao crescente investimento e descobertas, o uso da nanotecnologia em medicina é cada vez mais valorizado, pois atua como potente ferramenta para contornar limitações da área médica, abrindo novas possibilidades na terapia do câncer.

Várias categorias de nanoestruturas podem ser utilizadas e variam em relação ao tamanho, forma e material (Figura 03). As principais nanopartículas utilizadas em

biomedicina são os dendrímeros, nanocápsulas, nanoesferas, nanotubos de carbono, lipossomos e as nanopartículas magnéticas de óxidos de ferro (NPM) (HALEY; FRENKEL, 2008).

As NPMs baseadas em óxidos de ferro, como magnetita (Fe_3O_4) e maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$), têm sido utilizadas para vários fins, como entrega direcionada de fármacos a locais específicos, liberação controlada dos fármacos, agente para aumentar o contraste em exames de imagens de ressonância magnética e na hipertermia magnética para tratamento de tumores (WU; JIANG; ROY, 2016; VERMA; LAL; NOORDEN, 2014).

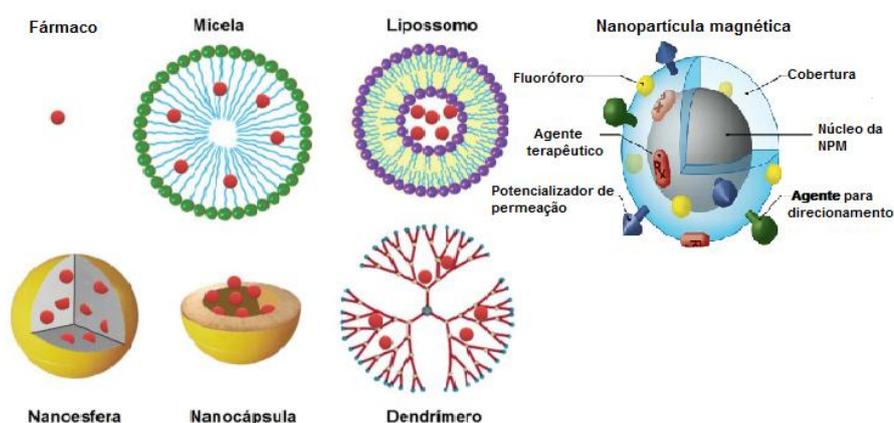


Figura 03. Representação esquemática de diferentes nanoestruturas (adaptado de RAMOS-CABRER; CAMPOS, 2013; SUN; LEE; ZHANG, 2008).

Contudo, para a aplicabilidade de NPMs na área biomédica é necessário que as mesmas sejam biocompatíveis e estáveis no meio fisiológico, o que requer que sua superfície seja modificada com compostos biologicamente ativos. Essa cobertura das NPMs permite o transporte da mesma, com ou sem agentes terapêuticos, para as células alvo específicas, evitando a concentração de agentes citotóxicos em tecidos não-alvo durante o processo de entrega (CALERO et al., 2015).

As diversas coberturas das NPMs podem levar a diferenças na interiorização pelas células, bem como na sua nanotoxicidade (ESTEVANATO et al., 2012). Corroborando com a afirmação supracitada, Calero et al. (2015) afirmaram que fatores como o tamanho, forma e carga da superfície das nanopartículas (NPs) podem determinar a sua interiorização e distribuição celular e, assim, o seu desempenho eficaz. Existem vários materiais para a produção das nanopartículas magnéticas, sendo mais comuns os baseados em óxidos de ferro.

As partículas com características superparamagnéticas, como é o caso da magnetita e da maghemita, apresentam a vantagem de se tornarem magnetizadas na presença de um campo magnético e desmagnetizadas logo após a retirada do mesmo (HERVAULT et al., 2016). Esta propriedade permite a utilização eficaz das NPMs para fins terapêuticos anticâncer.

Quando as NPMs são dispersas em um solvente carreador e funcionalizadas com uma camada molecular estabilizadora (como dextrana, ácido dimercaptosuccínico ou citrato), adquirem a característica de fluido magnético (FM) (KANDASAMY et al., 2018). Em um FM, a interação das NPMs com o solvente permite que toda a solução coloidal responda ao campo magnético (LAURENT et al., 2011).

Os fluidos magnéticos constituídos por NPMs recobertas com citrato (NpCit) exibem características desejáveis de biocompatibilidade e estabilidade (ESTEVANATO et al., 2012). Brugin (2007) demonstrou que a viabilidade de células peritoneais de camundongos não foi alterada quando os animais foram tratados com FM, composto por nanopartículas de maghemita, recobertas com citrato. Neste mesmo trabalho, usando o teste de micronúcleo, foi demonstrado que esse FM não induz efeito genotóxico aos eritrócitos da medula. Corroborando com os estudos supracitados, Bonadio (2014) demonstrou que o NpCit permanece estável durante o período de 360 dias, em diferentes concentrações e temperaturas, sem efeito citotóxico e a porcentagem total de metilação do DNA não foi significativamente alterada (BONADIO et al., 2017) revelando, portanto, potencial para aplicações biomédicas.

De fato a possível toxicidade de NPMs para os seres humanos e o meio ambiente tornou-se uma questão de prioridade absoluta em nanomedicina (CALERO et al., 2015). Kaur et al. (2016) destacam que, embora o uso de NPMs para fins terapêuticos, como a hipertermia, tenha sido anunciado como um avanço biomédico importante, as preocupações com sua biocompatibilidade precisam ser abordadas individualmente para cada formulação e administração, especialmente em organismos idosos. Por isso, são fundamentais os estudos que objetivam conhecer a dinâmica destas nanoestruturas, revisar aspectos relevantes sobre a constituição das mesmas, bem como avaliar seus possíveis efeitos adversos no organismo dos seres vivos. Nesse sentido, por ser componente fundamental das NPMs, o ferro, seu metabolismo, sua biodistribuição e possível toxicidade são objetos de revisão deste trabalho.

1.4.1 Biodistribuição, metabolismo do ferro e suas aplicações em Nanomedicina

Por ser extremamente reativo, o mineral ferro está envolvido em diversos processos orgânicos importantes, como mecanismos celulares oxidativos, imunidade inata, replicação, reparo e tradução do DNA. De fato, numerosas enzimas atuantes nestes processos dependem do ferro. Além disso, participa na formação de diversas proteínas como mioglobina, citocromo c e é componente fundamental da hemoglobina (Hb) dos eritrócitos (DIEZ; ALLENDE; GARCÍA, 2016).

A atividade biológica do ferro reside em grande parte em suas eficientes propriedades de transferência de elétrons, permitindo que ele aceite ou doe elétrons enquanto alterna entre seu estado bivalente ferroso (Fe^{2+}) e o trivalente férrico (Fe^{3+}), funcionando como cofator catalisador em várias reações bioquímicas (CRIELAARD; LAMMERS; RIVELLA, 2017).

A deficiência de ferro implica em diversos prejuízos ao organismo, sendo a anemia a manifestação clínica mais importante. Em contrapartida, seu excesso é extremamente nocivo, uma vez que o ferro produz espécies reativas de oxigênio (EROs), que podem danificar estruturas lipídicas, proteínas e o DNA, gerando lesões teciduais graves, além de mutações (GROTTO, 2008; JASMIN et al., 2017). O ferro em excesso deposita-se gradativamente em vários órgãos, principalmente no fígado e baço (CANÇADO, 2007).

A aquisição de ferro pelo organismo ocorre basicamente por meio de duas formas, a dieta alimentar e a reciclagem de hemácias senescentes. O ferro oriundo da alimentação é absorvido na forma inorgânica, principalmente em íons férricos (Fe^{+++}), fornecida por vegetais e cereais, ou na forma heme, proveniente da quebra da hemoglobina e mioglobina contidas principalmente na carne vermelha (GROTTO, 2010).

No organismo, o ferro está ligado principalmente à molécula de Hb e, dessa forma, a reciclagem a partir da fagocitose e degradação dos eritrócitos senescentes, constitui uma fonte fundamental de ferro. Macrófagos do baço, da medula óssea e células de Kupffer no fígado, reconhecem modificações bioquímicas na membrana das hemácias senescentes e as fagocitam. O produto dessa reciclagem são CO, ferro e bilirrubina, além de outras proteínas constituintes das hemácias. O ferro dos macrófagos poderá ser armazenado ou exportado para outros tecidos (SIGNORINI; SIGNORINI, 2015).

Proteínas como a transportadora de metal divalente (DMT-1), ferroportina (FPT), proteína transportadora do heme-1 (HCP1), proteína da hemocromatose (HFE), enzima ferredutase ou Dcytb, transferrina (Tf), proteínas reguladoras do ferro (IRP), o hormônio hepcidina, dentre outras, desempenham papéis fundamentais no metabolismo e regulação do equilíbrio do ferro, tanto a nível celular quanto a nível sistêmico (DIEZ; ALLENDE; GARCÍA, 2016).

O metabolismo do ferro a nível celular pode ser dividido em três processos: entrada, utilização e sua efluência (Figura 04). Existem vias gerais pelas quais as células individuais absorvem o ferro. Após sofrer redução pela enzima ferroredutase ou Dcytb, o Fe^{+++} inorgânico proveniente da dieta e não associado à transferrina (NTBI) é captado e convertido em (Fe^{++}) pela enzima transportadora de metal divalente (DMT-1), receptor transmembrana dos enterócitos, sendo armazenado na forma de ferritina (CRIELAARD; LAMMERS; RIVELLA, 2017).

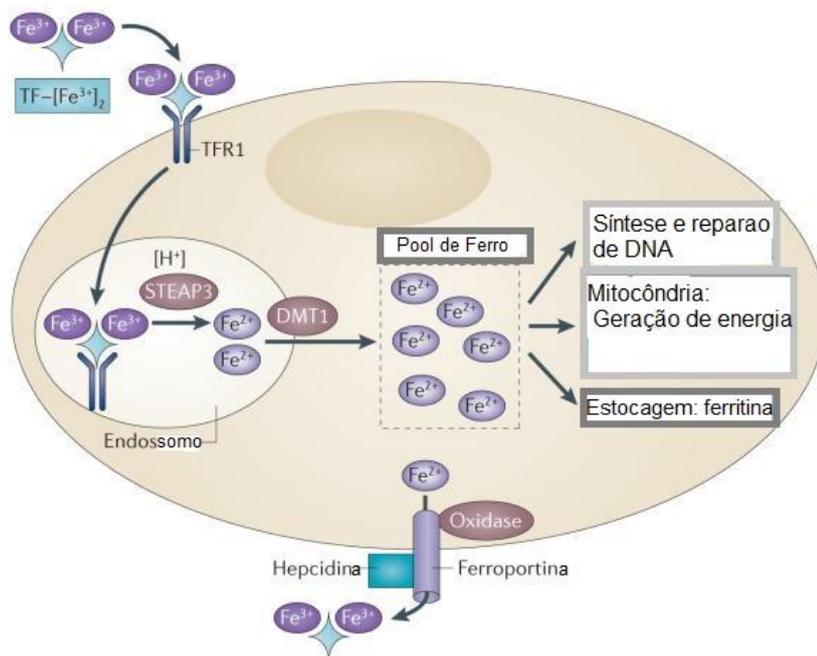


Figura 04. Metabolismo celular do ferro (adaptado de TORTI; TORTI, 2013).

Recentemente foi demonstrado que existem proteínas *prions* na superfície de células nervosas com capacidade de redução de ferro que ajudam na captação celular de NTBI no cérebro (TRIPATHI et al., 2015). Demonstrou-se também que outras proteínas, como as dos tipos Zrt e Irt 14 ou 18 (ZIP14 e ZIP 18), têm papel importante no acúmulo tecidual de ferro NTBI (CRIELAARD; LAMMERS; RIVELLA, 2017).

O ferro originário do grupo heme (ferro + anel de protoporfirina) é absorvido no intestino, fígado, baço e rins pela proteína transportadora de heme-1 (HCP1). Em situações de carência de ferro, a HCP1 se redistribui do citoplasma para a membrana plasmática das células duodenais para absorver mais heme. Em contrapartida, em condições de excesso, a redistribuição se faz da membrana para o citoplasma. No citoplasma, o grupo heme é liberado da protoporfirina pela hemeoxigenase e, juntamente com Fe^{++} , é armazenado na forma de ferritina e hemossiderina. Nas células retículoendoteliais das do fígado, baço e medula óssea, uma porção será utilizada pela mitocôndria para síntese de heme e cluster Fe-S e outra será

exportada pela ferroportina (FPT), proteína transmembrana responsável pela saída de ferro dos enterócitos, macrófagos e hepatócitos para o plasma. Ao ser liberado, a enzima hefaestina converte o Fe^{++} em Fe^{+++} que é captado pela transferrina (Tf), outra forma como o ferro é transportado no plasma (GROTTO, 2008).

Dessa forma, a Tf solubiliza, minimiza a reatividade do ferro, bem como facilita sua liberação para as células, sendo responsável por uma boa parte do ferro entregue à medula óssea para a eritropoiese. A liberação do ferro ligado à Tf ocorre quando este se liga ao receptor transferrina (TfR) presente na superfície da maioria das células, e facilitada pelo pH fisiológico. O complexo transferrina-TfR é interiorizado via endocitose, mediada pela proteína clatrina, e o Fe^{+++} é liberado da transferrina em consequência da diminuição do pH para 5,5 dentro da vesícula. Subsequentemente, TFR1 e apotransferrina (transferrina sem ferro), que permanecem associadas neste pH baixo, são recicladas de volta para a superfície celular, onde o pH é 7,4, e a apotransferrina é assim liberada do complexo (CRIELAARD; LAMMERS; RIVELLA, 2017).

Sistemicamente, o metabolismo de íons de ferro, envolve assimilação pelo epitélio duodenal superior, que apresenta vilosidades que aumentam a absorção, favorecida pelo pH do intestino e agentes solubilizantes como açúcares. O hormônio hepcidina realiza um papel fundamental por desempenhar a comunicação entre os locais de reciclagem, armazenamento e utilização do ferro, distantes uns dos outros. A hepcidina regula o fluxo sistêmico de ferro modulando os níveis de FPT (Figura 05). Através da ligação direta ao domínio extracelular da FPT, a hepcidina induz a endocitose e a degradação desta proteína transmembranar, evitando deste modo, a saída de ferro da célula. A expressão de hepcidina é regulada, por sua vez, pelos níveis de ferro no organismo, onde a sobrecarga deste induz sua expressão, enquanto que anemia ou hipoxemia reduzem-na (CRIELAARD; LAMMERS; RIVELLA, 2017). Não havendo mecanismo de excreção específico, a perda de ferro ocorre por secreções corpóreas, descamação de células intestinais e epidérmicas e por sangramento hemorrágico (SIGNORINI, 2015).

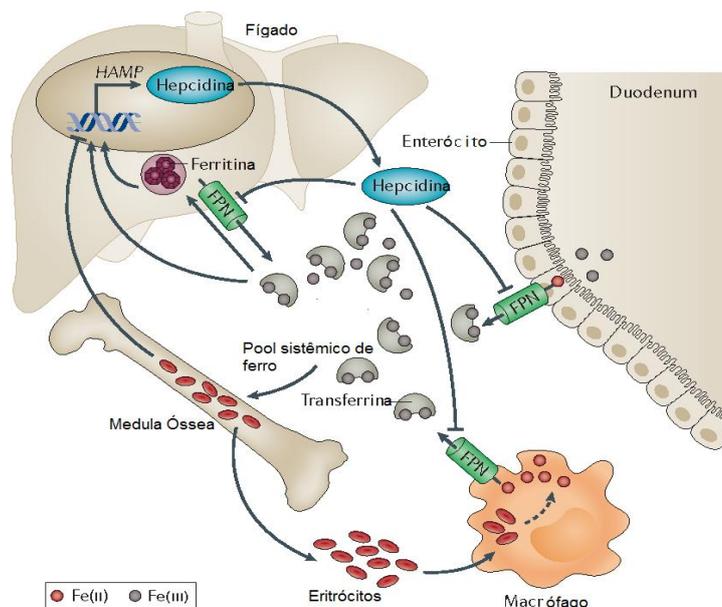


Figura 05. Metabolismo sistêmico do ferro (adaptado de CRIELAARD; LAMMERS; RIVELLA, 2017).

A maioria das NPMs introduzidas na corrente sanguínea é geralmente submetida à opsonização, seguida de reconhecimento e captação subsequente por macrófagos residentes nos órgãos do sistema fagocítico mononuclear (FENG et al., 2018).

A captação celular de NPMs baseadas em óxidos de ferro, como magnetita e maghemita, inclui vias endocíticas, como pinocitose, clatrina ou envolvimento de caveolina, e interiorização independente de clatrina / caveolina. Diferentes vias endocíticas podem estar correlacionadas com a velocidade de captação celular e citotoxicidade nas células, sendo as propriedades físico-químicas e a reatividade superficial das NPMs essenciais na determinação da via de endocitose (SAHAY; ALAKHOVA; KABANOV, 2010). Chaves et al. (2010) demonstraram que nanopartículas de maghemita recobertas com citrato de ródio (MRC) foram englobadas pela via de endocitose dependente de clatrina. Segundo Feng et al. (2018), a eliminação das NPMs é dependente principalmente do tamanho hidrodinâmico. Tem sido relatado que NPMs maiores que 100nm de diâmetro são rapidamente aprisionadas no fígado e baço através da fagocitose de macrófagos, enquanto que as NPMs com diâmetro menor que 10 nm provavelmente são eliminadas por meio da depuração renal.

Nas neoplasias, o ferro pode acelerar a iniciação do tumor aumentando a formação de radicais livres, bem como funcionar como um nutriente que promove a proliferação de células tumorais. Estudos evidenciaram que as proteínas envolvidas no metabolismo do ferro podem adquirir outras funções, contribuindo para a malignidade. Foi demonstrado que a absorção de ferro pelas células tumorais, sofre mudanças importantes, como a superexpressão de TRf1, observada em leucemia, linfoma, câncer de pulmão e de mama e a repressão de FPT em

câncer de mama, associados com um pior prognóstico. Dessa forma, células cancerosas desregulam o metabolismo do ferro por aumentar a sua captação, armazenamento e diminuição do efluxo intracelular (TORTI; TORTI, 2013). Pinnix et al. (2010) demonstraram uma relação inversa entre a expressão da ferroportina e a progressão do câncer de mama *in vitro*, *in vivo* e em coortes de quatro pacientes. Calzolari et al. (2010) mostraram que TfR2 é altamente expressa em linhagens celulares de glioblastoma. No entanto, o estresse oxidativo intracelular adicional que é acompanhado pela maior presença de ferro, causado pela administração de NPMs, por exemplo, também poderia tornar as células cancerosas sensíveis à ferroptose, uma forma recentemente descrita de morte celular não apoptótica dependente de ferro (JIANG et al., 2015).

Devido às suas propriedades, derivados do ferro, NPMs têm sido utilizados na nanobiotecnologia, para diversos propósitos conforme já mencionado. Dentre suas vantagens em relação a outros metais destacam-se a biocompatibilidade, estabilidade, biodegradabilidade e possibilidade de estratégias passivas e ativas para a entrega de fármacos sítio-específicos. Além disso, a capacidade das NPMs em gerar calor quando submetidas a um campo magnético alternado externo (ALEXIOU et al., 2007), viabiliza o uso da magnetohipertermia como agente terapêutico (COLE; YANG; DAVID, 2011), ferramenta investigada na segunda etapa deste estudo.

1.4.2 Magnetohipertermia como agente terapêutico

Existem basicamente duas modalidades distintas de uso de calor ou aumento de temperatura, como agente terapêutico contra câncer. A primeira, a termoablação, utiliza temperaturas superiores a 50 graus e, portanto, letais às células. A segunda se refere à hipertermia, que consiste no uso de temperaturas entre 41 a 50 graus, mais branda que a anterior, mas ainda assim eficaz na indução de morte celular. Dentre os diversos métodos usados para se conseguir a hipertermia, a hipertermia magnética ou magnetohipertermia (MHT) (Figura 06).vem se destacando pelos excelentes resultados obtidos em estudos pré-clínicos e clínicos (KAUR et al., 2016)

A MHT é a elevação da temperatura obtida pela exposição das NPMs a um campo magnético alternado (CMA) (CHATTERJEE; DIAGARADJANE; KRISHNAN, 2012), condição em que as NPMs geram calor através das perdas de relaxação de Néel e Brown (HERVAULT et al., 2016).

Na MHT, os efeitos não dependem do estágio do ciclo celular e o método conduz à morte das células tumorais, sem afetar, ou afetando minimamente, as células normais circunvizinhas (PRASAD et al., 2007; CANDIDO et al., 2014). Kaur et al. (2016) afirmaram que os alvos da terapia térmica abrangem uma variedade de proteínas, incluindo estruturas citoesqueléticas, componentes da membrana plasmática, enzimas intracelulares, moléculas de transdução de sinal, proteínas de choque térmico e proteínas associadas ao reparo do DNA, apoptose e necrose. Além disso, a MHT causa melhoria sustentada no fluxo sanguíneo nos tumores (e não nos tecidos normais), resultando em aumento da perfusão, oxigenação e entrega de quimioterápicos ao núcleo hipóxico, geralmente resistente às radiações ionizantes. As células que residem neste núcleo hipóxico tumoral também tendem a ser mais acidóticas, característica que as tornam mais sensíveis ao dano térmico. KOSSATZ et al. (2015) demonstraram que a hipertermia magnética mediada com NPMs funcionalizadas com doxorrubicina no tratamento do câncer de mama reduziu significativamente o volume tumoral em camundongos nudes.

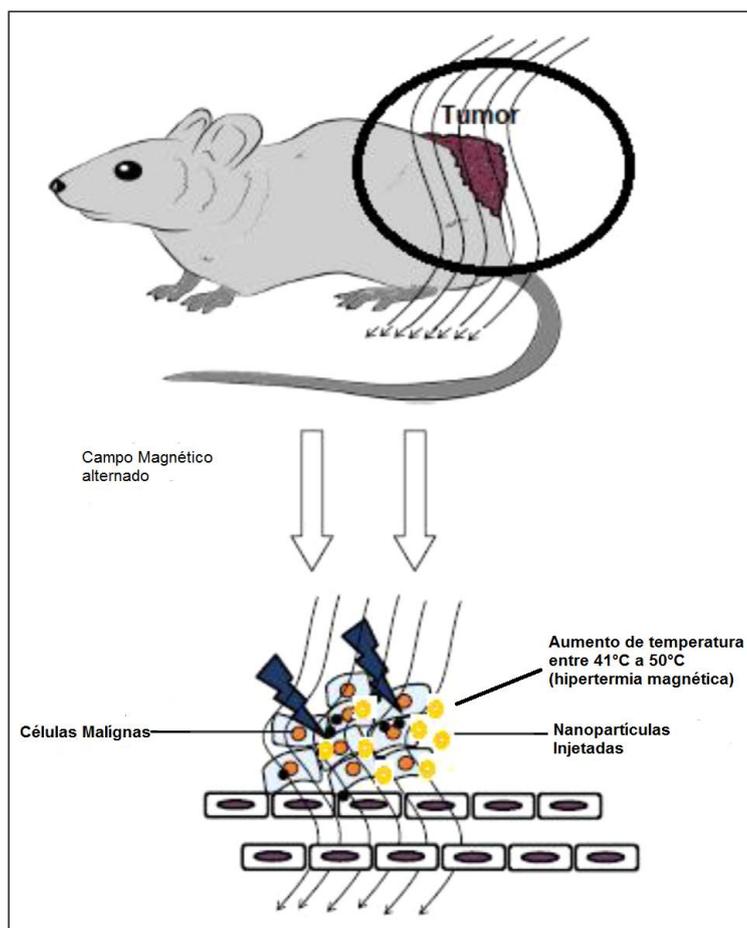


Figura 06. Diagrama esquemático do tratamento de hipertermia (adaptado de SOHAIL et al., 2017).

Além de todas os benefícios oriundos da utilização da MHT, a administração combinada com novos fármacos, como o Selol nanoencapsulado (NcSel), uma nanoestrutura rica no antioxidante selol, tem potencial para aumentar ainda mais a eficácia destas nanoestruturas na terapia anticâncer (SOUSA, 2015).

1.4.3 Selênio, Selol e Nanocapsulas de Selol

O mineral selênio (Se), componente das selenoproteínas (proteínas com aminoácido selenocisteína), como a glutathione peroxidases (GPxs) e tioredoxina redutases (TrxRs), tem papel importante como antioxidante celular, protegendo o DNA e outros componentes celulares contra o dano oxidativo causado pelas EROs, além de ser essencial para o funcionamento do sistema imunológico (DOMINIAK et al., 2017).

A deficiência de selênio pode comprometer a homeostase tecidual bem como comprometer a ativação, diferenciação e proliferação das células imune (HUANG; ROSE; HOFFMAN, 2012). Apesar de sua importância para o organismo, o selênio é absolutamente tóxico em grandes quantidades. A suplementação à base de selênio tem causado severos efeitos adversos limitando seu uso na aplicação clínica (GAROUSI, 2015).

Letavayová et al. (2008) demonstraram que doadores inorgânicos de Se, como o selenito de sódio, podem ser mais tóxicos e menos eficazes na absorção intestinal do que espécies de Se orgânico. Por outro lado, alguns doadores orgânicos de Se, selenocisteína e selenometionina, podem incorporar-se de forma não específica a proteínas como hemoglobina, levando a mudanças estruturais (conformacionais) seguidas de distúrbios (SCHRAUZER, 2003). Preocupações sobre a segurança e eficácia terapêutica do selênio parecem ser substanciadas, com grande necessidade de se encontrar novos compostos doadores / transportadores de selênio.

Neste contexto, tem sido mostrado que o Selol, um composto orgânico sintetizado a partir de selenitotriglicerídeos de óleo de girassol, é uma ótima fonte doadora de selênio (ŚLUSARCZYK et al., 2014). Sendo um fármaco orgânico, tem revelado menor potencial de toxicidade do que o selenito de sódio, um composto inorgânico de Se (IV) (SOCHACKA et al., 2014), exibindo atividade quimiopreventiva e anticancerígena (FALQUEIRO et al., 2011). Além de seu papel como antioxidante e agente de prevenção do câncer, o selênio também exibe propriedades anticancerígenas. Sua administração juntamente com quimioterápicos ou radiação pode aumentar a eficácia do tratamento antineoplásico, onde o Se age como um pró-oxidante ao invés de um antioxidante, induzindo a apoptose por meio de estresse oxidativo.

Sochacka et al. (2014) demonstraram que o Selol 5% administrado *in vivo* atua como um inibidor da atividade da tioredoxina redutase e induz a elevação do estresse oxidativo durante sua suplementação em longo prazo no plasma e nos eritrócitos, o que pode ser importante na terapia antineoplásica.

Suchocki et al. (2007) mostraram que o Selol sensibilizou células leucêmicas resistentes a quimioterápicos, indicando que este composto poderia ser utilizado como agente quimiossensibilizador no tratamento do câncer. Estevanato et al. (2012) evidenciaram que células do adenocarcinoma mamário foram mais afetadas por nanocápsulas magnéticas contendo Selol do que células de mama normais, na ausência ou presença de campo magnético alternado. Dominiak et al. (2017) demonstraram que o Selol não revela potencial mutagênico, é amplamente distribuído no organismo e com capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica, além de ser rapidamente reabsorvido pelo sistema digestivo e completamente eliminado do organismo 24 h após sua administração, evitando, portanto, acumulação e efeitos tóxicos.

De Souza et al. (2014) desenvolveram nanocápsulas de Selol capazes de manter a sua atividade contra células de adenocarcinoma de pulmão, exibindo toxicidade reduzida para as células não tumorais *in vitro*, e demonstrando, assim, potencial adequado para o tratamento de câncer de pulmão.

Em organismos mais velhos, onde alterações genéticas e imunológicas acumuladas ao longo da vida favorecem a progressão de tumores, alternativas como as apresentadas representam esperança de melhor eficácia terapêutica no tratamento do câncer de mama. Apesar disso, poucos estudos envolvendo nanocompostos em idosos portadores de câncer têm sido realizados. Entre estes poucos trabalhos, Hurria et al. (2015) avaliaram diferenças relacionadas à idade na toxicidade e farmacocinética de nanopartículas contendo Paclitaxel ligadas à albumina, em 40 pacientes entre 31 e 80 anos de idade. O estudo demonstrou que a concentração de nanopartículas aumentou no sangue com a idade, embora não tenha ocorrido diferença significativa na toxicidade, entre idosos e jovens.

Novos estudos devem ser realizados para avaliar os efeitos biológicos de nanoestruturas em organismos idosos. Em consonância, este trabalho objetiva avaliar a biocompatibilidade e a biodistribuição de nanopartículas magnéticas recobertas por citrato (NpCit), em camundongos *Swiss* fêmeas idosas e jovens, não portadores de tumor. Além disso, testar a eficácia da magnetohipertermia mediada pela NpCit associada à quimioterapia com nanocápsulas contendo Selol (NcSel), no tratamento do tumor de mama induzido por

células de Ehrlich em camundongos fêmeas albinos *Swiss*, com idade avançada (de 12 a 16 meses).

O tumor de Ehrlich é descrito como um adenocarcinoma mamário murino espontâneo de camundongos fêmeas, com capacidade de crescer em linhagens como *Swiss* e *Balb/c*, de forma rápida e com comportamento agressivo. Possibilita o estabelecimento de modelo de tumor transplantável sob a forma ascítica, quando inoculado intraperitonealmente, ou na forma sólida, quando inoculado subcutânea ou intramuscularmente (OZASLAN, et al., 2011) e, desta maneira, avaliar as atividades antitumorais de vários fármacos naturais e sintéticos (PATRA et al., 2015).

2. JUSTIFICATIVA

A elevada e crescente taxa de incidência de câncer de mama, sobretudo em mulheres idosas, e a incapacidade das terapias convencionais em curar todos os tipos de câncer aliada à agressividade e à toxicidade das mesmas, têm estimulado a busca por novas alternativas que objetivam diminuir os efeitos adversos e aumentar a eficácia terapêutica. Nesse contexto, as terapias nanotecnológicas, especialmente quando combinadas, têm sido reportadas como uma alternativa interessante. É notório o escasso conhecimento a respeito dos efeitos das estratégias nanobiotecnológicas em organismos idosos, o que evidencia a necessidade de pesquisa que investigue aspectos da biocompatibilidade e biodistribuição de NPMs em animais idosos e também a eficácia da MHT combinada com quimioterapia, no tratamento do tumor de mama em camundongos fêmeas idosas. Esses dados aliados ao pioneirismo desse estudo justificam a realização desta pesquisa.

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

- Avaliar a toxicidade e biodistribuição de nanopartículas magnéticas recobertas por citrato (NpCit) e sua eficácia na magnetohipertermia, combinada ou não com quimioterapia por nanocápsulas de Selol (NcSel), para tratamento do tumor de Ehrlich implantado em camundongos fêmeas *Swiss* idosas.

3.2 Específicos

- Avaliar a estabilidade coloidal da amostra NpCit;
- Avaliar, em camundongos fêmeas jovens e idosas, a biocompatibilidade do NpCit, por meio de análises histológica, hematológica, bioquímica, imunológica, observações de peso e comportamento dos animais ao longo do tratamento;
- Analisar a biodistribuição da NpCit em camundongos fêmeas jovens e idosas, não portadores de tumor, por meio de espectrometria óptica e análise histológica;
- Avaliar os efeitos da magnetohipertermia e/ou da quimioterapia sobre tumor de mama induzido ortotopicamente por células de Ehrlich, em camundongos fêmeas idosas, por meio de observações clínicas, mensurações do tumor e de análises histológica, hematológica, bioquímica e imunológica.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Nanopartículas magnéticas recobertas com citrato

Foram sintetizados dois lotes de FM com NPMs de maghemita (γ -Fe₂O₃) recobertas com citrato, denominados NpCit. O primeiro lote foi sintetizado e gentilmente cedido pela profa. Dra. Emília Celma de Oliveira Lima, da UFG e o segundo lote, pelo prof. Marcelo Henrique Sousa, do Instituto de Química (IQ) da Universidade de Brasília (UnB). Usando protocolo de síntese já descrito na literatura, ligeiramente modificado (SHRESTHA et al., 2016), 50 mL de uma solução aquosa contendo 50 mmol de FeCl₂, 25 mmol de FeCl₃ e 20 mmol de HCl foram vertidos em 250 mL de NH₄OH 1 mol / L, sob agitação vigorosa a ~ 25° C. Após 30 min, o precipitado formado (Fe₃O₄) foi separado magneticamente e lavado com água várias vezes até a solução atingir o pH neutro. Em seguida, o pH foi ajustado para cerca de 4 com solução de HCl, e a magnetita produzida foi oxidada para maghemita usando fluxo de gás oxigênio, mantendo a suspensão a 80°C por 4 h. Para preparar as NPs cobertas com citrato (NpCit), a maghemita preparada foi tratada com citrato trissódico (razão molar de citrato: ferro = 1: 10) a 80°C por 30 min. O precipitado obtido foi recolhido magneticamente, lavado duas vezes com acetona (excesso de acetona evaporada), ressuspensão em água, pH ajustado a ~ 7,0.

As formas e dispersibilidades de tamanho das nanopartículas foram obtidas por microscopia eletrônica de transmissão (MET) (Jeol JEM-1011). Para este propósito, a amostra FM foi diluída (1: 100) em água deionizada purificada em um sistema Milli-Q® (Millipore Corporation®) antes da deposição em grades revestidas com carbono. A estabilidade coloidal da NpCit foi monitorada por meio de características como índice de polidispersão (IPD), potencial zeta e tamanho hidrodinâmico em função do pH usando um Zetasizer NanoZS (Malvern). As medidas foram realizadas em triplicata, a 25°C, com ângulo de detecção fixo de 173° e comparadas às medidas realizadas anteriormente (NEVES et al, 2017; BONADIO et al, 2017). Através de Difractometria de raios-X (DRX) foram feitas análises do pó das amostras secas em um difratômetro Miniflex 600 (Rigaku) com intervalo de 20° a 70°, utilizando radiação Cu-K α e operando a 40 kV e 30 mA.

4.1.1 Aquecimento dos fluidos magnéticos submetidos ao campo magnético alternado

Para verificar o aquecimento da NpCit submetidas a um campo magnético de frequência alternada (CMA) na etapa 02, uma alíquota de 110 μ l foram colocadas em microtubos e estes foram posicionados no centro da bobina do equipamento que gera CMA (nanoTherics magneTherm™). Assim, o Capacitor e a (bobina) B2 17, na frequência de 330 kHz, 32 V e 7,8 A foram usados para se estudar o perfil de aquecimento da NpCit, adaptado de Sousa, (2015). Uma câmera infravermelha (FLIR SySTEMS®, Flir Infracam SD 2008, ENGLISH (EN) foi usada para registrar as temperaturas das amostras.

4.2 Nanocápsulas de Selol

As nanocápsulas de PLGA contendo Selol, denominadas NcSel, amostra utilizada para a quimioterapia neste trabalho, é constituída por ácido poli láctico-co-glicólico (PLGA), contendo 10 mg/mL de Selol 5%, o que equivale a 500 μ g de selênio. NcSel foi desenvolvida com o apoio da Dra. Jaqueline R. Silva, do grupo de Nanobiotecnologia, Instituto de Biologia da Universidade de Brasília (UnB). O Selol utilizado foi sintetizado e patenteado pelos departamentos de Análise de Fármacos e de Química Farmacêutica, da Universidade de Medicina de Varsóvia, Polônia, e gentilmente cedido para este estudo.

A preparação do NcSel foi feita por deposição interfacial do polímero e evaporação de solvente. Para este fim, foram sucessivamente dissolvidos ácido poli láctico-co-glicólico (PLGA) 0,150 g em 6 mL de acetona; Epikuron (fosfatidilcolina de soja) 0,150g em solução de 2 mL de metanol e acetona; 0,150 g de Polaxamer 407 em tampão fosfato 0,1M pH 7,4 em 4,5 mL. Em seguida, 100 mg de óleo de soja e 100 mg de Selol foram misturados com 6 mL de acetona. Após a total dissolução de cada constituinte, foi misturado sob agitação, o PLGA e o Epikuron (SOUSA, 2015).

O diâmetro hidrodinâmico (DH), o índice de polidispersão (PdI) e o potencial zeta (Zp) foram determinados por dispersão de luz dinâmica e dispersão de luz eletroforética em Zetasizer Nano ZS® (Malvern Instruments Ltd., Reino Unido; laser 633 nm). Em temperatura de 25°C e o ângulo de leitura foi fixado em 173°. Leitura realizada em triplicata. A caracterização da forma e da morfologia do NcSel foi investigada em microscópio eletrônico de varredura (MEV) (JEOL JSM 7001-F® Japão) (De SOUZA et al., 2014).

4.3 Animais

Foram utilizados camundongos fêmeas idosas, não isogênicas da linhagem *Swiss*, entre 12 a 16 meses e massa corporal de $40\text{g} \pm 5\text{g}$ e camundongas jovens entre 03 a 04 meses da mesma linhagem com o peso de $30 \pm 5\text{g}$. Inicialmente estes animais foram mantidos em quarentena no alojamento de animais do Departamento de Genética e Morfologia (GEM) do Instituto de Ciências Biológicas (IB) da UnB, sendo posteriormente relocados para estantes ventiladas permanentes, mantidos em mini-isoladores, com maravalha, sob condições de controle de temperatura, $22^\circ\text{C} \pm 2$ com ciclo de claro-escuro de 12 horas, recebendo água filtrada e ração balanceada *ad libitum* até atingirem a idade para o experimento.

Todos os procedimentos que foram realizados para anestesia e eutanásia dos animais estão em acordo com os métodos recomendados pelo Comitê de Ética no Uso Animal - CEUA n°.17672/2016 (ver anexo 1). O tamanho amostral foi baseado levando-se em consideração a proposta de Gontijo e Tice (2003) que estabelece a utilização de 6-10 animais por grupo para não invalidar o experimento em caso de morbidade ou mortalidade. Apesar da probabilidade de ocorrência destes eventos seja menor em ambiente controlado, animais idosos têm maior risco de mortalidade e, dessa forma, foram utilizados 07 animais por grupo.

4.4 Etapas do Estudo

O estudo foi dividido em 02 etapas. Na primeira, um total de 54 animais *Swiss* fêmeas (14 a 16 meses de idade) foram utilizados em 08 grupos (Quadro 01). Uma única injeção de NpCit foi administrada por via intraperitoneal nos animais. A solução salina tamponada com fosfato (PBS) foi utilizada (detalhada em 4.4.1) nos grupos controle idosos (IC) e jovens (JC) ($n = 09$). O material biológico foi coletado aos 1, 7 e 28 dias após a injeção de NpCit. Grupos administrados com NpCit foram constituídos por camundongos fêmeas idosas ($n = 07$) denominados IN1, IN7, IN28 e jovens ($n = 05$), denominados JN1, JN7 e JN28. Comparações de dados obtidos dos grupos administrados com NpCit e controles correspondentes, assim como das idosas e dos grupos jovens correspondentes, foram realizadas. A verificação da influência da idade e da administração da NpCit nos aspectos de biodistribuição e biocompatibilidade foram avaliados.

Quadro 01- Etapa 1. Biodistribuição e Biocompatibilidade

Especificação dos grupos experimentais	Sigla	Qtd de animais
Etapa 01 Testes de biocompatibilidade e biodistribuição de NpCit		
Animais idosos administrados com PBS (150 µL)	IC	09
Animais jovens administrados com PBS (150 µL)	JC	09
Animais idosos administrados com NpCit (150 µL). Coleta 01 dia	IN1	07
Animais jovens administrados com NpCit (150 µL). Coleta 01 dia	JN1	05
Animais idosos administrados com NpCit (150 µL). Coleta 07 dias	IN7	07
Animais jovens administrados com NpCit (150 µL). Coleta 07 dias	JN7	05
Animais idosos administrados com NpCit (150 µL). Coleta 28 dias	IN28	07
Animais jovens administrados com NpCit (150 µL). Coleta 28 dias	JN28	05

Obs. 1 - As coletas (órgãos e sangue) para os testes de toxicidade e biodistribuição foram feitas 1, 7 e 28 dias após a administração da amostra NpCit nos animais sem tumor.

Obs. 2 – Os animais idosos têm entre 14 e 16 meses (IC, IN1, IN7 e IN28) e os jovens entre 03 e 04 meses (JC, JN1, JN7 e JN28).

A segunda etapa avaliou a eficácia do tratamento da magnetohipertermia com NpCit associada ou não à quimioterapia com NcSel, em camundongos *Swiss* idosas, com idade entre 12 a 14 meses, portadoras de tumores sólidos induzidos na mama (Quadro 02). Um total de 77 camundongos albinos fêmeas foram divididos em 11 grupos (n = 07 animais por grupo).

Um grupo com tumor sem tratamento foi usado como controle tumoral (CT), outro grupo sem tumor (CS) usado como controle de referência. Os demais grupos foram tratados por duas semanas e receberam 05 ou 06 injeções de nanoestruturas ou PBS em dias alternados, de acordo com o grupo (detalhado em 4.4.2 e 4.5). A NpCit foi administrada intratumoralmente, enquanto a NcSel e o Taxol®, intraperitonealmente. Os grupos MHT, MHTNC e SMHTNC foram submetidos a 12 sessões de magnetohipertermia com duração de 30 minutos cada. O grupo PTX recebeu Taxol® na dose de 10 mg / kg de peso corporal a cada quatro dias no total de 04 doses (CHOUDHURY et al., 2017).

Quadro 02- Grupos Experimentais

Especificação dos grupos experimentais	Sigla	Qtd de animais
Etapa 02. Testes de eficácia de tratamento tumoral em camundongos fêmeas Swiss idosas		
Animais com tumor não tratados, PBS (300 µL), administrado por 02 semanas. Coleta realizada 01 semana após as administrações.	CT	07
Animais sem tumor e sem tratamento, PBS (300 µL), administrado por 02 semanas. Coleta realizada 01 semana após as administrações.	CS	07
Animais com tumor tratados com NpCit (300 µL) por 02 semanas. Coleta 01 semana após o tratamento.	NP	07
Animais com tumor tratados com NcSel (600 µL) por 02 semanas. Coleta 01 semana após fim do tratamento	NC	07
Animais com tumor tratados com MHT (NpCit, 300 µL + CMA), por 02 semanas (06 sessões). Coleta 01 semana após fim do tratamento.	MHT	07
Animais com tumor tratados com MHT (NpCit, 300 µL + CMA) + NcSel (600 µL), por 02 semanas (06 sessões). Coleta 01 semana após fim do tratamento.	MHTNC	07
Animais com tumor tratados com NpCit, 300 µL + NcSel (600 µL), por 02 semanas (06 administrações). Coleta 01 semana após fim do tratamento.	NPNC	07
Animais com tumor tratados com paclitaxel (Taxol®), por 02 semanas (04 administrações) na dose de 10 mg / kg de peso corporal a cada quatro dias. Coleta 01 semana após fim do tratamento	PTX	07
Sobre vida dos animais com tumor não tratados, PBS (300 µL), administrado por 02 semanas. Coleta realizada 30 dias após o tratamento.	SCT	07
Animais com tumor tratados com MHT (NpCit, 300 µL + CMA) + NcSel (600 µL), por 02 semanas (06 sessões). Coleta realizada 30 dias após fim do tratamento.	SMHTNC	07
Animais com tumor tratados com paclitaxel (Taxol®), por 02 semanas (04 administrações) na dose de 10 mg / kg de peso corporal a cada quatro dias. Coleta realizada 30 dias após fim do tratamento.	SPTX	07

Obs 1 – As coletas (órgãos, sangue e células da medula) foram realizadas para avaliação da eficácia terapêutica. Todos os animais do quadro tinham entre 12 e 14 meses.

Obs 2 – Os controles sem tratamento, os controles positivos tratados com paclitaxel e os grupos que apresentaram remissão parcial/total do tumor foram avaliados em relação à sobrevida 30 dias após o tratamento. Testes histopatológicos foram feitos após morte espontânea.

NpCit = Nanopartículas magnéticas revestidas com citrato;

NcSel = Nanocápsulas de Selol;

MHT = Magnetohipertermia (NpCit + campo magnético alternado);

Paclitaxel = quimioterápico convencional para tumor de mama;

Todos os animais da etapa 02 foram eutanasiados uma semana após o tratamento. Para os grupos da sobrevida SCT, SMHTNC e SPTX, os animais foram eutanasiados 30 dias após o tratamento.

4.4.1 Análises da biodistribuição da NpCit e seu uso na Magnetohipertermia

A biodistribuição da amostra NpCit foi avaliada inoculando-se intraperitonealmente uma única injeção de NpCit nos animais experimentais. A concentração de ferro escolhida foi de 2,4 mg (150 µL) dentro do intervalo observado em vários estudos científicos envolvendo injeção de nanopartículas de ferro em camundongos (SILVA et al., 2010). Solução salina tamponada com fosfato (PBS) foi usada nos grupos controles com o mesmo volume.

Após o período experimental, os órgãos fígado, baço, pulmão, rins e cérebro foram coletados e, em seguida, pesados inteiros e fragmentados para o estudo da biodistribuição. Uma parte deles foi armazenada em microtubos (1,5 mL), devidamente identificados, a -20 °C e, após o processamento, reservados para a análise em espectrometria de emissão óptica de plasma acoplada por indutividade (ICP-OES), enquanto a outra parte foi destinada para análises histológicas.

Para quantificar o ferro relativo dos órgãos coletados, as amostras (os órgãos e o sangue) foram totalmente desidratadas, utilizando o Eppendorf Vacuum Concentrator Plus, digeridas com ácido nítrico concentrado a 68%, e posteriormente diluídas em água Milli-q, em uma proporção de 150µL de solução das amostras para 9,85 mL de água Milli-q e armazenadas em tubos Falcons de 15 mL. Após o preparo, as amostras foram processadas no espectrômetro *Optima 8000 ICP-OES Spectrometer*. Para a preparação histológica com coloração de Perls, as lâminas foram tratadas com ácido clorídrico 2%, ferrocianeto de

potássio (3H2O) a 2% na proporção 1:1 e contra-coradas com vermelho rápido nuclear. Foram feitos cortes de 3-5 μm de cada amostra. As lâminas foram observadas no sistema de imagem Invitrogen™ EVOS™ FL. Na etapa 02, foi usado um segundo lote de NpCit para a realização da magnetohipertermia. Em resumo, 05 injeções de NpCit foram administradas intratumoralmente nos animais durante duas semanas de tratamento. A concentração de ferro escolhida foi de 4,0 mg / 300 μL (SILVA et al., 2010), com os volumes de 150 μL , 50 μL , 40 μL , 40 μL , 20 μL , respectivamente nos dias 01, 03, 05, 07 e 09.

4.4.2 Administração do NcSel

O NcSel foi testado como quimioterápico, conforme descrições do Quadro 2. Resumidamente, 06 injeções de NcSel, 100 μL por injeção, foram administradas intraperitonealmente nos animais, por duas semanas. A concentração do NcSel foi 6,0 mg / 600 μL , equivalente a 300 μg de selênio (tratamento de duas semanas). Nos grupos NPNC, MHTNC e SMHTNC o NcSel foi administrado concomitantemente ao NpCiT.

4.4.3 Biocompatibilidade e eficácia terapêutica

A verificação da biocompatibilidade, etapa 01, e dos efeitos adversos, etapa 02 deste estudo, foi realizada por meio do hemograma completo (leucograma e eritrograma), análises histológica, bioquímica, imunológica e observações clínicas.

Os resultados obtidos no hemograma e exames bioquímicos dos grupos controles, com PBS na etapa 01 e sadios (sem tumor) na etapa 02 foram utilizados como valores de referência, pois estes grupos foram constituídos por animais da mesma idade, linhagens e submetidos às mesmas condições de sobrevivência.

4.4.3.1 Contagem global e diferencial de leucócitos e eritrócitos

O hemograma, contagem dos leucócitos totais e suas subpopulações, bem como a de eritrócitos e plaquetas (leucograma, eritrograma e contagem plaquetária) foi realizado conforme descrito por Longo et al. (2016), com pequenas modificações, para avaliar possíveis processos inflamatórios, alérgicos e anêmicos decorrentes da administração da NpCit, na etapa 01, ou dos tratamentos, na etapa 02. Para tanto, 300 μL de sangue total dos animais foram obtidos por meio de punção cardíaca, utilizando-se seringa com EDTA, e

condicionados em microtubo com EDTA 10%. Os exames foram realizadas no Analisador Automático de Hematologia Sysmex pocH-100i™ (Curitiba / Paraná, Brasil) calibrado para camundongos.

4.4.3.2 Análise histológica

Para análise de possíveis alterações morfológicas devidas à administração da NpCit (etapa 01) os órgãos cérebro, baço, fígado, pulmões, rins foram coletados. Nas análises em função dos tratamentos, ou para o estadiamento do tumor (etapa 02), além desses órgãos, os linfonodos sentinela e lateral, mama contralateral e os tumores também foram coletados. Os fragmentos dos órgãos e tumores foram fixados em paraformaldeído a 4%, desidratados em soluções alcoólicas, diafanizados em xilol e embebidos em parafina (LONGO et al., 2016). Cortes teciduais (3-5 µm) foram corados com hematoxilina - eosina (H & E) e analisados sob o sistema Invitrogen™ EVOS™ FL Auto Imaging System.

4.4.3.3 Análise Bioquímica

Para avaliar a função hepática, renal, dano tecidual e estado nutricional após administração das nanoestruturas ou devido aos tratamentos do tumor, etapas 01 e 02 respectivamente, 800 µL de sangue foram obtidos por punção cardíaca, em tubo com gel separador para a obtenção do soro. A análise foi feita em um analisador bioquímico automático Chemwell-t (Labtest, Brasil), conforme orientações do fabricante. Foram realizados os seguintes exames: Alanina aminotransferase (ALT) e Aspartato aminotransferase (AST) para avaliação da função hepática, Lactato desidrogenase (LDH) para detecção de possíveis lesões teciduais e creatinina K, ureia e albumina para avaliação renal.

4.4.3.4 Níveis de TNF-α e Óxido nítrico

Os efeitos da administração de NpCit no processo inflamatório sistêmico (etapa 01) e após os diversos tratamentos (etapa 02), também foram investigados por meio da quantificação dos níveis do fator de necrose tumoral alfa (TNF-α) no soro, pelo ensaio imunoenzimático (ELISA), realizada no laboratório de imunologia e inflamação da UnB (LIMI), de acordo com as instruções do fabricante (eBioscience and R & D System). As placas foram lidas após a adição da solução de interrupção a 450 nm, usando espectrofotômetro SpectraMax M3 (Molecular Devices, Sunnyvale, USA). A medição da produção de Óxido Nítrico foi detectada pelo Reagente Gries contendo 0,05% (0,5mg / mL)

Dicloridrato de N- (1-naftil) etilenodiamina; 0,5% (5 mg / mL) de ácido sulfanílico; e 3) ácido fosfórico a 2,5%. A placa foi ainda incubada durante 10 min com 50µL de reagente Griess à temperatura ambiente, e a densidade óptica (DO dos poços foi determinada utilizando-se um leitor de placas, SpectraMax M3 (Molecular Devices, EUA), a um comprimento de onda de teste de 540 nm.

4.4.3.5 Observações clínicas e verificação do peso

Foram feitas observações sobre o comportamento e reação dos animais ao longo do período de experimentação, tanto na etapa 1 como na etapa 2. A avaliação clínica foi realizada através de alguns parâmetros como perda de pelo e peso, diarreia, inapetência e distúrbios motores (WHITEHEAD et al., 2014). Os animais dos grupos para estudo da biodistribuição foram pesados antes e depois da inoculação da NpCit e anteriormente à sua necrópsia. Os animais dos grupos IN1 e JN1 e seus respectivos controles, tiveram seus pesos verificados 24 horas após a administração da NpCit, imediatamente antes da eutanásia. Os Grupos IN7 e JN7 e seus respectivos controles tiveram seus pesos aferidos no dia zero e no sétimo dia, antes da eutanásia. Os grupos IN28 e JN28 e seus controles, tiveram seus pesos corpóreos verificados quatro vezes, no dia zero, uma vez a cada semana e uma última vez antes da eutanásia.

Na etapa 02, os animais de todos os grupos, foram pesados a cada 03 dias. O consumo de ração foi verificado regularmente ao longo do tratamento e imediatamente antes da eutanásia para verificação do impacto dos tratamentos nos animais.

4.5 Indução, mensuramento e tratamento do tumor.

Na segunda etapa desta pesquisa foi avaliada a eficácia terapêutica da magnetohipertermia com NpCit associada ou não à quimioterapia com NcSel, conforme detalhado no quadro 02. Camundongos da linhagem *Swiss* idosas portadoras de tumor de Ehrlich foram utilizadas como modelo. Para tanto, células de carcinoma ascítico fresco de Ehrlich foram coletadas da cavidade peritoneal dos camundongos, 07 dias após a injeção, e aproximadamente 1×10^7 células, contadas em câmara de Neubauer, foram transplantadas para a quinta glândula mamária dos camundongos para obtenção do tumor sólido. Verificou-se que as células eram mais de que 99% viáveis pelo método de exclusão do corante azul de Trypan. O volume tumoral (V) foi avaliado a cada dois dias, utilizando-se paquímetro digital

stainless hardened® e calculado pela seguinte fórmula: $V = 0,5$ (comprimento \times largura²) mmm³ (ITO; HONDA; KOBAYASHI, 2006).

Os tratamentos com NpCit e NcSel iniciaram 60 horas após a transplantação das células tumorais quando houve a detecção tumoral em todos os animais. Foram empregados 77 camundongos albinos fêmeas divididos em 11 grupos (Quadro 02), com tratamentos durante 02 semanas, sacrificados 01 semana após. Os subgrupos continham: controle positivo (tratamento com Paclitaxel), controle negativo (sem tratamento) como parâmetros para a verificação da eficácia terapêutica dos tratamentos, além dos grupos que foram tratados com NpCit e NcSel associados ou não à exposição ao campo magnético (magnetohipertermia, MHT). Cada sessão de MHT teve duração de 30 minutos, uma vez a cada 48 horas. Para constatar a eficácia do tratamento, foi avaliada também a sobrevivência de animais dos grupos SCT, SMHTNC e SPTX tratados por 02 semanas e sacrificados 30 dias após o tratamento.

4.6 Avaliação da fragmentação do DNA

A avaliação da fragmentação do DNA foi realizada a partir da quantificação total do DNA. Células da medula óssea foram fixadas com etanol a 70% por 2 h, a 4° C, lavadas com PBS, incubadas com 50 µg / mL RNase A por 30 min a 37° C e coradas com 50 µg / mL de iodeto de propídio por 30 min em temperatura ambiente. A contagem foi realizada pelo total de 10.000 eventos por amostra com um citômetro CyFlow® e a taxa de fragmentação do DNA foi observada sub-G1 (conteúdo de DNA < 2n) e calculado considerando-se a totalidade de eventos. Os histogramas representativos foram obtidos pelo *software* FlowJo® (De SOUZA et al., 2014).

4.7 Análise imunohistoquímica

Foram realizadas no Laboratório de Análises Clínicas LIB & Biopsia, reações de imunohistoquímica dos tumores com o marcador Ki67, com objetivo de avaliar a taxa de proliferação das células cancerosas e então associá-las a um prognóstico. Utilizou-se o kit de polímero Dako Envision Dual Link System- HRP. Células Ki-67 positivas foram identificadas usando o anticorpo anti-Ki-67 (Ki-67, SP6 Rabbit Monoclonal Antibody, Cell Mqrque) por dezoito horas à temperatura de 4°C. Como controle negativo, foram incubados tecidos sem anticorpo primário. A expressão imunohistoquímica foi avaliada em microscópio Olympus BX41 com o auxílio de um retículo de integração.

4.8 Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software SPSS (statistical Package for the Social Sciences) versão 18. A normalidade das variáveis contínuas foi avaliada pelo teste de Shapiro-Wilk. Diferenças entre os grupos analisados foram investigadas através de ANOVA (para dados que seguiram a distribuição normal) ou Kruskal-Wallis (no caso de não haver distribuição normal). Para os resultados significativos de ANOVA, comparações dois a dois foram avaliadas por Student's t-test ou Mann-Whitney, de acordo com a distribuição de normalidade e a significância demonstrada pelo asterisco * onde $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$.

5. RESULTADOS

Etapa 01: Biodistribuição e Biocompatibilidade de nanopartículas magnéticas recobertas com citrato (NpCit).

5.1 - Caracterização da NpCit

Os dados referentes à caracterização da amostra NpCit estão resumidos na Tabela 01. Por meio de observação visual constata-se que a amostra NpCit tem coloração marrom avermelhada, característica da maghemita, e ausência de precipitação de nanopartículas, mesmo em alta concentração (18×10^{18} partículas / mL) e presença de campo magnético. As micrografias adquiridas por meio da microscopia eletrônica de transmissão (MET) mostraram nanopartículas NpCit com formas esféricas (Figura 7A). A contagem aleatória de 441 MNPs no MET revelou diâmetro médio de $10,8 \pm 2,7$ nm (Figura 7B). Medidas, especialmente do potencial zeta (-40 mV) e do índice de polidispersão (0,290), bem como o tamanho hidrodinâmico e concentração da amostra, corroboram com a alta estabilidade coloidal da amostra em pH ~ 7 (SHRESTHA et al., 2015).

Tabela 01. Caracterização das nanopartículas de maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) funcionalizadas com citrato (NpCit)

Características da amostra	Avaliação
Fórmula Molecular Maghemita	$\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ *
Diâmetro Médio por DRX	8 nm
Diâmetro médio por MET	10,8 nm
Forma das NPMs	Esférica
Diâmetro hidrodinâmico	78.40 nm
IPD (índice de polidispersividade)	0.290
Potencial Zeta	- 40 mV
Concentração de ferro por absorção atômica	16.0 mg/mL
Concentração de nanopartículas	18×10^{18} partículas/mL
Cor	Marrom avermelhada
pH	7.3

DRX = difratometria de raios X; TEM = microscopia eletrônica de transmissão.

* A fase cristalina das nanopartículas foi caracterizada como maghemita com base na razão Fe (III) / Fe (II).

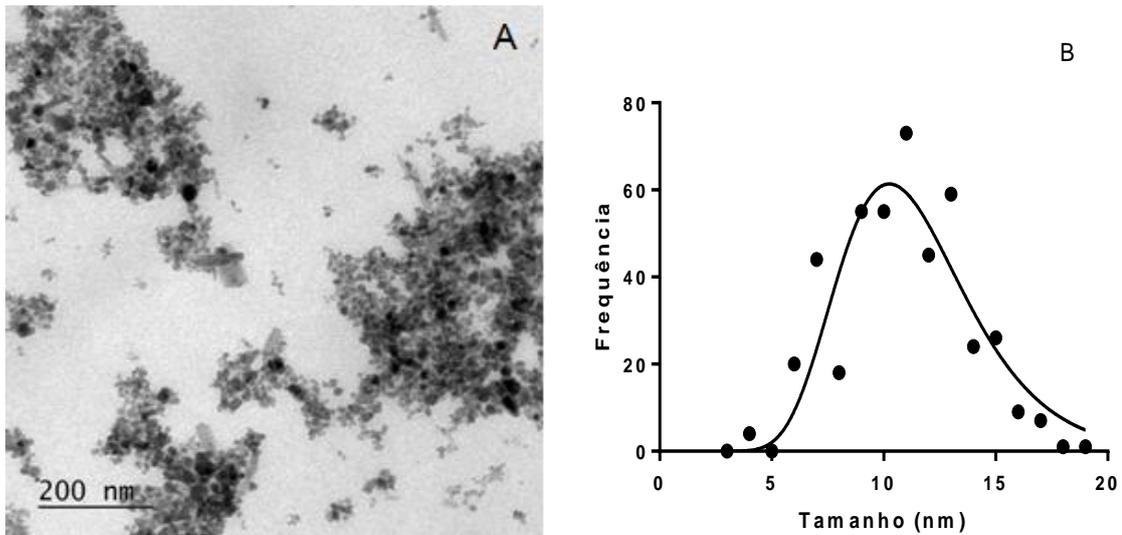


Figura 07. Caracterização de NpCit por microscopia de transmissão eletrônica (MET) (A) Micrografia representativa (barra de escala: 200 nm), (B) Histograma de distribuição de tamanho das NPMs.

5.2 Avaliações da biocompatibilidade

O tratamento intraperitoneal dos camundongos fêmeas idosas com a amostra NpCit (2,4 mg de ferro) não induziu alterações clínicas ou comportamentais óbvias, como perda de pêlo, diarreia, inapetência e disfunção motora durante todo o período experimental em todos os animais idosos e jovens investigados. Não ocorreram mortes de animais. Embora o peso médio dos animais do grupo controle idoso tenha sido maior em comparação com os animais do grupo controle jovem, não foram detectadas diferenças significativas nesta característica devido à administração da NpCit em todos os grupos (grupos de idosos e jovens tratados e seus respectivos controles), como mostrado na Figura 08.

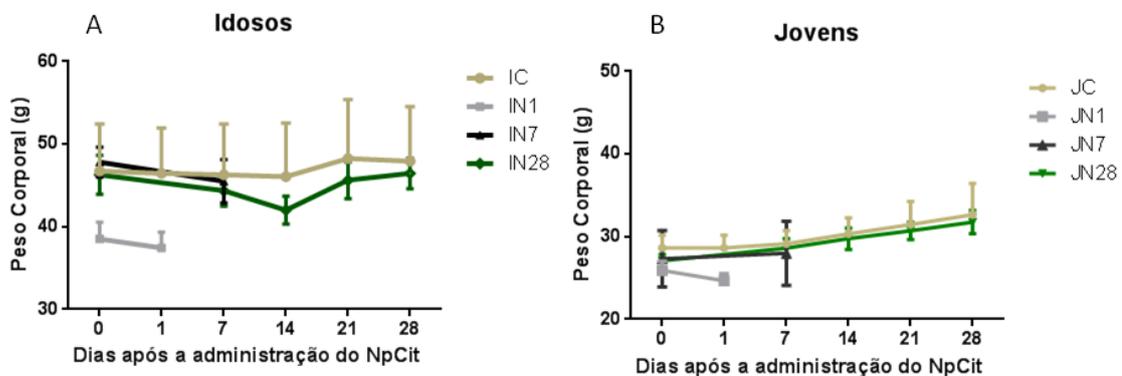


Figura 08. Efeito do tratamento com NpCit (2,4 mg de ferro) sobre o peso corporal médio de camundongos fêmeas idosas (A) e jovens (B). As medidas foram realizadas nos dias 0, 1, 7, 14, 21 e 28 após o tratamento. IC = controle de idosos; IN1, IN7 e IN28 grupos idosos coletados após 1, 7 e 28 dias após o tratamento, respectivamente. JC = controle jovem; JN1, JN7 e JN28 grupos jovens coletados 1, 7 e 28 dias após o tratamento.

As análises bioquímicas (Tabela 02) mostraram, através de comparações entre controles não tratados, que os animais idosos (IC) apresentaram menores concentrações de ALT e albumina que os animais jovens (JC). No entanto, a administração da NpCit induziu efeitos diferentes em animais idosos e jovens. No grupo dos idosos, diminuição significativa, embora temporária, no nível de ureia e um aumento na albumina foram observados no primeiro dia após o tratamento com NpCit (grupo IN1) em comparação com o controle (IC). Os níveis dos analitos aspartato aminotransferase (AST), creatinina K, alanina aminotransferase (ALT) e lactato desidrogenase (LDH) não foram significativamente diferentes, em todos os grupos de idosos tratados (IN1, IN7 e IN28) em comparação com o controle IC. Nos animais jovens, a administração da NpCit causou reduções significativas nos níveis de ureia, albumina e LDH no sétimo dia após a injeção de NpCit (grupo JN7), em comparação com o grupo controle jovem (JC). Neste grupo, como observado no idoso, a NpCit não causou alterações significativas nos níveis de ALT, AST e Creatinina K, em todos os grupos jovens administrados (JN1, JN7 e JN28), em relação ao controle (JC).

Tabela 02. Análise bioquímica de camundongos jovens e idosos após tratamento com NpCit

	ALT (U/L)	AST (U/L)	Creatinina K (mg/dL)	Ureia (mg/dL)	Albumina (g/dL)	LDH (mg/dL)
Idoso						
IC	50±20	203.3±125.4	0.38 ±0.28	50.9 ± 14.2	1.8 ± 0.2	2159.4 ± 1101.1
IN1	63.3±66.2	166±105.2	0.32 ± 0.07	39.0 ± 7.8^{*IC}	2.2 ± 0.3^{*IC}	1427.9 ± 891.9
IN7	50±16.7	246.33±204.33	0.30 ±0.07	45.8 ± 9.3	1.7 ± 0.2	2072.5 ± 497.9
IN28	78.±52.5	171.71±93.68	0.42 ± 0.19	55 ± 24.1	1.6 ± 0.8	1840.7 ± 1213.0
P-valor	0.6121	0.6286	0.4333	0.0500	0.0131	0.5158
Jovem						
JC	98.4± 97^{*IC}	193 ± 127.42	0.38 ± 0.02	42.6 ± 5.5	2.7 ± 0.6^{*IC}	2373.9 ± 1556.7
JN1	81.8 ± 73.8	146 ± 112.57	0.29 ± 0.14	43.4 ± 10.5	2.6 ± 0.4	2127.4 ± 2249.3
JN7	46.6 ± 31.0	174.2 ± 141.3	0.49 ± 0.41	37.2 ± 4.1^{*JC}	2.2 ± 0.1^{*JC}	941.8 ± 634.3^{**JC}
JN28	63.8 ± 59.5	189.5 ± 109.4	0.47 ± 0.33	44.3 ± 12.5	2.2 ± 0.5^{*IN28}	1508.3 ± 819.7
P-valor	0.4436	0.9201	0.6739	0.0499	0.1056	0.4616

Os dados estão expressos como média ± desvio padrão. As letras maiúsculas (sobrescritas) seguidas de números indicam diferenças significativas detectadas entre os grupos dos jovens em relação aos grupos correspondentes idosos. O asterisco seguido por JC ou IC indicam diferenças significativas entre os grupos jovens ou idosos em relação aos seus respectivos controles. * p <0,05 e ** p <0,01. ALT- alanina aminotransferase; AST-aspartato aminotransferase; LDH-Lactato desidrogenase. IC, controle idoso. IN1, IN7 e IN28, grupos de idosos analisados no dia 01, 07 e 28, após o tratamento respectivamente. JC, controle jovem. JN1, JN7 E JN 28, grupos jovens analisados no dia 01, 07 e 28, após o tratamento respectivamente.

A análise do leucograma (Tabela 03) mostrou, por meio de comparações entre os grupos dos idosos e seus correspondentes grupos jovens, que os animais idosos dos grupos IC, IN1, IN7 e IN28 apresentaram diminuição significativa na taxa de linfócitos (W-SCR) e na contagem absoluta de linfócitos (WSCC), comparados aos grupos jovens JC, JN1, JN7 e

JN28, respectivamente. Por outro lado, as mesmas comparações mostraram aumentos significantes nas taxas células médias dos idosos (basófilos, eosinófilos e monócitos W-MCR), em comparação aos grupos jovens.

Entre os idosos, o tratamento com NpCit induziu decréscimos significativos na taxa de linfócitos (W-SCR) observados no grupo dia 01 (IN1) e no dia 28 (IN28) em comparação com o grupo controle idoso (IC). Contrariamente, aumentos significativos na taxa de células médias (basófilos, eosinófilos e monócitos (W-MCR) foram observados também no grupo IN1 e IN28, em comparação com IC. Nos grupos jovens (JN1, JN7 e JN28), diferentemente dos grupos de idosos, a NpCit não induziu alterações significativas nos parâmetros leucocitários investigados quando comparados ao grupo controle JC. Em relação às plaquetas, não foram encontradas diferenças significativas nas comparações entre os grupos controle dos idosos e jovens, nem nas comparações de animais idosos tratados com NpCit com camundongos fêmeas idosas do grupo controle (Tabela 3). A única alteração significativa na contagem de plaquetas foi observada no grupo jovem JN7 em comparação com os animais jovens do grupo controle (JC) e com animais idosos do grupo sete dias (IN7).

Tabela 03. Efeitos do tratamento com NpCit (2,4 mg de ferro) nos parâmetros Leucograma e Plaquetas de camundongos jovens e idosas

	WBC (10 ³ /uL)	WSCR (%)	WMCR (%)	WLCR (%)	WSCC (10 ³ /uL)	WMCC (10 ³ /uL)	PLT (10 ³ /uL)
Idoso							
IC	3.4±2.2	55.0 ± 12.7	41.6 ± 12.5	3.4 ± 3.2	1.7 ± 0.8	1.5 ± 1.2	941.4 ± 364.2
IN1	3.5± 1.5	41.7 ± 12.5^{IC}	57.1 ± 12.9^{IC}	1.3 ± 1.2	1.5 ± 0.8	2.0 ± 0.9	1211.7 ± 492.7
IN7	3.9 ± 2.2	54.3 ± 14.9	40.9 ± 14.1	4.8 ± 4.4	1.9 ± 0.7	1.8 ± 1.4	1169 ± 215.4
IN28	4.6 ± 4.8	44.1 ± 7.9^{IC}	54.1 ± 7.7^{IC}	1.9 ± 0.8	2.1 ± 2.7	2.3 ± 2	1364.4 ± 568.3
P-valor	0.9631	0.0480	0.0306	0.2290	0.7146	0.7434	0.1590
Jovem							
JC	4.6 ± 2.6	80.3 ± 5.3^{**IC}	17.7 ± 4.0^{**IC}	2.3 ± 2.4	3.7 ± 2.2^{*IC}	0.8 ± 0.4	1040.9 ± 269.2
JN1	4.3 ± 1.8	76.7 ± 7.9^{**IN1}	20.7 ± 6.1^{**IN1}	2.6 ± 2.6	3.2 ± 1.2^{*IN1}	0.9 ± 0.6^{*IN1}	732.8 ± 451.4
JN7	3.6 ± 0.5	77.3 ± 8.9^{*IN7}	21.3 ± 7.4^{*IN7}	1.4 ± 1.7	2.8 ± 0.2^{*IN7}	0.8 ± 0.4	1532.8±381^{*JC, *IN7}
JN28	4.8 ± 2	75.2 ± 7.6^{**IN28}	21.7 ± 5.7^{**IN28}	3.0 ± 3.1	3.6 ± 1.0^{IN28}	1.1 ± 0.5	907.6 ± 327.2
P-valor	0.5962	0.6126	0.5216	0.7280	0.5799	0.7072	0.0255

Os dados estão expressos como média ± desvio padrão. As letras maiúsculas (sobrescritas) seguidas de números indicam diferenças significativas detectadas entre os grupos dos jovens em relação aos grupos correspondentes idosos. O asterisco seguido por JC ou IC indicam diferenças significativas entre os grupos jovens ou idosos em relação aos seus respectivos controles. * p <0,05 e ** p <0,01. WBC- Leucócito total; W-SCR - taxa de células pequenas (linfócitos); W-MCR – Taxa células médias (basófilos, eosinófilos e neutrófilos); W-LCR- Taxa de células grandes (monócitos); W-SCC - Contagem absoluta de células pequenas (linfócitos); W-MCC- Contagem absoluta de células médias (basófilos, eosinófilos e monócitos); PLT - Plaquetas; IC, controle idoso. IN1, IN7 e IN28, grupos de idosos analisados no dia 01, 07 e 28, após o tratamento respectivamente. JC, controle jovem. JN1, JN7 e JN 28, grupos jovens analisados no dia 01, 07 e 28, após o tratamento respectivamente.

A análise do eritrograma (Tabela 04) revelou que o processo de envelhecimento causou alterações significativas na maioria dos parâmetros investigados. De fato, os grupos de

idosos, em comparação com seus grupos jovens correspondentes, apresentaram decréscimos significativos na contagem total de eritrócitos (RBC) para IN1, IN7 e IN28 em comparação com (JN1, JN7 e JN28). Além disso, diminuições significativas na concentração de hemoglobina (HGB), volume corpuscular médio (VCM) e hematócrito (HCT) foram observadas para IC, IN1, IN7 e IN28 em comparação com JC, JN1, JN7 e JN28, respectivamente. Por outro lado, a hemoglobina corpuscular média (HCM) foi significativamente maior para IC em comparação com JC, enquanto a largura de distribuição de eritrócitos (RDW) foi maior para IC, IN1 e IN28, em comparação com JC, JN1 e JN28, respectivamente.

Tabela 04. Análise de eritrograma de camundongos fêmeas idosas e jovens observada em diferentes tempos após administração de NpCit (2,4 mg de ferro)

	RBC (10 ⁶ /uL)	HGB (g/dL)	HCT (%)	MCV (fL)	MCH (pg)	MCHC (g/dL)	RDW-CV (%)
Idoso							
IC	7.1 ± 1.8	10.5 ± 2.3	27.2 ± 6.2	38.5 ± 1.4	14.8 ± 0.4	38.6 ± 0.9	15.4 ± 2.1
IN1	7.8 ± 1.1	11.5 ± 1.6	29.9 ± 4.5	38.5 ± 0.6	14.9 ± 0.5	38.6 ± 1.1	15.6 ± 1.8
IN7	8.2 ± 0.3	12.0 ± 0.5	31.2 ± 1.5	38 ± 0.8	14.6 ± 0.5	38.4 ± 1.2	15.0 ± 1.2
IN28	7.3 ± 1.0	10.06 ± 1.4	28.1 ± 3.6	38.4 ± 1.3	14.5 ± 0.6	37.8 ± 1.0	16.2 ± 1.9
P-valor	0.3632	0.3705	0.3976	0.8602	0.4481	0.4626	0.6655
Jovem							
JC	9.2 ± 1.1^{*IC}	13.0 ± 1.4^{*IC}	33.6 ± 3.9^{*IC}	36.6 ± 0.4^{**IC}	14.2 ± 0.3^{**IC}	38.8 ± 0.7	13.6 ± 1.3^{*IC}
JN1	9.1 ± 0.7^{*IN1}	13.2 ± 1.2^{*IN1}	33.6 ± 3.2	37.1 ± 0.9^{*IN1}	14.6 ± 0.3^{*JC}	39.4 ± 0.5	13.4 ± 0.3^{**IN1}
JN7	9.9 ± 0.1^{*IN7}	14.0 ± 0.3^{**IN7}	36.0 ± 0.4^{**IN7}	36.5 ± 0.5^{*IN7}	14.2 ± 0.3	38.5 ± 0.4	14.3 ± 0.8
JN28	9.2 ± 0.9^{**IN28}	13.1 ± 1^{*IN28}	33.72 ± 3.2^{*IN28}	36.8 ± 0.5^{*IN28}	14.2 ± 0.3	38.8 ± 0.4	13.8 ± 0.5^{*IN28}
P-valor	0.2299	0.4546	0.3745	0.6033	0.0481	0.0678	0.1601

Os dados foram expressos como média ± desvio padrão. As letras maiúsculas seguidas de números indicam diferenças significativas Detectadas entre os grupos dos jovens em relação aos grupos correspondentes idosos. O asterisco seguido por JC ou IC indicam diferenças significativas entre os grupos jovens ou idosos em relação aos seus respectivos controles. *p <0,05 e ** p <0,01. RBC - glóbulos vermelhos; HGB-Hemoglobina; HCT- Hematócrito; VCM - volume corpuscular médio; Hemoglobina corpuscular média; MCHC - Concentração média de hemoglobina corpuscular; RDW-CV - Largura de distribuição de glóbulos vermelhos como coeficiente de variação. IC, controle idoso. IN1, IN7 e IN28, grupos de idosos analisados no dia 01, 07 e 28, após o tratamento respectivamente. JC, controle jovem. JN1, JN7 E JN 28, grupos jovens analisados no dia 01, 07 e 28, após o tratamento respectivamente.

Com relação à modulação de citocinas pró-inflamatórias, a administração de NpCit em camundongos fêmeas idosas desencadeou diminuição significativa nos níveis de TNF- α no sétimo dia (IN7) em comparação com camundongos não tratados (IC). Houve também diminuição significativa dos níveis de TNF- α em camundongos jovens submetidos à administração de NpCit analisados no sétimo dia (JN7), em comparação com os camundongos fêmeas idosas correspondentes (IN7), como mostrado na Figura 9A. Além disso, os níveis séricos de óxido nítrico (NO) no soro de camundongos fêmeas idosas do grupo controle (IC) foram significativamente menores comparados com camundongos jovens

do grupo controle (JC), a administração do NpCit, diminuiu significativamente o NO no grupo jovem (JN1), quando comparado com camundongos jovens controle (JC) (Figura 9B).

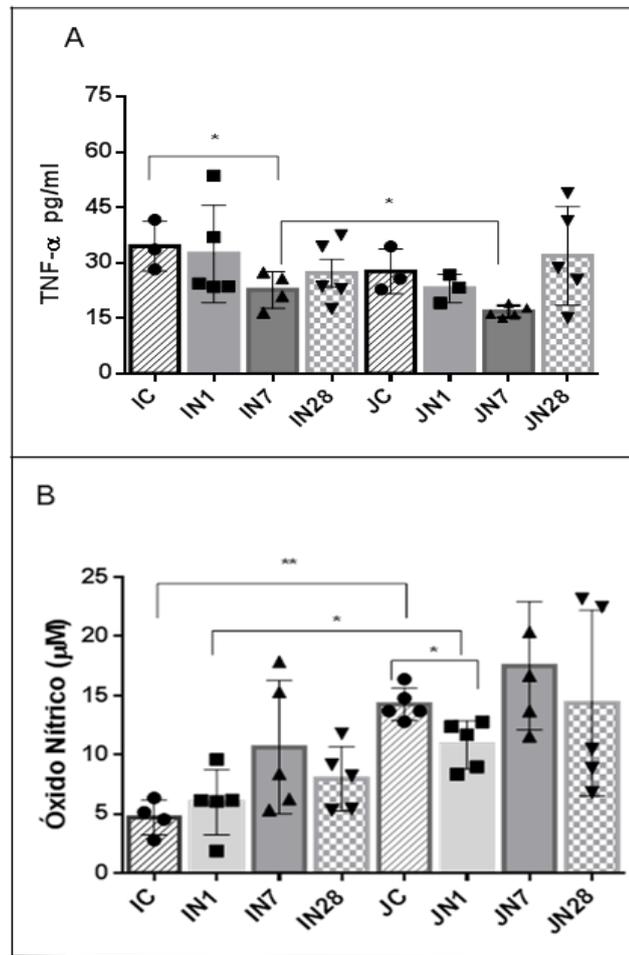


Figura 09. Efeitos de NpCit (2,4 mg de ferro) sobre os níveis de TNF- α e NO no soro de camundongos fêmeas idosas e jovens. IC, controle idoso. IN1, IN7 e IN28, grupos de idosos analisados no dia 01, 07 e 28, após o tratamento respectivamente. JC, controle jovem. JN1, JN7 E JN 28, grupos jovens analisados nos dias 01, 07 e 28, após o tratamento respectivamente. (A) níveis de TNF-a foram detectados por ELISA e (B) os níveis de NO foram detectados pelo teste Griess. Diferenças estatísticas são indicadas por * onde $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$.

A análise histológica dos tecidos após coloração com Hematoxilina e Eosina (H & E) não mostrou anormalidades em todos os tecidos analisados de animais jovens e idosos, tratados ou não tratados com a amostra NpCit (Figura 10). Resumidamente, os cérebros não apresentaram patologias na massa branca e cinzenta; nos baços, as polpas vermelhas e brancas eram fáceis de distinguir, os fígados observados apresentavam hepatócitos em formato poliédrico, radiais de uma veia central e com tamanhos normais; nos pulmões não havia sinais de fibrose; e nos rins, células do glomérulo, túbulos contorcidos proximais e distais apresentaram padrões normais.

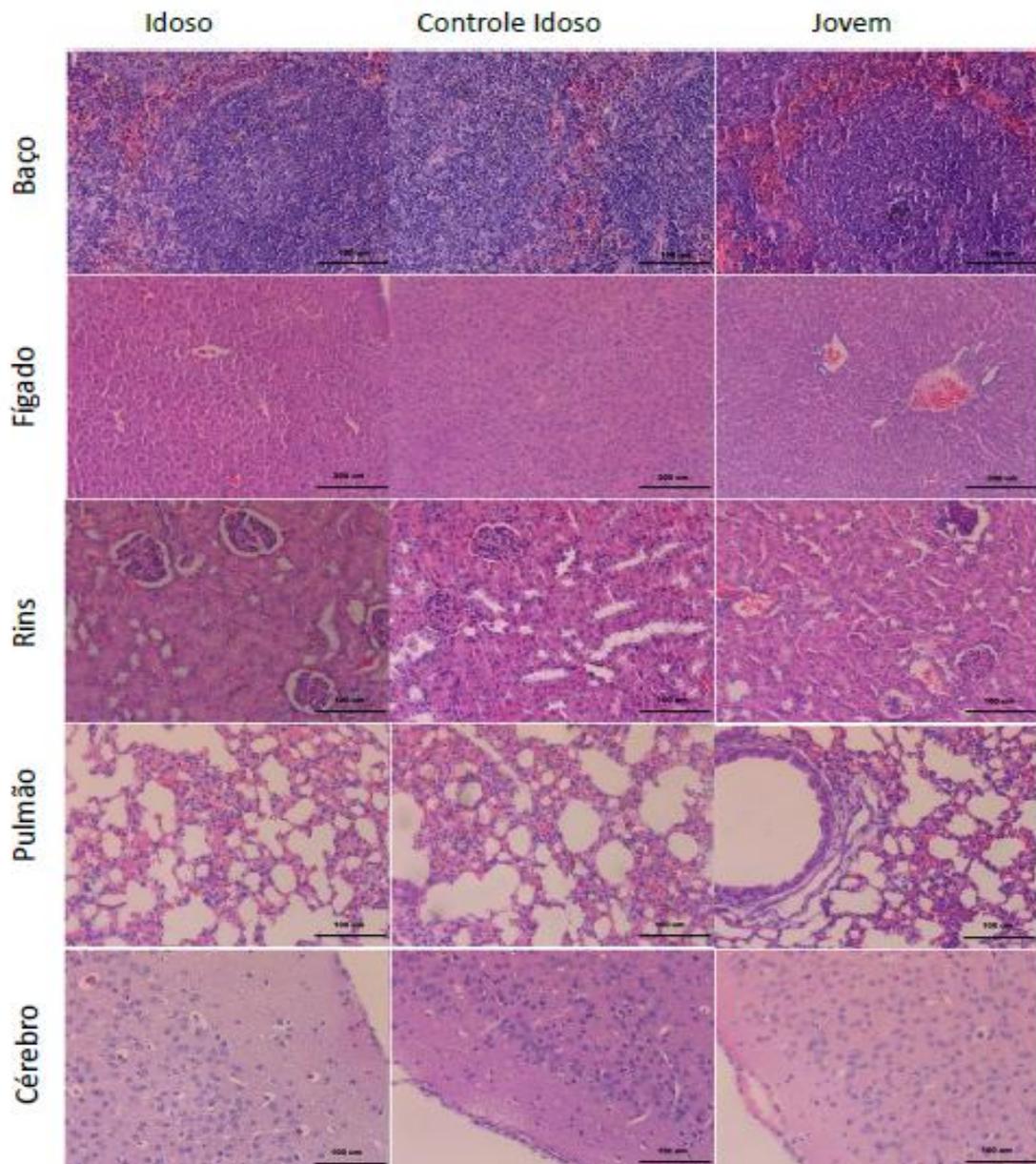


Figura 10. Efeitos da NpCit na morfologia do baço, fígado, rim, pulmão e cérebro de camundongos fêmeas idosas (coluna da esquerda) e jovens (coluna da direita). Seções de órgãos de animais de controle idosos sem tratamento são apresentadas na coluna central. A seção foi corada com H & E. Micrografias são ilustrativas de diferentes tempos de tratamento. As barras indicam escalas entre 100-200 μ m.

5.3 Biodistribuição da NpCit

Os resultados dos estudos de biodistribuição da NpCit nos órgãos e no sangue realizado por ICP-OES são apresentados na Figura 11. As comparações entre o grupo controle idoso (IC) e jovem (JC) mostraram que embora a quantidade de ferro no sangue seja semelhante em ambos os grupos (Figura 5A), o baço, fígado, rim, pulmão e cérebro apresentaram concentração de ferro significativamente maior no grupo idoso (Figuras 5 B-F).

De fato, a distribuição de ferro em ambos os grupos de animais também foi diferente: enquanto o grupo controle idoso (IC) apresenta o decréscimo de concentração de ferro na sequência baço > sangue > fígado > rim > pulmão > cérebro, nos camundongos jovens do grupo controle (JC), a ordem é sangue > baço > fígado > pulmão > rim > cérebro. Esses resultados evidenciam que a idade tem efeitos na distribuição de ferro no organismo.

Em relação aos efeitos induzidos por NpCit, no grupo dos idosos, mudanças significativas na concentração de Fe foram observadas na comparação com os camundongos idosos do grupo controle (IC): aumento no sangue e diminuição nos rins em relação ao grupo (IN1) e aumento no fígado no dia 28 (IN28). Os efeitos significativos de NpCit nos grupos jovens quando comparado ao grupo controle jovem foram diferentes e caracterizados por aumentos nos pulmões no primeiro dia (JN1), no cérebro no dia 7 (JN7) e no baço, fígado e pulmões no dia 28 (JN28). Devido às diferenças iniciais na quantidade de ferro entre grupos de idosos e jovens, a comparação de animais idosos tratados (IN1, IN7 e IN28) com grupos jovens tratados (JN1, JN7 e JN28) conduziu a diferenças significativas particularmente no baço, fígado e cérebro (IN1 x JN1; IN7 x JN7; IN28 x JN28).

Através da coloração dos cortes histológicos com o azul da Prússia (Figura 12) foi possível observar agregados de ferro em alguns órgãos. As concentrações mais elevadas, assim como verificado por ICP-OES, foram observadas no baço no grupo idoso do dia 7 (IN7) que apresentou maiores concentrações de ferro do que o grupo controle (IC) e o grupo jovem correspondente (JN7). Nos grupos jovens, as maiores concentrações no baço foram observadas no dia 28 (JN28).

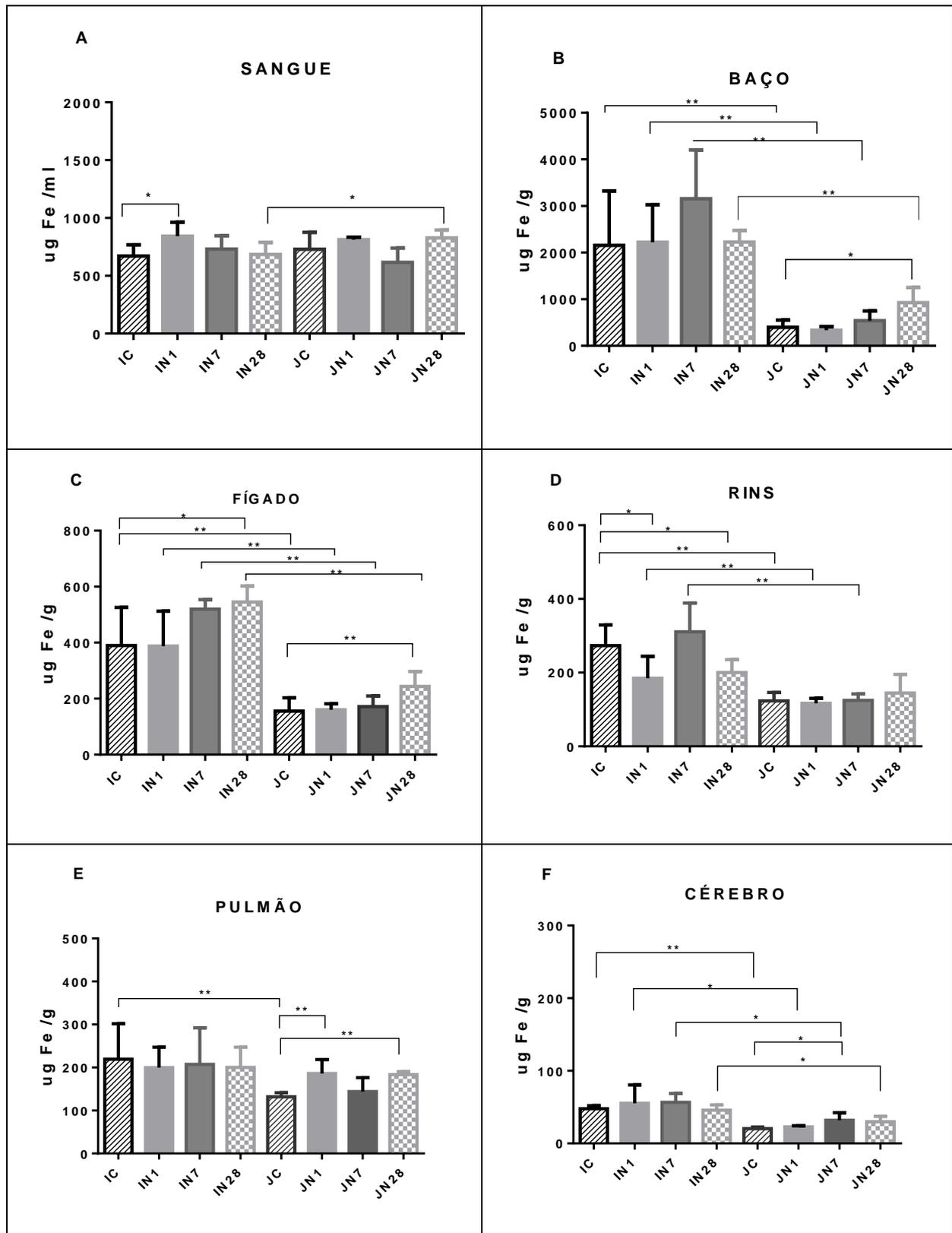


Figura 11. Biodistribuição de ferro obtida por espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP-OES). Concentração de ferro (ug / mL) no sangue e (ug / g) nos órgãos em diminuição em ordem do baço para o cérebro (B-F). IC, controle idoso. IN1, IN7 e IN28, grupos de idosos analisados no dia 01, 07 e 28, após o tratamento respectivamente. JC, controle jovem. JN1, JN7 E JN 28, grupos jovens analisados no dia 01, 07 e 28, após o tratamento respectivamente. Diferenças significativas são indicadas por * onde $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$.

Comparações entre os grupos de idosos e os grupos jovens correspondentes mostraram várias diferenças nas concentrações de ferro. Em geral, a concentração foi maior nos animais idosos do que nos animais jovens, tanto nos grupos tratados com NpCit como nos controles. Nenhuma presença de agregados de ferro foi observada no cérebro de todos os grupos, pela análise de Perls (Figura 12).

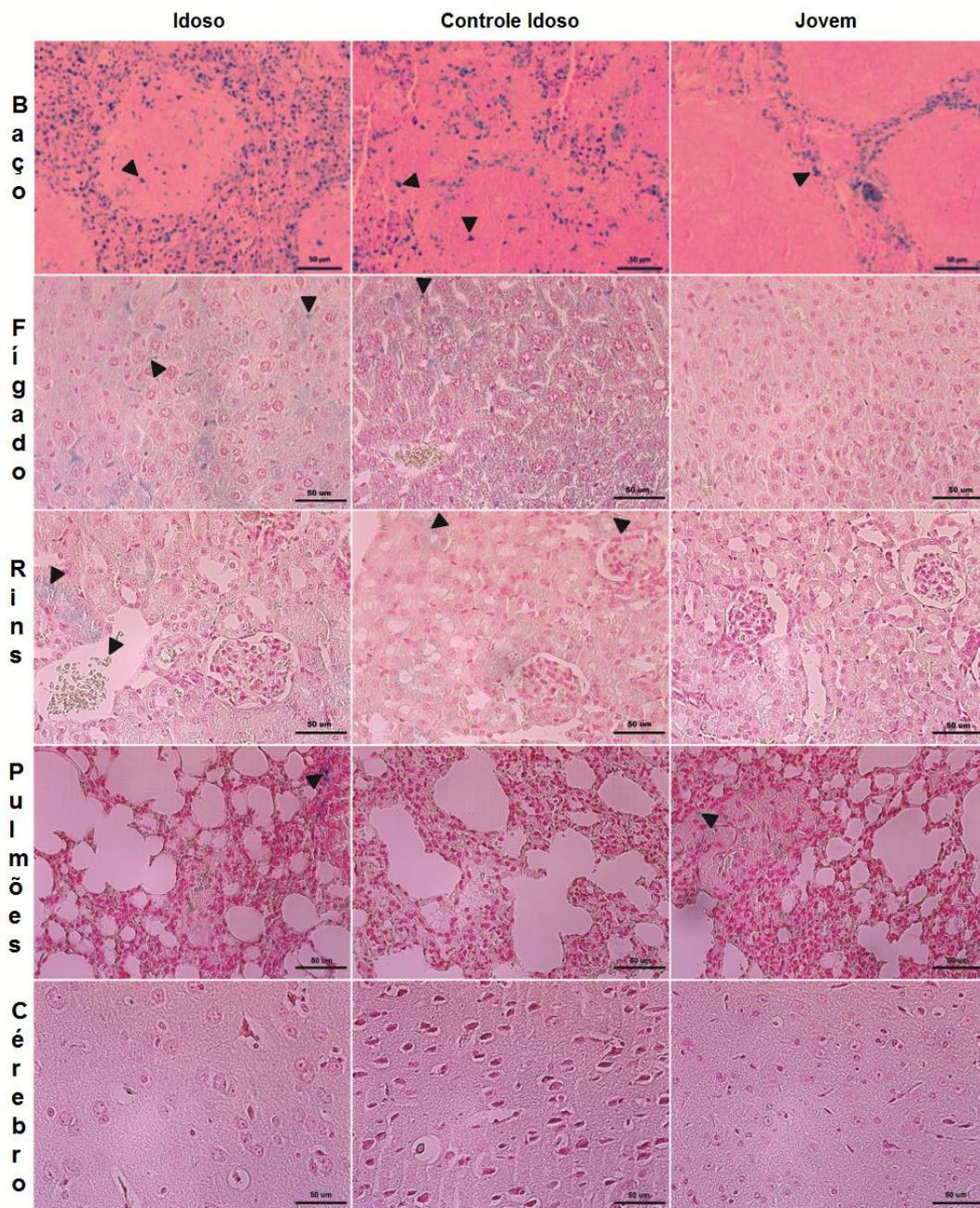


Figura 12. Efeitos da NpCit na distribuição de ferro em idosos (coluna da esquerda) e jovens (coluna da direita) obtida por métodos morfológicos. Seções de órgãos de animais de controle idosos sem tratamento são apresentadas na coluna central. Cortes histológicos do baço, fígado, rins, pulmões e cérebro foram submetidos à coloração azul-prussiana de Perls. As setas indicam alguns agregados positivos azuis mais evidentes no baço. Micrografias são ilustrativas de diferentes tempos de tratamento. As barras indicam 50 µm.

Etapa02- Resultados da eficácia terapêutica da Magnetohipertermia e nanocápsula de PLGA- contendo Selol no tratamento do tumor de mama

5.4 Caracterização da amostra NpCit

Por meio da microscopia eletrônica de transmissão (MET), o segundo lote de NpCit revelou-se de forma esférica e diâmetro médio de $8,64 \text{ nm} \pm 2,03$ (Figura 13A e B), após contagem aleatória de 557 NPMs usando o programa ImageJ®. O padrão de DRX da NpCit mostrou espectros típicos de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ e citrato, apresentando picos principais e secundários em 2θ de 311° e 440° , respectivamente (Figura 13C). Além disso, foram obtidas as medidas do potencial Zeta (-33mV) e índice de polidispersão (0,139), além de outros parâmetros resumidos na Tabela 05, os quais demonstram a estabilidade da amostra (SHRESTHA et al., 2015).

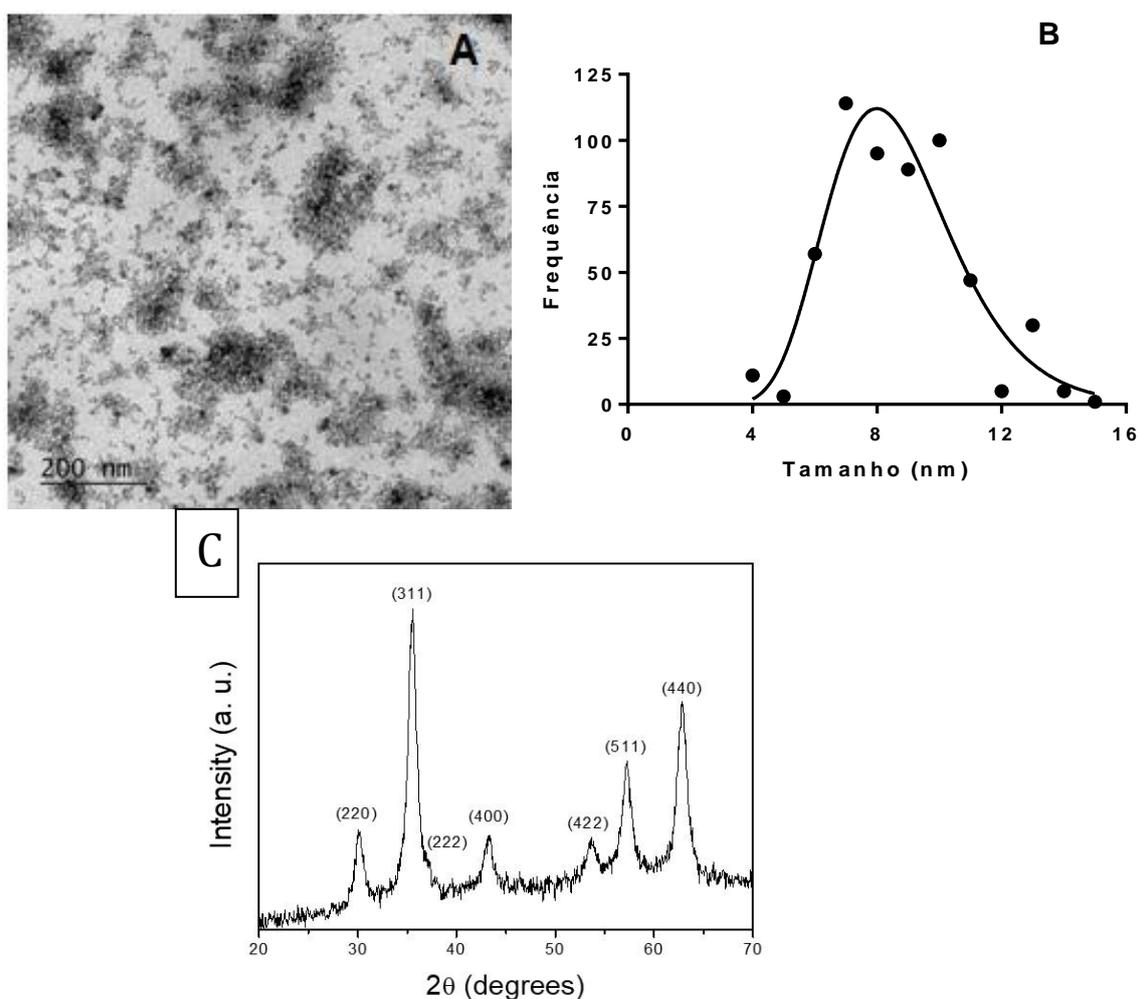


Figura 13. Caracterização de NpCit. (A) Micrografia eletrônica de transmissão representativa (barra de escala: 200 nm); (B) Histograma de distribuição de tamanho (NpCit) obtido pela média do diâmetro de 557 NPMs. (C) Padrões da amostra por DRX.

Tabela 05. Caracterização do fluido magnético com NpCit.

Parâmetros	Características
IPD	0.138 ± 0.012
pH	7.0
Hd (nm)	47.38 ± 0.090
PZ (mV)	-33.1 ± 1.10
MET (nm)	8.64 ± 2.03
Diâmetro médio por DRX (nm)	8.4
Cor	marrom

IPD = índice de polidispersão; pH = potencial de hidrogênio; Hd = diâmetro hidrodinâmico (determinado por espalhamento de luz dinâmico (DLS)); PZ = potencial Zeta (carga superficial); MET = microscopia eletrônica de transmissão (diâmetro médio da amostra NpCit do núcleo) e DRX= difratometria de raios X

5.5 Termometria *in vitro*

O ensaio de termofotografias de temperatura da amostra NpCit exposta ao campo magnético alternado, evidenciou que 110 μL da amostra NpCit alcançou a temperatura de 42° C após aproximadamente 15 minutos e permaneceu nesta mesma temperatura por mais de 30 minutos, como ilustrado nas figuras 14A e B.

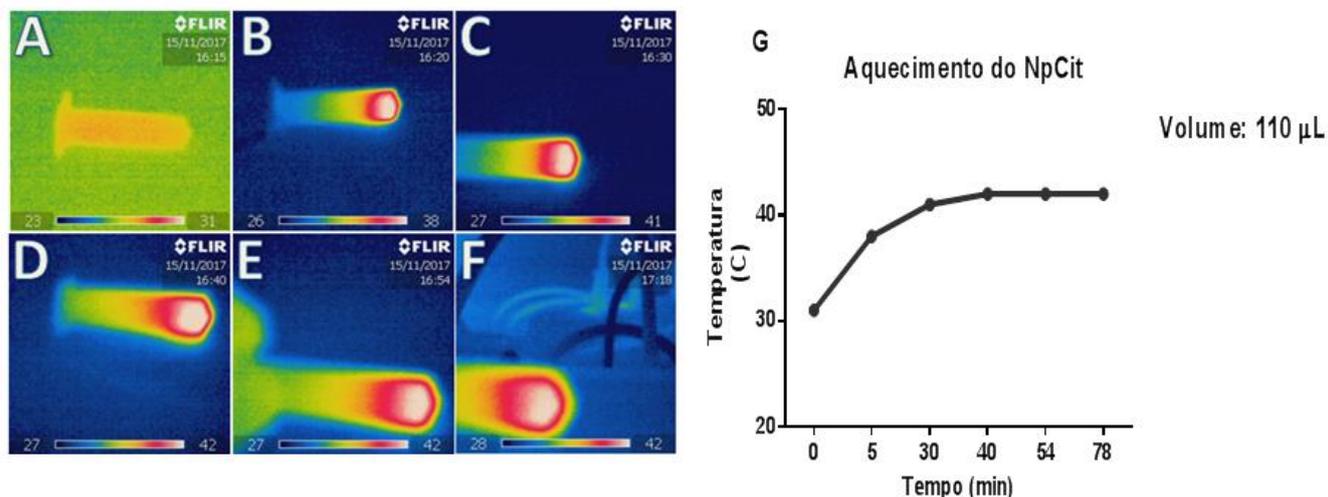


Figura 14. Termofotografias de NpCit: (A) = tempo inicial 31°C. (B-F) = temperaturas verificadas imediatamente após a exposição ao campo magnético alternado. (G) Curva de aquecimento da amostra de nanopartículas magnéticas recobertas com citrato (NpCit) em função do tempo com o volume de 110 μL . As barras precedidas e sucedidas por números indicam a temperatura mínima e máxima.

5.6 Caracterizações de nanocápsulas de PLGA contendo Selol

Por meio da análise por microscopia eletrônica de varredura (MEV), a nanocápsula de PLGA com Selol apresentou forma esférica e diâmetro hidrodinâmico médio de 161,1 nm (\pm 2,44 nm) (Figura15), outros parâmetros também foram avaliados como potencial zeta e índice de polidispersão (resumidos na Tabela 06).

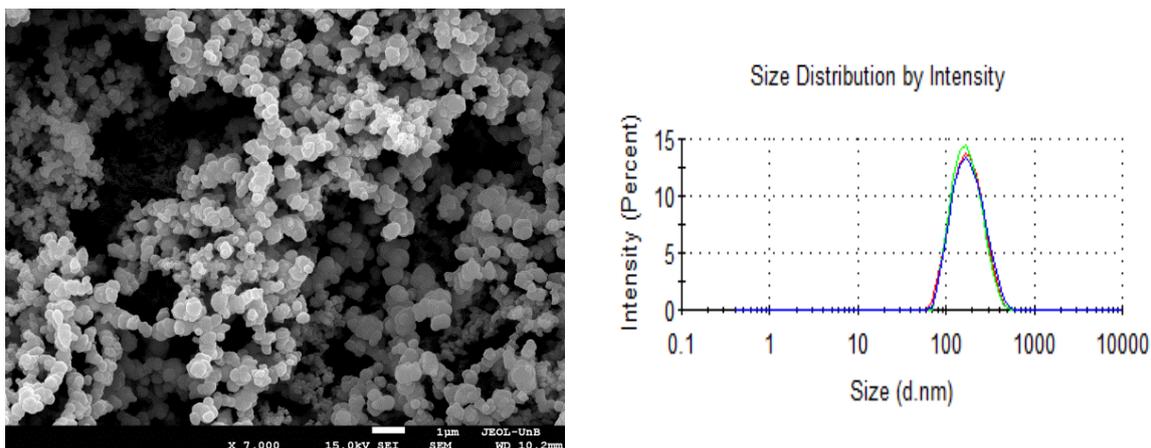


Figura 15. Caracterização da amostra de nanocápsulas de PLGA contendo Selol (NcSel). (A) Fotomicrografia eletrônica de varredura representativa do NcSel (barra de escala: 1µm); (B) histograma de distribuição de tamanho por intensidade.

Tabela 06. Caracterização de nanocápsulas de PLGA com Selol por DLS

Parâmetros	Características
TMH (nm)	161.1 \pm 2.03
PZ (mV)	-29.21 \pm 0.197
IPD	0.135 \pm 0.010

TMH= tamanho médio hidrodinâmico; IPD = índice de polidispersão; ZP = potencial Zeta (carga superficial).

5.7 Medidas tumorais, investigação histológica e análise imuno-histoquímica

Apesar da redução não significativa do volume tumoral, observada após duas semanas de tratamento para todos os grupos (NP, NC, MHT, MHTNC, NPNC e PTX), comparados ao grupo controle com tumor sem tratamento (CT), o grupo de animais com tumor, tratados com MHT + NcSel (MHTNC) apresentou o menor volume tumoral médio, cerca de 19% menor que o CT e 45% menor que o grupo tratado com paclitaxel (PTX) (Figura 16A).

No entanto, quando avaliados em longo prazo, 30 dias após a última sessão de tratamento, este grupo (SMHTNC) apresentou um volume tumoral significativamente menor,

aproximadamente cinco vezes, comparado ao grupo controle tumoral (SCT) e mais de oito vezes menor em comparação ao grupo tratado com paclitaxel (SPTX) (Figura 16 B).

O peso dos tumores também foi medido como mostrado na Figura 17. O grupo SMHTNC apresentou o peso tumoral aproximadamente 3,5 vezes mais leve que o grupo SCT e cinco vezes mais leve que o grupo SPTX. Além disso, 50% dos animais do grupo SMHTNC apresentaram processo de cicatrização, conforme representado na Figura 18. Adicionalmente, apesar de não haver diferenças significativas nas taxas de sobrevivência, o grupo SMHTNC apresentou o maior tempo médio de sobrevivência comparado aos demais grupos, 45 dias após o implante do tumor (Figura 19).

Para os grupos eutanasiados uma semana após os diversos tratamentos, os exames histopatológicos mostraram células tumorais circundando áreas de necrose, metástases do linfonodo sentinela e linfonodo lateral em todos os grupos (controle e tratados) como uma característica padrão, entretanto, o grupo controle (CT) apresentou menor área de necrose em relação aos grupos tratados NP, NC, MHT, MHTNC, NPNC e PTX. Além disso, os grupos tratados com NpCit associada ou não às nanocápsulas de Selol (NP, MHT, MHTNC, NPNC) apresentaram hemorragia intratumoral, uma resposta ao tratamento não observada nos demais grupos (CT, NP e PTX).

Os mesmos exames realizados para os grupos de sobrevivência (Figura 20) (SCT, SMHTNC e SPTX), revelaram que o grupo tratado com MHT + NcSel (SMHTNC) apresentou menor área de necrose em comparação aos demais grupos (SCT, SPTX) e média de 20% de fibroplasia (processo de cicatrização) no leito tumoral e, principalmente, ausência de metástases para os gânglios linfáticos e órgãos, ao contrário do observado nos grupos comparativos (SCT e SPTX), que revelaram, em todos os seus animais, presença de metástases nos linfonodos sentinela, lateral, nos pulmões. A análise de imunohistoquímica com Ki-67 revelou que não houve diferenças significativas entre todos os grupos (tratados e controles), cuja expressão >50% evidenciou a natureza altamente agressiva do tumor sólido de Ehrlich.

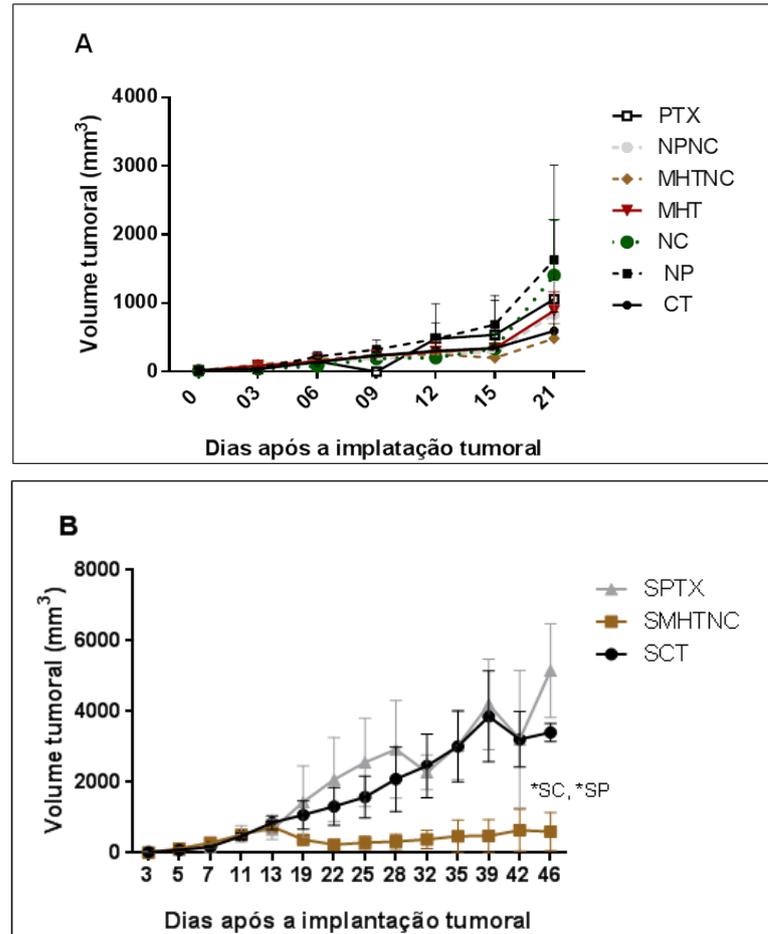


Figura 16. Evolução do volume tumoral em camundongos fêmeas idosas submetidos a diferentes tratamentos. (A) CT - animais com tumor (grupo controle tumor), tratados com PBS. NP animais com tumor, tratados com NpCit; NC animais com tumor, tratados com NcSel; MHT animais com tumor, tratados com magnetohipertermia (MHT); MHTNC animais com tumor tratados com MHT + NcSel; NPNC animais com tumor, tratados com NpCit + NcSel; PTX animais com tumor, tratados com Paclitaxel. (B) SCT, SMHTNC e SPTX, grupos avaliados quanto à sobrevivência, 30 dias após o tratamento, correspondendo aos grupos CT, MHTNC e PTX, respectivamente. Os dados são expressos como média \pm erro padrão da média. $n = 7$ camundongos por grupo. SP = SPTX e SC = SCT (*) = $p < 0.05$.

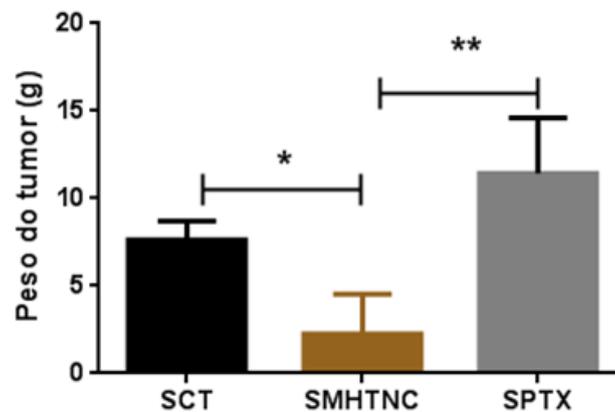


Figura 17. Pesos tumorais obtidos 30 dias após diferentes tratamentos. SCT, SMHTNC e SPTX = grupos avaliados quanto à sobrevivência, 30 dias após o tratamento, correspondendo aos grupos CT (grupo controle tumor), MHTNC (animais com tumor tratados com MHT + NcSel) e PTX (tratados com paclitaxel), respectivamente. Os valores são expressos em média \pm desvio padrão, (*) = $p < 0.05$ e (**) = $p < 0.01$.

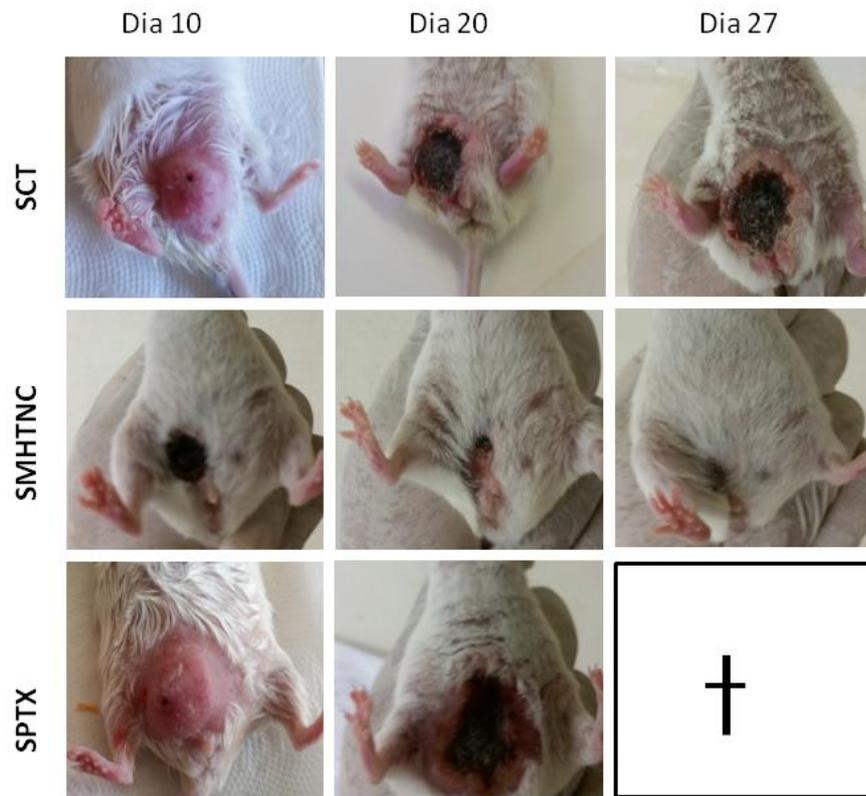


Figura 18. Tumores de mama em camundongos fêmeas idosas submetidos a diferentes tratamentos. Aas fotos mostram o crescimento tumoral ao longo de diferentes períodos de tempo (10, 20 e 27 dias) após a implantação do tumor. Grupo controle (SCT), sem tratamento, hipertermia mediada por NpCit associada ao NcSel (SMHTNC) e grupo tratado com paclitaxel (SPTX). O animal do grupo SPTX morreu no dia 26.

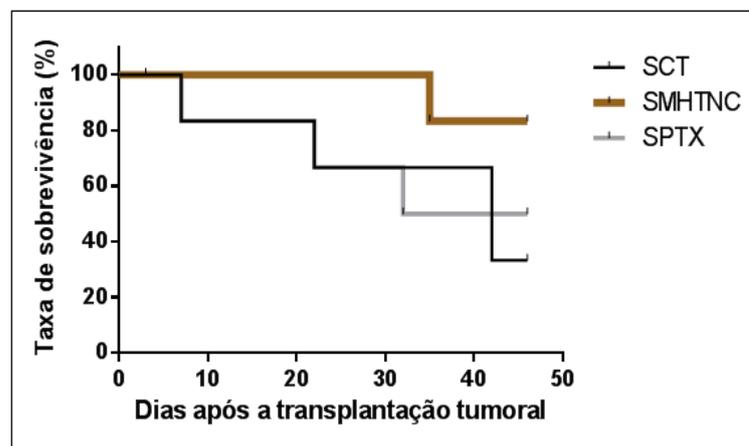


Figura 19. Curvas da taxa de sobrevivência de camundongos fêmeas idosas com tumor de mama submetido a diferentes tratamentos. (SCT) grupo controle; (SMHTNC) hipertermia mediada por NpCit associada ao NcSel; (SPTX) grupo tratado com paclitaxel.

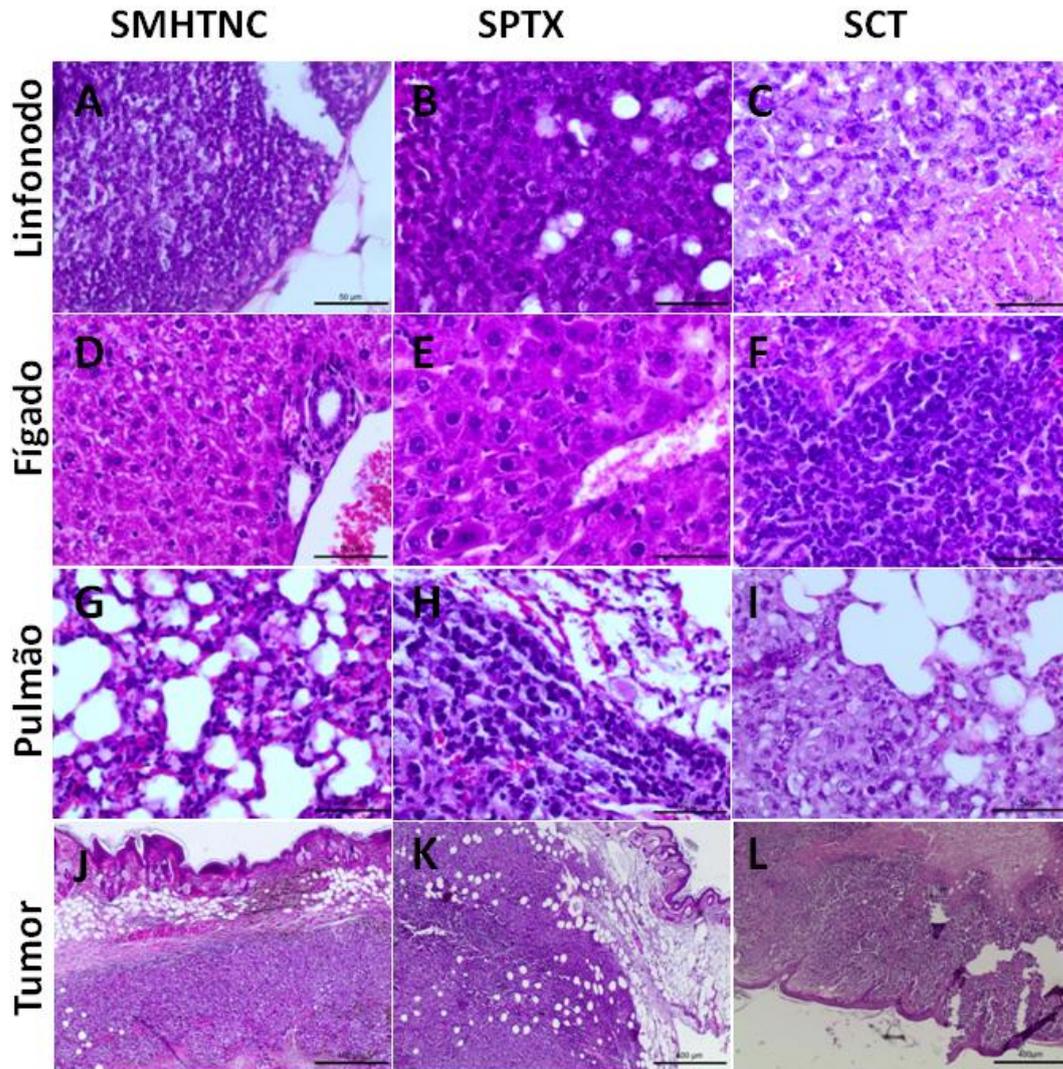


Figura 20. Histopatologia de animais portadores de tumor de Ehrlich induzido na mama, tratados com diferentes terapias e avaliados 30 dias após os tratamentos. **SMHTNC**- Grupo tratado com MHT associada ao NcSel. **SPTX**- Grupo tratado com paclitaxel. **SCT** - Grupo controle com tumor sem tratamento. **SMHTNC:** (A, D, G) Linfonodo sentinela, fígado e pulmão sem alterações marcantes; (J) Tumor, adenocarcinoma mamário medindo 05 mm, com necrose multifocal, em 20% do volume tumoral e fibroplasia estromal presente em 30% do leito do tumor. **SPTX:** (B) Linfonodo sentinela com metástase medindo 11,0 mm; (E) Fígado com parênquima hepático sem alterações marcantes e (H) pulmão com presença de vários focos metastáticos; (K) Tumor, adenocarcinoma mamário, medindo 26,0 mm de diâmetro, com 60% de necrose tumoral. **SCT:** (C) Linfonodo sentinela com presença de metástase medindo 10,0 mm; (F, I) Fígado e pulmão com presença de vários focos metastáticos; (L) Tumor, adenocarcinoma mamário, medindo 21,0 mm. No tumor, as barras indicam 400 μ m. Em linfonodo, fígado e pulmão, as barras indicam 50 μ m.

5.8 Aspectos clínicos e medidas do peso corporal

Não houve diferenças significativas no peso corporal dos animais entre todos os grupos analisados (grupos avaliados uma semana ou um mês após os tratamentos, como mostrado na Figura 21A e B). No entanto, o grupo MHT + NcSel (SMHTNC) apresentou

melhores aspectos clínicos, como a textura do pêlo sem qualquer nível de alopecia, diarreia ou distúrbios motores em comparação com os demais grupos (SCT e SPTX).

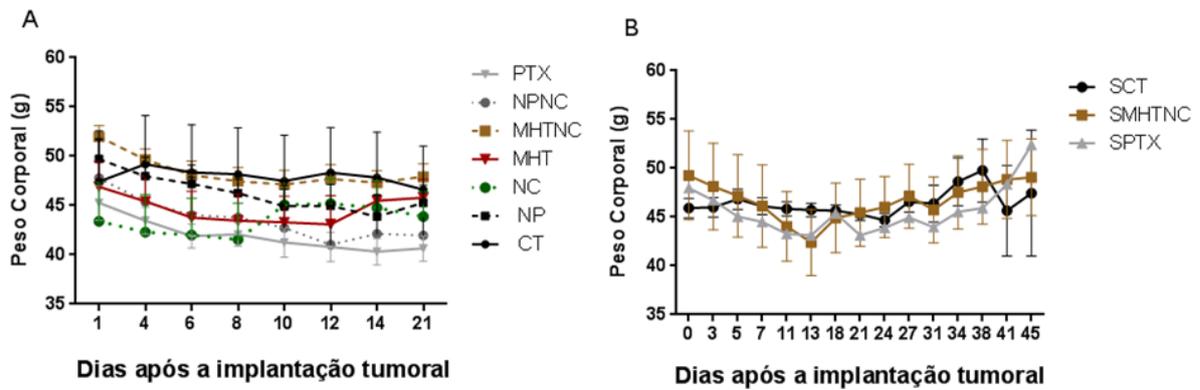


Figura 21. Alteração do peso em camundongos fêmeas idosas submetidos a diferentes tratamentos (A) CT - animais com tumor (grupo controle tumor), tratados com PBS. NP animais com tumor, tratados com NpCit; NC animais com tumor, tratados com NcSel; MHT animais com tumor, tratados com magnetohipertermia (MHT); MHTNC animais com tumor tratados com MHT + NcSel; NPNC animais com tumor, tratados com NpCit + NcSel; PTX animais com tumor, tratados com Paclitaxel. (B) SCT, SMHTNC e SPTX, grupos avaliados quanto à sobrevida, 30 dias após o tratamento, correspondendo aos grupos CT, MHTNC e PTX, respectivamente. Os dados são expressos como média \pm erro padrão da média. n= 6 camundongos por grupo. SP = SPTX e SC = SCT (*) = $p < 0.05$ e (**) = $p < 0.01$.

5.9 Análises Bioquímicas

As análises bioquímicas (Tabela 07) mostraram que os níveis de ALT e AST aumentaram com o tumor e após os tratamentos. Os grupos PTX e MHT apresentaram alterações significativas nos níveis de ALT, enquanto os grupos NP, NC e PTX apresentaram aumento significativo nos níveis de AST em comparação com o grupo controle sem tumor (CS). Por outro lado, os níveis de creatinina e ureia diminuíram com a presença do tumor e após os tratamentos (grupos NP e NPNC) em comparação com o grupo controle CS. Além disso, entre os grupos da sobrevida (SCT, SMHTNC e SPTX), o mesmo padrão foi observado, sendo que no grupo tratado com Paclitaxel (SPTX) o aumento nos níveis de ureia foi significativo tanto em relação ao controle sem tumor (CS), quanto em relação ao tratado com MHT + NcSel (SMHTNC).

Tabela 07. Análise bioquímica em camundongos fêmeas idosas portadoras de tumor com diferentes tratamentos durante duas semanas e eutanasiadas 07 ou 30 dias depois

	ALT (U/L)	AST (U/L)	Creatinina (mg/dL)	Ureia (mg/dL)
01 Semana				
CS	38.86±8.59	122.40±89.47	0.19±0.06	52.20±4.87
CT	45.17±9.64	311.43±125.95	0.39±0.34	31.43±4.28
NP	59.00±41.93	336.17±91.31* ^{CS}	0.24±0.05	29.17±7.41* ^{CS}
NC	103.33±93.57	454.17±180.98** ^{CS}	0.23±0.05	39.83±8.93
MHT	134.00±38.57** ^{CS}	293.67±103.06	0.97±1.00	31.00±7.35
MHTNC	56.83±18.76	231.17±28.17	0.34±0.20	36.83±8.84
NPNC	62.29±37.22	284.43±77.19	0.25±0.10	28.00±7.42** ^{CS}
PTX	105.43±44.94** ^{CS}	353.71±98.08* ^{CS}	0.64±0.54	41.33±10.86
P-valor	0.0013	0.0011	0.0355	0.0042
Sobrevida				
SCT	49.33±8.33	362.00±203.69	0.32±0.09	59.00±13.00
SMHTNC	46.33±18.58	166.33±1.53	0.33±0.08	37.67±6.81* ^{SP}
SPTX	79.00±26.96	287.67±101.96	0.36±0.02	64.33±7.51
P-valor	0.1562	0.3607	0.7137	0.0306

ALT: alanina aminotransferase; AST: aspartato aminotransferase. CS animais sem tumor, (A) CT-animais com tumor (grupo controle tumor), tratados com PBS. NP animais com tumor, tratados com NpCit; NC animais com tumor, tratados com NcSel; MHT animais com tumor, tratados com magnetohipertermia (MHT); MHTNC animais com tumor tratados com MHT + NcSel; NPNC animais com tumor, tratados com NpCit + NcSel; PTX animais com tumor, tratados com Paclitaxel. (B) SCT, SMHTNC e SPTX, grupos avaliados quanto à sobrevida, 30 dias após o tratamento, correspondendo aos grupos CT, MHTNC e PTX, respectivamente. Os dados são expressos como média ± desvio padrão. CS = CS, CT = CT, SP = SPTX, SC = SCT e (*) = p <.05 e (**) = p <.01.

5.10 Análises hematológicas

O eritrograma (Tabela 08) revelou que os tratamentos causaram algumas alterações significativas observadas no grupo tratado com NpCit e NcSel (NPNC), em comparação com CS e CT, por um lado, decréscimos em relação ao eritrócito total (RBC), hemoglobina (HGB), hematócrito (HCT) e, por outro, aumento na largura de distribuição de células vermelhas (RDW). Além disso, a hemoglobina corpuscular média (HCM) e a concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) foram significativamente menores no grupo tratado com MHT + NcSel (MHTNC) em comparação com CT e CS, respectivamente. As mesmas análises realizadas entre os grupos da sobrevida (SCT, SMHTNC e SPTX) apenas revelaram aumento significativo de RDW no grupo tratado com paclitaxel (SPTX) em comparação com SMHTNC e CS.

Tabela 08. Eritrograma de camundongos fêmeas idosas portadoras de tumor com diferentes tratamentos durante duas semanas e eutanasiadas 07 ou 30 dias depois

	RBC ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	HGB (g/dL)	HCT (%)	MCV (fL)	MCH (pg)	MCHC (g/dL)	RDW-CV (%)
01 semana							
CS	7.89 \pm 0.99	11.26 \pm 1.34	28.84 \pm 3.80	36.54 \pm 0.90	14.17 \pm 0.49	38.81 \pm 0.56	13.47 \pm 1.13
CT	7.37 \pm 0.65	11.03 \pm 0.99	28.96 \pm 2.43	39.27 \pm 1.34	14.96 \pm 0.72	38.07 \pm 0.69	18.81 \pm 5.94
NP	6.50 \pm 1.43	9.32 \pm 1.76	25.07 \pm 4.59	38.98 \pm 3.65	14.50 \pm 1.53	37.13 \pm 0.97	19.87 \pm 4.23
NC	7.59 \pm 0.58	10.55 \pm 0.74	28.00 \pm 1.62	36.98 \pm 0.98	13.93 \pm 0.51	37.60 \pm 0.72	15.77\pm1.10 ^{CS}
MHT	7.16 \pm 0.96	10.25 \pm 1.15	27.52 \pm 2.59	38.58 \pm 2.32	14.33 \pm 0.45	37.20 \pm 1.32	17.28 \pm 1.98
MHTNC	6.96 \pm 1.15	9.34 \pm 1.54	25.40 \pm 3.96	36.53 \pm 0.91	3.40\pm0.37 ^{CT}	36.73\pm1.01 ^{**CS}	17.07 \pm 2.81
NPNC	6.32\pm0.7 ^{CS}	8.86\pm0.81 ^{**CS}	23.77\pm2.05 ^{CT}	37.83 \pm 2.32	14.09 \pm 0.93	37.27 \pm 1.14	16.86\pm4.40 ^{CS}
PTX	6.86 \pm 0.59	10.04 \pm 0.85	26.84 \pm 2.25	39.20 \pm 1.58	14.66 \pm 0.50	37.44 \pm 1.10	18.84\pm2.56 ^{**CS}
P-valor	0.0474	0.0042	0.0255	0.0092	0.0320	0.0116	0.0038
Sobrevida							
SCT	5.37 \pm 2.08	7.47 \pm 2.78	21.27 \pm 6.48	41.07 \pm 4.85	14.00 \pm 0.31	34.37 \pm 3.13	21.03 \pm 2.73
SMHTNC	6.21 \pm 1.30	8.80 \pm 1.76	23.60 \pm 5.06	37.98 \pm 2.19	14.18 \pm 0.65	37.40 \pm 1.20	15.40\pm2.59 ^{SP}
SPTX	7.82 \pm 0.66	10.40 \pm 0.87	27.50 \pm 2.04	34.90 \pm 0.53	13.57 \pm 0.74	37.07 \pm 1.08	23.70 \pm 3.70
P-valor	0.1819	0.2579	0.3682	0.0649	0.4309	0.1805	0.0264

RBC - glóbulos vermelhos; HGB - hemoglobina; HCT - Hematócrito; MCV - Volume Corpuscular Médio; MCH - Hemoglobina Corpuscular Média; MCHC - Concentração Média de Hemoglobina Corpuscular; RDW - Largura de Distribuição de Células Vermelhas. CS- animais sem tumor, (A) CT - animais com tumor (grupo controle tumor), tratados com PBS. NP animais com tumor, tratados com NpCit; NC animais com tumor, tratados com NcSel; MHT animais com tumor, tratados com magnetohipertermia (MHT); MHTNC animais com tumor tratados com MHT + NcSel; NPNC animais com tumor, tratados com NpCit + NcSel; PTX animais com tumor, tratados com Paclitaxel. (B) SCT, SMHTNC e SPTX, grupos avaliados quanto à sobrevida, 30 dias após o tratamento, correspondendo aos grupos CT, MHTNC e PTX, respectivamente. Os dados são expressos como média \pm desvio padrão. CS = CS, CT = CT, SP = SPTX, SC = SCT e (*) = $p <<. 05$ e (**) = $p <. 01$.

No leucograma (Tabela 09), os resultados mostraram que os tratamentos causaram aumento no número de leucócitos totais (WBC) significativamente nos grupos NP, NPNC e PTX, comparados com o grupo sem tumor (CS). Da mesma forma, aumento significativo na taxa de células médias (neutrófilo, basófilos e eosinófilos) também foi observado nos grupos NP, MHT e NPNC, quando comparado com CS. Por outro lado, o tumor e os tratamentos (CT, NP, NC, MHT, MHTNC e PTX) causaram diminuição significativa da contagem absoluta de linfócitos, comparados com o controle CS. Entre os grupos da sobrevida, nenhuma diferença foi observada para todos os parâmetros analisados. Não foram observadas diferenças significativas nos níveis de plaquetas em todos os grupos (controles e experimentais). O hemograma evidenciou que os grupos tratados com MHT + NcSel (MHTNC e SMHTNC) apresentaram exames mais próximos dos valores de referência (comparação com o grupo CS) do que os demais grupos.

Tabela 09. Leucograma e contagem de plaquetas em camundongos fêmeas idosas portadoras de tumor com diferentes tratamentos durante duas semanas e eutanasiadas 07 ou 30 dias depois

	WBC ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	W-SCR (%)	W-MCR (%)	W-LCR (fL)	PLT ($\times 10^3/\mu\text{L}$)
01 Semana					
CS	2.00 \pm 0.72	64.13 \pm 6.67	32.80 \pm 5.67	3.07 \pm 2.90	1106.40 \pm 131.56
CT	4.69 \pm 1.40	43.24\pm9.31**^{CS}	54.69 \pm 10.62	2.07 \pm 2.09	1897.86 \pm 1447.02
NP	17.72\pm15.66**^{CS}	20.70\pm9.31**^{CT,**^{CS}}	77.88\pm8.83**^{CS}	1.42 \pm 1.34	934.67 \pm 363.89
NC	4.42 \pm 1.73	32.98\pm9.7**^{CS}	65.73 \pm 10.62	1.28 \pm 1.16	1159.33 \pm 223.73
MHT	6.25 \pm 1.74	29.02\pm9.45**^{CS}	70.20\pm9.41**^{CS}	0.78 \pm 0.55	1230.67 \pm 343.08
MHTNC	4.57 \pm 2.50	38.88\pm6.92**^{CS}	59.13 \pm 7.03	1.98 \pm 1.91	1021.83 \pm 207.17
NPNC	9.46\pm5.99**^{CS}	26.40\pm15.02**^{CT,**^{CS}}	71.43\pm16.54**^{CS}	2.17 \pm 1.99	1081.14 \pm 420.92
PTX	7.30\pm2.82**^{CS}	34.63\pm7.24**^{CS}	63.64 \pm 7.21	1.73 \pm 1.18	1415.83 \pm 428.01
P-valor	0.0002	< 0.0001	< 0.0001	0.7076	0.1917
Sobrevida					
SCT	11.70 \pm 8.01	15.27 \pm 5.75	78.43 \pm 3.77	6.30 \pm 7.37	1004.63 \pm 40.23
SMHTNC	7.36 \pm 8.56	40.68 \pm 24.34	55.22 \pm 24.42	4.10 \pm 2.63	855.25 \pm 700.95
SPTX	16.00 \pm 6.38	17.13 \pm 9.87	81.93 \pm 9.28	1.27 \pm 0.81	1146.50 \pm 1019.45
P-value	0.3693	0.1394	0.1442	0.1842	0.3252

WBC - glóbulos brancos totais; W-SCR – Taxa de células pequenas (linfócitos); W-MCR – Taxa de células médias (neutrófilos, basófilos e eosinófilos); W-LCR - Taxa de células grandes (monócitos); PLT - Contagem de Plaquetas; g / Dl - gramas por decilitro; fL - femtolitros; pg - picogramas. CS- animais sem tumor, (A) CT - animais com tumor (grupo controle tumor), tratados com PBS. NP animais com tumor, tratados com NpCit; NC animais com tumor, tratados com NcSel; MHT- animais com tumor, tratados com magnetohipertermia (MHT); MHTNC animais com tumor tratados com MHT + NcSel; NPNC animais com tumor, tratados com NpCit + NcSel; PTX animais com tumor, tratados com Paclitaxel. (B) SCT, SMHTNC e SPTX, grupos avaliados quanto à sobrevivida, 30 dias após o tratamento, correspondendo aos grupos CT, MHTNC e PTX, respectivamente. Os dados são expressos como média \pm desvio padrão. CS = CS, CT = CT, SP = SPTX, SC = SCT e (*) = $p < .05$ e (**) = $p < .01$.

5. 11 Níveis de TNF- α por ELISA

A presença do tumor aumentou significativamente os níveis da citocina pró-inflamatória, fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), como revelado quando o grupo tumor sem tratamento (CT) foi comparado com o grupo controle sem tumor (CS) (Figura 22). No entanto, todos os tratamentos diminuíram os níveis de TNF- α e não foram observadas alterações significativas em comparação ao grupo CS, após os diferentes tratamentos.

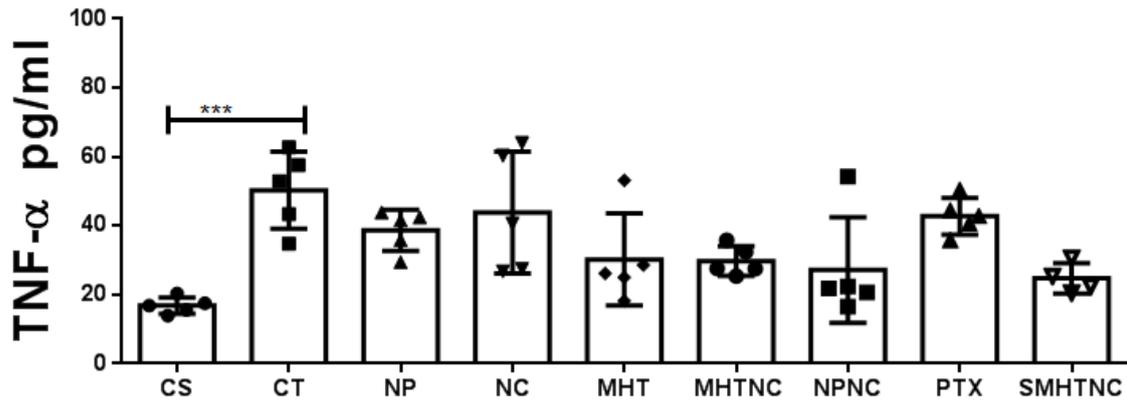


Figura 22. Níveis de TNF- α em camundongos fêmeas idosas com tumor submetidos a diferentes tratamentos. CS- animais sem tumor. CS animais sem tumor, (A) CT - animais com tumor (grupo controle tumor), tratados com PBS. NP animais com tumor, tratados com NpCit; NC-animais com tumor, tratados com NcSel; MHT-animais com tumor, tratados com magnetohipertermia (MHT); MHTNC animais com tumor tratados com MHT + NcSel; NPNC animais com tumor, tratados com NpCit + NcSel; PTX animais com tumor, tratados com Paclitaxel. Os dados são expressos como média \pm desvio padrão e (*) = $p < .05$ e (***) = $p < .001$.

5.12 Fragmentações de DNA

Os grupos tratados com NpCit (NP, MHT, MHTNC, NPNC) apresentaram diminuição da fragmentação do DNA (Figura 23), significativamente menor para o grupo NP ($1,67 \pm 0,43\%$) em relação aos grupos CT ($5,807 \pm 2,90\%$), CS ($7,497 \pm 4,54\%$), NP ($8,71 \pm 4,037\%$) e PTX ($6,08 \pm 2,62\%$).

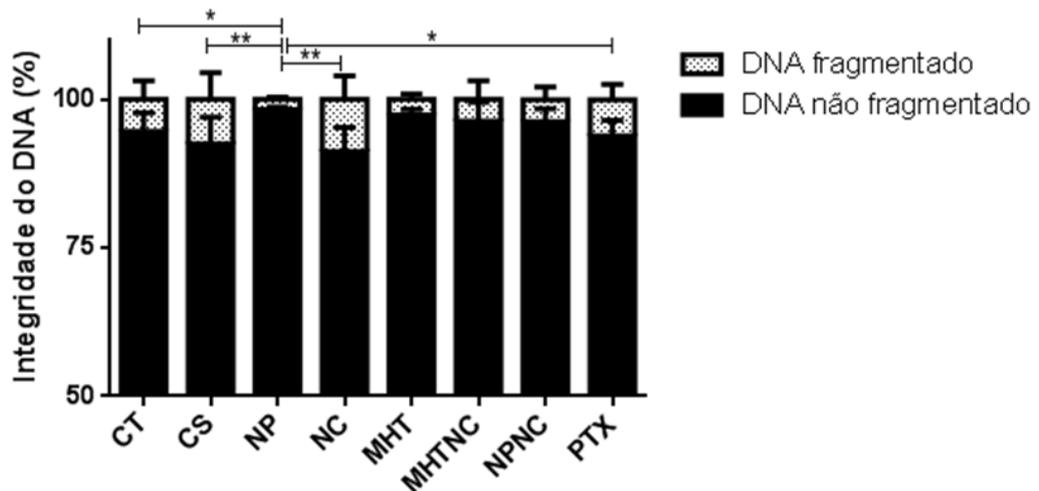


Figura 23. Avaliação da fragmentação do DNA das células da medula óssea do fêmur de camundongos fêmeas idosas com tumor submetidos a diferentes tratamentos. CS animais sem tumor, (A) CT - animais com tumor (grupo controle tumor), tratados com PBS. NP animais com tumor, tratados com NpCit; NC animais com tumor, tratados com NcSel; MHT animais com tumor, tratados com magnetohipertermia (MHT); MHTNC animais com tumor tratados com MHT + NcSel; NPNC animais com tumor, tratados com NpCit + NcSel; PTX animais com tumor, tratados com Paclitaxel. Os dados são expressos como média \pm desvio padrão e (*) = $p < .05$ e (**) = $p < .0002$.

6. DISCUSSÃO

O ferro é um elemento importante para muitos processos biológicos (SIDDIQI et al., 2016), tendo sido verificado que em quantidade elevada pode danificar estruturas lipídicas, proteínas e DNA, causando graves danos ao tecido, ou mutações (GROTTO, 2010). Por essa razão, Rodrigues et al. (2017) enfatizam que NPMs à base de óxido de ferro poderiam representar risco para os pacientes, devendo seu uso ser precedido por testes de biocompatibilidade e biodistribuição, especialmente para pacientes idosos (SHARMA et al., 2013).

A primeira etapa deste estudo foi realizada para comparar os efeitos da nanopartículas magnéticas revestidas com citrato (NpCit) em idosos (14-16 meses) e jovens (3-4 meses) saudáveis, em relação aos aspectos de biocompatibilidade e biodistribuição. É bem conhecido que a biocompatibilidade e a biodistribuição, bem como a eficácia em aplicações biomédicas, dependem das interações de NPMs com biomoléculas e membranas celulares. Por sua vez, essas interações dependem das características físico-químicas das NPMs, com especial relevância para composição química, tamanho da partícula, carga e cobertura da amostra, conforme revisto por FENG et al. (2018) e SHARMA et al. (2013), além da própria metodologia de síntese das NPMs.

A caracterização físico-química dos dois lotes da NpCit mostrou que pode ser descrita como uma amostra estável com potencial biocompatibilidade e capacidade de realizar MHT (BRUGIN, 2007; NEVES et al, 2017). Esta conclusão foi fundamentada nas considerações dispostas a seguir:

a) a amostra NpCit foi sintetizada por co-precipitação de Fe (II) e Fe (III), técnica amplamente utilizada devido ao rendimento, propriedades magnéticas e biocompatibilidade (SARASWATHY et al., 2014);

b) NpCit contém nanopartículas de maghemita e é bem conhecido que as NPMs baseadas em óxido de ferro (magnetita e maghemita), amplamente testadas em aplicações *in vivo*, têm mais vantagens que outras nanopartículas (NPs) metálicas, em relação à biocompatibilidade, estabilidade e capacidade de gerar calor quando submetidas a um campo magnético alternado (NEVES et al., 2017; HU et al., 2018);

c) NpCit apresentou diâmetro descrito como ideal para a biocompatibilidade e eficácia em procedimentos envolvendo MHT (BERRY; CURTIS, 2003; MIRANDA-VILELA et al., 2011). Este diâmetro (10,8 nm) é suficientemente pequeno para opsonização e liberação mais

lenta do sistema reticulo endotelial (RES) (SINGH et al., 2006) e para atravessar membranas biológicas, atingindo o alvo, ao mesmo tempo em que é grande o suficiente para responder a um campo magnético alternado e não sofrer rapidamente depuração renal (KUMAR et al., 2011);

d) NpCit apresentou baixo índice de polidispersão (PDI), resultado interessante, uma vez que se considera que NPs monodispersas são mais capazes de apresentar o mesmo desempenho repetidas vezes (FENG et al, 2018). Além disso, a NpCit apresentou diâmetro hidrodinâmico de 78,4 nm, e essa característica, para alguns pesquisadores (FENG et al, 2018), pode fazer com que a captação pelos macrófagos do fígado e baço não seja tão rápida quanto a de NPs maiores que 100 nm;

e) Diferentemente dos fluidos magnéticos iônicos (FM) (LACAVA et al, 1999; ESTEVANATO et al, 2011), as NPs sem coberturas apresentam instabilidade coloidal em pH 7, demandando o uso de revestimentos (FENG et al, 2018). A natureza química da cobertura pode ser diferente dependendo da aplicação biomédica desejada (LACAVA et al., 2004). O revestimento de nanopartículas de maghemita com citrato (NpCit) promoveu a característica desejável de estabilidade (ESTEVANATO et al, 2012). De forma similar, vários outros revestimentos obtiveram sucesso, como a dextrana (LACAVA et al., 2002; MIRANDA-VILELA et al., 2013), o DMSA (CHAVES et al., 2002, RUIZ et al., 2014), polifosfato (CANDIDO et al., 2014), entre outros. A importância da natureza do revestimento é destacada quando as NPs com o mesmo núcleo foram revestidas com diferentes moléculas e os resultados variaram desde aparente ausência de toxicidade até toxicidade letal dependente da dose (FENG et al, 2018). No entanto, Kumari et al. (2012) observaram que ratos Wistar expostos a nanopartículas de maghemita sem cobertura apresentaram patologias no fígado, rim e baço. Da mesma forma, nanopartículas de magnetita injetadas pela veia caudal foram acumuladas e causaram lesões patológicas no baço após 13 semanas pós-injeção (PARK et al, 2015). Os dados mostram que o uso de citrato como revestimento para nanopartículas de maghemita puderam prevenir possíveis danos nos tecidos que as nanopartículas de maghemita não revestidas causaram. Além da estabilidade da amostra, o revestimento com citrato melhorou a biocompatibilidade, como relatado anteriormente pela ausência de efeitos sobre a viabilidade celular peritoneal de camundongos ou efeito genotóxico para os eritrócitos da medula óssea (BRUGIN; 2007; ESTEVANATO et al., 2011).

f) Outro fator também relacionado ao revestimento é a carga superficial. Partículas carregadas negativamente, como a amostra NpCit, impedem a agregação de nanopartículas (LOMIS et al., 2016), sofrem menor depuração pelos macrófagos e, conseqüentemente, são

menos tóxicos que NPs com carga positiva. NPs carregadas positivamente podem causar ruptura de membranas celulares normalmente carregadas negativamente (XIAO et al, 2011), enquanto partículas carregadas positivamente promovem a ligação a moléculas de opsonina, levando à sua menor meia-vida no sangue (LOMIS et al., 2016). O mesmo lote da amostra NpCit empregado na parte 1 deste trabalho foi caracterizado três anos antes (NEVES et al, 2017) e as características físico-químicas, especialmente os valores do potencial zeta e carga superficial negativa foram mantidas, evidenciando sua estabilidade coloidal (MAMANI et al., 2013; TIETZE et al., 2013), mesmo sob diferentes concentrações e temperaturas (BONADIO et al., 2017).

g) Além da estabilidade e biocompatibilidade potencial, a amostra também deve ser capaz de realizar os procedimentos biomédicos desejáveis. Nesse sentido, a NpCit foi capaz de produzir aquecimento quando exposta a um campo magnético alternado e, assim, realizar magnetohipertérmica (MHT), como descrito previamente (NEVES et al, 2017).

Os resultados dos testes biológicos encontrados no presente trabalho para os grupos controles jovens e idosos foram estabelecidos como valores de referência. Uma das razões é porque valores de referência para camundongos *Swiss* idosos (a partir de 12 meses) não foram encontrados na literatura, mesmo após pesquisa exaustiva. A outra razão é devido ao fato de que variáveis como idade, sexo, diferenças genéticas, dieta e condições ambientais podem influenciar o metabolismo dos animais alterando sua fisiologia, valores bioquímicos e hematológicos (BARBOSA et al., 2017). Estudos em camundongos da linhagem *Swiss* e ratos Wistar apresentaram valores diferentes em diferentes biotérios, e também em relação aos dados da literatura, enfatizando a importância do estabelecimento de valores de referência para cada laboratório (CASTELO BRANCO et al., 2011). Lile, Tample e Florence (1996) relataram ainda que a mesma metodologia realizada com diferentes equipamentos, pH e temperatura de reação pode resultar em valores discrepantes.

Muitos sinais clínicos relacionados ao processo de envelhecimento em camundongos já estão bem estabelecidos, como alopecia, dermatite, tremores, diarreia, peso, secreção ocular e edema (WHITEHEAD et al., 2014). Esses sinais foram pesquisados para comparar os camundongos jovens e idosos, e verificar se a administração da amostra NpCit causaria ou alteraria qualquer um desses parâmetros. Nenhuma alteração clínica significativa foi observada entre animais jovens e velhos, nem entre os grupos administrados com NpCit e seus respectivos controles. O peso médio dos animais mais velhos foi maior (embora não significativo) que o dos camundongos mais jovens, durante todo o tempo experimental, como

esperado para um processo natural de crescimento e envelhecimento (BARSHA; DENTON; MIRABITO COLAFELLA, 2016).

Entretanto, como esperado, os dados dos grupos controles idosos e jovens apresentaram algumas diferenças biológicas que devem ser levadas em consideração nos testes de toxicidade da NpCit nos animais.

A análise bioquímica do sangue representa uma ferramenta importante para investigações das alterações relacionadas ao envelhecimento e da toxicidade de um novo medicamento ou agente terapêutico, como a NpCit, fornecendo dados relacionados com as funções hepáticas e renais. Disfunções no sistema hepatobiliar representam mais de 50% dos eventos de toxicidade ocasionados por agentes químicos (LEE, 2003) e são tradicionalmente avaliadas por medidas dos níveis séricos das transaminases, como Aspartato aminotransferase (AST) e Alanina aminotransferase (ALT) (SUTHERLAND, 1989; QUIMBY; LUONG, 2007). A AST, amplamente distribuída no organismo (DEWAR; ROWELL; SMITH, 1958), não foi alterada pelo envelhecimento dos camundongos ou pelo tratamento com NpCit, sugerindo ausência de danos nas membranas citoplasmáticas e mitocondriais (SUTHERLAND, 1989).

Por outro lado, os animais idosos apresentaram menores níveis da enzima ALT que os camundongos jovens, revelando possível efeito da idade neste parâmetro. A ALT é produzida em altas concentrações no fígado e a alteração dos seus níveis pode indicar possíveis lesões de células hepáticas (BRUCE; TODD; LE DUNE, 1958; DEWAR et al., 1958; ALMERSJO et al., 1968; CHALIFOUX; LAGACÉ, 1969) e assim menor desempenho nas atividades de desintoxicação e síntese de compostos digestivos, incluindo diminuição do número mitocondrial (SHEEDFAR et al., 2013). No entanto, a administração da NpCit teve efeito oposto ao do envelhecimento, pois induziu aumento nos níveis da enzima ALT se tornando iguais aos animais jovens.

Os níveis séricos de creatinina e ureia foram utilizados para avaliar a função renal (QUIMBY; LUONG, 2007). Segundo Júnior, Cury e Gimenes (2012) há diminuição da filtração glomerular durante o envelhecimento devido à redução do fluxo sanguíneo nos rins, levando a aumento da creatinina e da ureia séricas (THRALL, 2007; WEINSTEIN; ANDERSON, 2010). Estes valores são atualmente usados também como medida da função renal em relação à depuração de substâncias exógenas, como NpCit (MOTTA, 2003). Por outro lado, a diminuição da ureia sérica pode estar relacionada à insuficiência hepática, já que este órgão é responsável pela produção de ureia durante o catabolismo protéico (THRALL, 2007). Os resultados mostraram que não houve diferenças significativas nos níveis de creatinina e ureia entre os grupos de idosos e jovens e, portanto, não evidenciou nenhum

efeito da idade sobre a função renal, um achado importante em relação ao estado de saúde dos animais não portadores de tumor empregados neste estudo. A NpCit não teve efeito nos níveis de creatinina, mas levou a uma redução temporária dos níveis de ureia em animais idosos e jovens, tendo o efeito nos animais idosos surgido mais rapidamente (IN1) do que o observado nos grupos jovens (JN7).

Os efeitos da idade ou a toxicidade da NpCit foram investigados também por meio dos níveis de albumina e LDH. A albumina, proteína sérica abundante produzida no fígado, é responsável por regular o volume sanguíneo, mantendo a pressão oncótica (FARRUGIA, 2010). Neste estudo, o nível de albumina apresentou-se menor em idosos do que em animais jovens, um possível sinal de doença renal ou hepática compatível com o processo de envelhecimento. No entanto, outros parâmetros relacionados à função dos rins estavam normais, sugerindo que este órgão estava funcionando adequadamente.

A LDH é uma enzima amplamente distribuída no organismo, incluindo sangue, músculos, cérebro, rins e pâncreas. Não foram observadas diferenças significativas nos níveis de LDH entre os grupos de idosos e jovens, nem após o tratamento com NpCit, indicando que não houve danos nos tecidos do corpo nem produção excessiva de radical livre relacionada com o envelhecimento ou tratamento com NpCit.

O hemograma é outra ferramenta relevante para identificação de toxicidade e de processos patológicos, como infecção, inflamação, alergia, anemia (MIRANDA-VILELA et al, 2013), incluindo alterações relacionadas ao envelhecimento ou devidas à exposição a novos materiais, como NpCit. Os resultados mostraram menor contagem de linfócitos e maior contagem de células mieloides nos idosos em comparação com os jovens, em conformidade com dados da literatura (JUNIOR; CURY; GIMENES, 2012; LI et al. (2018).

Linfócitos compreendem uma população celular heterogênea que é crucial para a resposta imune (THRALL et al, 2007) e a diminuição da imunidade dependente de linfócitos pode aumentar o estresse oxidativo (AMES; SHIGENAGA; HAGEN, 1993), além de fomentar as doenças relacionadas ao envelhecimento, como câncer, neuropatias, entre outros (MIRANDA-VILELA et al, 2013; 2014). Notavelmente, essas diferenças relacionadas à idade, aumento da contagem da taxa de células mieloides e diminuição da taxa de linfócitos, foram ainda mais pronunciadas após exposição dos camundongos fêmeas idosas à NpCit. Ao mesmo tempo, a NpCit não afetou as populações de leucócitos em grupos jovens, evidenciando um aspecto importante a ser levado em conta nas aplicações de nanopartículas nos pacientes idosos.

Por outro lado, células mielóides podem ajudar na fagocitose das NPs e seu aumento, observado nos animais idosos, poderia explicar porque o aumento de ferro no sangue só foi observado até o primeiro dia após a injeção de NpCit.

A análise do eritrograma mostrou várias diferenças relacionadas ao processo de envelhecimento. Entretanto, a amostra NpCit não introduziu novas alterações nos parâmetros do eritrograma nos grupos dos idosos, embora tenha induzido aumento significativo, mas temporário de eritrócitos nos animais jovens, sem aumento concomitante do ferro sérico (ZAGO; FALCÃO; PASQUINI, 2004).

As citocinas pró-inflamatórias TNF- α e NO foram moduladas após a injeção de NpCit. A amostra foi capaz de induzir diminuição temporária nos níveis de TNF- α , tanto no grupo de idosos, quanto nos jovens, em comparação a seus respectivos controles não tratados. TNF- α está frequentemente aumentado em idosos e pode estar associado aos mecanismos desencadeantes de doenças típicas da idade, bem como associados a processos inflamatórios (EWERS; RIZZO; FILHO, 2008). Por sua vez, o óxido nítrico (NO), molécula sinalizadora envolvida em muitos processos fisiológicos e patológicos, pode ter ações opostas, como dano ou proteção de células durante a resposta inflamatória (HABIB; ALI, 2011). Neste estudo, os níveis de NO estavam menores nos camundongos não tratados, apesar do maior número de fagócitos observados nesses animais, tratados ou não com NpCit (HABIB; ALI, 2011). Níveis baixos de produção de NO também são tipicamente indicativos de danos ao fígado e podem aumentar o risco de várias doenças associadas a indivíduos mais velhos. A NpCit não afetou a produção de NO em camundongos fêmeas idosas, mas induziu uma redução temporária dos níveis de NO em camundongos jovens em comparação com camundongos não tratados. Em um estudo anterior, a neurotoxicidade induzida por NPs foi correlacionada à produção aumentada de NO (SHARMA et al., 2013), indicando que diferentes NPs podem apresentar ações distintas nos organismos.

A biodistribuição representa ferramenta valiosa para investigar o comportamento biológico das NPMs dependente do tempo, rastreando a localização das nanopartículas, elucidando sua disponibilidade para os sistemas biológicos, bem como as vias de eliminação. Nesse contexto, a biodistribuição é importante para avaliar o efeito de nova abordagem terapêutica ou o uso de uma nova amostra, especialmente em condições biológicas em que os efeitos dos medicamentos são pouco compreendidos, sobretudo em organismos idosos.

Várias técnicas são altamente úteis para investigar a biodistribuição das NPMs, tais como técnicas espectroscópicas e análises morfológicas (LACAVA et al., 2004; TEDESCO et al., 2003; KÜCKELHAUS et al., 2005; ESTEVANATO et al., 2012; POLLER et al., 2018).

Devido às condições severas de preparação da amostra para a espectroscopia óptica, essa técnica quantifica a concentração exata dos componentes liberados das nanopartículas, ao invés das nanopartículas intactas. Está bem estabelecido que o excesso de ferro, como o ferro proveniente das NPs, é depositado gradativamente em vários órgãos (NALLATHAMBY et al., 2015; HAN et al., 2018), mas principalmente no baço e no fígado (CANÇADO, 2007; RODRIGUES et al, 2017), corroborando os achados do presente estudo em animais idosos e jovens. O baço e o fígado são os órgãos onde a maioria dos macrófagos reside, e isso poderia explicar por que eles são o principal alvo das NPs (FENG et al, 2018).

Quantidades aumentadas de ferro foram detectadas pelo ICP-OES ou visualizadas em microscopia de luz até o último dia (28 dias) desta investigação. De fato, a biodegradação e a depuração de NPs no fígado e no baço podem variar expressivamente, tendo sido descritas desde as que ocorrem relativamente lentas (> 2 semanas) (FENG et al, 2018), até as aparentemente completas em 28 dias (POLLER et al, 2018), ou mesmo aquelas que se estendem por mais de seis meses (ESTEVANATO et al, 2012).

No entanto, algumas diferenças importantes na biodistribuição de ferro relacionadas à idade foram encontradas. Embora a quantidade de ferro detectada pelo ICP-OES no sangue de animais idosos do grupo controle tenha sido ligeiramente menor que a do grupo controle jovem, todos os órgãos (baço, fígado, rim, pulmão e cérebro) dos idosos apresentaram concentração maior de ferro do que os animais jovens.

Além disso, NpCit levou à biodistribuição de ferro completamente diversa nos animais idosos e jovens. A maior concentração de ferro no fígado aos 28 dias após a injeção, em relação aos seus respectivos controles, foi o único ponto de concordância entre os dois grupos de animais. Esse é um aspecto importante, pois várias doenças estão associadas a alterações no metabolismo do ferro (CRIELAARD et al., 2017) e devem ser consideradas na investigação da biodegradação de nanopartículas de óxido de ferro usadas como agente diagnóstico ou terapêutico para diversas doenças, principalmente em organismos mais velhos.

A análise morfológica em microscópio de luz após a coloração com azul da Prússia é valiosa para detectar a presença de ferro extra liberado das NPMs ou aglomerados de NPMs nos órgãos, como descrito para as NPMs revestidas com dextrana (LACAVA et al., 2002; ESTEVANATO et al, 2012), DMSA (CHAVES et al., 2002), magnetolipossomas (LACAVA et al., 2004), ou com ácido poliaspártico (SADEGHIANI et al., 2005). Neste trabalho, similar aos achados do ICP-OES, o ferro endógeno e NPs de maghemita foram detectados ao microscópio de luz e visualizados principalmente no baço, fígado e em menor quantidade nos

pulmões. Estes dados estão também em conformidade com os relatados por Pradhan et al. (2006) e Tietze et al. (2013), mesmo quando as NPs foram administradas por via intravenosa.

O acúmulo de ferro no baço, como esperado, foi detectado mesmo nos camundongos controles não tratados, tanto idosos como jovens, indicando a presença de ferro endógeno (ESTEVANATO et al., 2012), uma vez que os macrófagos da polpa vermelha do baço estão diretamente envolvidos no mecanismo de destruição dos eritrócitos e reabsorção de ferro (LACAVA et al., 2004; KHANDHAR et al., 2013).

Como já mencionado, uma preocupação geral em relação às aplicações de NPMs é a possibilidade de dano celular por sobrecarga de ferro. No entanto, sinais de dano estrutural, como necrose ou inflamação, não foram observados em todos os órgãos investigados durante todo o período do estudo (RAMAIAH, 2007), mesmo na presença de maior concentração de NPMs em alguns órgãos (ESTEVANATO et al., 2012), até 28 dias após a injeção intraperitoneal das amostras do fluído magnético contendo NpCit.

As alterações histológicas podem atestar processos graves, como inflamação, necrose ou alterações estruturais permanentes que refletem alterações de longo prazo. Uma vez que não foi encontrada nenhuma alteração histológica nos diversos órgãos analisados, relacionados ao processo de envelhecimento, deduz-se que as alterações hematológicas e bioquímicas observadas nos animais idosos não ocorreram durante o período mínimo necessário para transformar os tecidos dos órgãos e produzir alterações visíveis à microscopia de luz. Por sua vez, nos animais idosos tratados com NpCit também não se constataram alterações histológicas. Ainda que a maioria das alterações bioquímicas e hematológicas nestes animais tenham sido temporárias, as variações nas populações de leucócitos e na biodistribuição de ferro ainda estavam presentes no 28º dia após a exposição à NpCit. A presença de NPMs ou de seus derivados não necessariamente leva a alterações histológicas, como verificado em camundongos jovens expostos a uma dose única de NPs de magnetita revestidas com dextrana. Nestes animais, ferro em quantidades aumentadas foi observado por um longo período (6 meses) no fígado e no baço (ESTEVANATO et al., 2012).

A evidência histológica de ausência de efeitos tóxicos graves da NpCit representa um achado relevante. No entanto, dados obtidos de testes bioquímicos e hematológicos mostraram alterações que, apesar de leves e temporárias, devem ser consideradas no tocante à decisão sobre a toxicidade / biocompatibilidade, segurança da amostra e subsequente uso em aplicações biomédicas. De fato, estudos mostraram que animais mais velhos são mais suscetíveis aos efeitos adversos das nanopartículas em comparação com os animais jovens (LI; ZHANG; YAN, 2014). A inalação de nanopartículas de SiO₂ em condições idênticas

causou mais danos cardiovasculares e pulmonares em ratos idosos do que em animais jovens (CHEN et al., 2008).

Sharma et al. (2013) mostraram que ratos tratados com nanopartículas de alumínio ou cobre apresentaram neurotoxicidade em comparação com seus controles, mas os grupos etários mais velhos (30 a 35 semanas) exibiram maior neurotoxicidade que os ratos adultos jovens (18 a 20 semanas), sugerindo que os idosos são mais vulneráveis a danos cerebrais induzidos por nanopartículas. Além disso, camundongos fêmeas idosas apresentam maior permeabilidade intestinal e conseqüentemente maior absorção de NPs, maior deposição hepática e então mais lesões hepáticas, que podem culminar em um aumento do estresse oxidativo e níveis de inflamação após a administração de NPs (WEI et al, 2016). Em consonância com a necessidade premente de mais estudos em idosos, testes de eficácia terapêutica foram realizados na segunda etapa deste estudo.

A necessidade de desenvolvimento de alternativas terapêuticas para idosos surge do fato de que o envelhecimento, conforme já mencionado, é um fenômeno multifatorial em que a instabilidade do genoma, alterações epigenéticas e fatores de transcrição afetam negativamente o metabolismo celular, bem como a capacidade das células em reparar defeitos no DNA (LAGUNAS-RANGEL, 2018). Além disso, a diminuição da atividade mitocondrial e da eficiência do sistema imunitário adaptativo também é observada em organismos idosos. Em conjunto, esses aspectos aumentam o risco de desenvolvimento de neoplasias e podem explicar porque a incidência de câncer de mama aumenta com a idade, sendo 30% maior em pacientes de 70 anos ou mais (CHANG et al., 2018; HASTY; VIJG, 2002).

Sabe-se que quase 50% das mortes por carcinoma de mama ocorrem em pacientes idosas (ORUCEVIC et al., 2015) e que nas mesmas, os tratamentos tradicionais ocasionam maior toxicidade (SIEGEL; MILLER; JEMAL, 2016). Adicionalmente, conforme supracitado, não existem padrões bem estabelecidos para os tratamentos das neoplasias, especialmente do câncer de mama em pacientes com idade superior a 65 anos. Os procedimentos terapêuticos adotados ficam sujeitos aos critérios do oncologista, que leva em consideração os possíveis efeitos adversos advindos do tratamento, mas que devido aos escassos estudos em idosos, podem representar tratamento inadequado das pacientes (KARUTURI; VANDERWALDE; MUSS, 2016; ORUCEVIC, 2015). É notório que os programas de câncer de mama em todo o mundo dificilmente incluem mulheres idosas (DALMASSO et al., 2018; HERRERA et al., 2018).

Neste sentido, desenvolver pesquisas com alternativas terapêuticas, como a representada pela nanotecnologia usando como modelos organismos idosos portando tumores

é, portanto, bastante relevante. Em consonância, na segunda etapa desse trabalho, a combinação da MHT usando NpCit e da quimioterapia com NcSel para o tratamento do adenocarcinoma mamário foi testada, pioneiramente, em camundongos fêmeas idosas da linhagem *Swiss* (13-14 meses de idade).

Descrita como uma promissora ferramenta terapêutica, a MHT tem proporcionado excelentes resultados (NEVES, et al., 2017; ESTEVANATO, et al., 2012; CANDIDO et al., 2014). Alguns estudos têm ressaltado o uso da MHT como adjuvante da quimioterapia ou radioterapia. Kossatz et al. (2015) demonstraram que a MHT mediada por NPMs carregadas com Doxorubicina foram eficazes no tratamento do tumor de mama em camundongos. Mahmoudi et al. (2018) reportam excelentes resultados da hipertermia magnética combinada com a radioterapia no tratamento do glioblastoma em humanos. Kobayashi et al. (2014) demonstraram que a MHT foi capaz de induzir a expressão de proteínas de choque térmico (PCT) no interior e ao redor do tecido tumoral, o que causou a resposta imune específica e sistêmica ao tumor, sugerindo que a MHT é eficaz não apenas no tratamento dos tumores expostos ao tratamento térmico, mas também nos tumores metastáticos situados em locais distantes. Em um estudo de coorte, a MHT mediada por nanopartículas de Fe_3O_4 (12 nm) revestidas com aminosilano, foi testada clinicamente em combinação com radiação para tratamento de glioblastomas em 59 pacientes recorrentes, tendo o resultado revelado maior sobrevida com menores efeitos adversos quando comparados com os tratamentos convencionais ou os mesmos tratamentos realizados separadamente (MAIER-HAUFF et al., 2011).

Em concordância com estas informações, no presente estudo a administração simultânea do NcSel, levou ao aumento da eficácia da MHT na terapia antineoplásica com baixos efeitos adversos (KOTHAMASU et al., 2012; DOMINIAK et al., 2017), como demonstrado pelas análises clínicas, bioquímicas, hematológicas e imunológicas.

O Selol é um doador de selênio e agente antioxidante, apresentando menor toxicidade que outros suplementos à base de selênio, como o selenito de sódio, sem atividade mutagênica e com ação reguladora de citocinas pró-inflamatórias (IL-6, TNF- α , IFN- γ) (FLIS et al., 2015; DOMINIAK et al., 2017). Sochacka et al. (2018) mostraram que a administração de Selol aumenta a proteção contra o estresse oxidativo e aos danos ao DNA e RNA, reduzindo o risco de desenvolvimento de câncer. Entretanto, além de sua atividade antioxidante, o Selol atua também como pró-oxidante, especialmente junto com outros quimioterápicos ou com a radioterapia, danificando as células tumorais e ativando o mecanismo apoptótico (DOMINIAK et al., 2017).

Sochacka et al. (2014), demonstraram que a suplementação com Selol inibiu a ação da enzima antioxidante tiorredoxina redutases (TrxRs), no plasma tendo um efeito pro-oxidante. Este efeito é interessante se considerarmos que as células tumorais circulantes (CTCs) são células cancerosas oriundas do tumor primário que se encontram na circulação sanguínea (LOWE et al., 2015). As CTCs representam um estágio intermediário na disseminação metastática (AZEVEDO et al., 2015), cujas maiores concentrações estão relacionadas a um pior prognóstico. Dessa forma o efeito pró-oxidante no sangue oriundo da administração do Selol nanoencapsulado, poderia diminuir a viabilidade dessas células evitando a formação de metástases.

De fato, a nanoencapsulação de Selol induziu efeitos citotóxicos em linhagens de células de câncer de mama (Estevanato et al, 2012) e em células de adenocarcinoma pulmonar A549 De Souza et al., (2014), além da redução de adenocarcinoma de pulmão em camundongos, associada à baixa toxicidade sistêmica e biocompatibilidade (De Souza et al., 2015). O Selol nanoencapsulado pode levar ao aumento na eficácia como agente anticancerígeno, principalmente pela possibilidade de direcionamento específico para o tumor (KOTHAMASU et al., 2012), como verificado por Ganassin et al. (2018) com nanocápsulas de Selol com doxorubicina.

Nossos dados demonstraram que a associação entre hipertermia magnética mediada por NpCit associada à NcSel reduziu significativamente o volume tumoral, especialmente em relação ao controle não tratado e ao grupo tratado com PTX. Notavelmente, os animais tratados não apresentaram metástases para os linfonodos e órgãos importantes como baço, fígado, rins e pulmão, 30 dias após o tratamento.

Estes resultados são interessantes, levando em consideração a agressividade do tumor de Ehrlich que, implantado na mama, cresce rapidamente e forma metástases, especialmente para os linfonodos e pulmões (MINN et al., 2005; MIRANDA-VILELA et al., 2011). Estes resultados evidenciam o efeito sinérgico da MHT e da NcSel. Sochacka et al. (2018) destacaram que enquanto a administração de Selol aumenta a atividade das enzimas antioxidantes Glutathione peroxidase (GPx) e Tiorredoxina redutase (TrxR), especialmente no fígado e pulmão, e controla os níveis de citocinas pró-inflamatórias, a hipertermia magnética induz danos às células tumorais e causa desnaturação de proteínas do citoesqueleto, resultando em processos de degradação e apoptose (SOHAIL et al., 2017). De fato, Prasad et al. (2007) mostraram que, após sessões de MHT, células apresentaram ruptura significativa dos citoesqueletos de actina e tubulina, formando bolhas de vários tamanhos, características observadas em células em apoptose. Além disso, diversos trabalhos demonstraram que ambos

os tratamentos ativam o sistema imunológico (KOSSATZ et al., 2015; KAUR et al., 2017; DOMINIAK et al., 2017; HUANG; ROSE; HOFFMAN, 2012).

Adicionalmente, análises bioquímicas, imunológicas e hematológicas, especialmente das transaminases (ALT e AST), mostraram que os grupos tratados com as terapias combinadas tinham resultados mais semelhantes ao grupo controle sem tumor (CS) do que os grupos, controle tumoral e tratados com NpCit, MHT e NcSel, separadamente. Além disso, os grupos de tratamentos separados, incluindo o do paclitaxel, em comparação ao grupo CS, aumentaram significativamente a contagem total de leucócitos, principalmente das células médias (neutrófilos, basófilos e eosinófilos), característica associada a um pior prognóstico em diversos tumores (CHO et al., 2009). Templeton et al. (2014), em um trabalho de revisão, destacaram que a inflamação desempenha papel importante na progressão do câncer, e a alta relação entre neutrófilos e linfócitos (RNL) está associada com menor sobrevida em muitos tumores sólidos. Em conformidade, Jia et al. (2015) apontaram que um RNL elevado estava associado com menor sobrevida livre de doença e maior mortalidade no subgrupo de pacientes com câncer de mama triplo negativo, do que aqueles com menor RNL. Estes resultados sugerem o uso da RNL como um biomarcador prognóstico de neoplasia mamária. Além disso, Pileczki et al. (2013) destacaram que o TNF- α está envolvido na promoção e evolução do câncer de mama, especialmente nas células de câncer de mama triplo-negativo, bloqueando os receptores de estrogênio e progesterona. Estas características mostram semelhança entre o tumor Ehrlich e o subtipo mais agressivo de tumor de mama humano.

Frajacomo et al. (2016) evidenciaram que uma das características biológicas da caquexia, debilitação orgânica associada ao estágio terminal no carcinoma sólido de Ehrlich, é o aumento significativo dos níveis do pró-inflamatório TNF- α (07 vezes mais que o controle). Em acordo, nossos resultados mostraram aumento significativo (3,6 vezes maior) nos níveis de TNF- α nos animais do grupo controle portadores do tumor de Ehrlich não tratados em comparação com o grupo sem tumor. Entretanto, o tratamento com MHT associado a NcSel efetivamente diminuiu os níveis de TNF- α e promoveu melhora clínica e aumento da sobrevida, evidenciando os bons resultados dessas terapias combinadas.

CONCLUSÕES

A amostra NpCit, composta por nanopartículas de maghemita recobertas por citrato, apresentou alta estabilidade coloidal e biocompatibilidade adequada para uso biomédico, como revelado por suas características físico-químicas e confirmado pelos testes biológicos.

A amostra NpCit induziu efeitos idade-dependentes nos camundongos. Nos animais jovens ela causou alterações bioquímicas e hematológicas leves e temporárias, como as dos níveis da albumina e da ureia e parâmetros da hemoglobina. As alterações do processo natural de envelhecimento dos camundongos eram mais numerosas e profundas do que as causadas nos jovens pela NpCit. Camundongos idosos foram mais suscetíveis aos efeitos da NpCit que eram ora sinérgicos (leucócitos), ora opostos (eritrócitos, albumina, níveis de TNF- α e de NO) aos efeitos do envelhecimento. Alterações clínicas detectáveis, tais como disfunção intestinal, alopecia, perda significativa de peso ou alterações histológicas não foram observadas, quer em função da idade, quer em função do tratamento com NpCit. Estes resultados evidenciam a biocompatibilidade da amostra NpCit e seu potencial para aplicações biomédicas.

A distribuição do ferro endógeno ou advindo da administração de NpCit foi também idade-dependente e mostrou diferentes padrões até o final do experimento, conforme detectada por métodos espectrométrico e morfológico.

As diferenças entre idosos e jovens nos testes de biocompatibilidade e biodistribuição de NpCit enfatizam a necessidade de mais estudos performados por períodos de tempo mais longos para melhor estender os benefícios da nanotecnologia para a população idosa.

Um interessante efeito sinérgico foi observado através do uso da MHT mediada por NpCit associada à quimioterapia por NcSel que inibiu efetivamente o crescimento do tumor de Ehrlich em camundongos idosos, e interessante previniu metástases para os linfonodos, rins e pulmões, com ótimos resultados clínicos, como verificado através das observações clínicas e histopatológicas 45 dias após a indução tumoral, apesar da agressividade do tumor. Além disso, as terapias combinadas preveniram danos ao fígado, rins e controlaram o processo inflamatório sistêmico, avaliados por meio de exames bioquímicos, hematológicos e imunológicos. Dessa forma, os achados mostraram o grande potencial dessas terapias, para uso futuro em pacientes idosas com câncer de mama.

7. REFERÊNCIAS

- ALBERTS, B. *Biologia Molecular da Célula*, 5^a Edição ed. Porto Alegre: **Artmed**, 2010.
- ALENCAR, M. S. DE M.; BOCHNER, R.; DIAS, M. F. F. A pesquisa brasileira dedicada à nanotecnologia e riscos à saúde e ao meio ambiente. **RECIIS – Rev. Eletron. de Comun. Inf. Inov. Saúde**, v. 8, n. 3, p. 288–299, 2014.
- ALEXIOU, C. et al. Delivery of Superparamagnetic Nanoparticles for Local Chemotherapy after Intraarterial Infusion and Magnetic Drug Targeting. **Anticancer Res**, v. 27, p. 2019–2022, 2007.
- ALMERSJO, O. et al. Serum Enzyme Changes after Hepatic. **Annals of Surgery January**, v. 167, p. 9–17, 1968.
- AMES, B.; SHIGENAGA, M.; HAGEN, T. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 90, n. 17, p. 7915–7922, 1993.
- AZEVEDO, A. S. et al. Metastasis of circulating tumor cells: Favorable soil or suitable biomechanics, or both? **Cell Adhesion & Migration**, v. 9, n.5, p. 345-356, 2015.
- BARBER, M. D.; THOMAS, J. S. J.; DIXON, J. **Visual Guide for Clinicians BREAST CANCER**. first ed. Oxford: Clinical Publishing Oxford, 2012.
- BARBOSA, B. D. S. et al. Perfil hematológico e bioquímico de camundongos da linhagem Balb-c. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 45, n. 14771, p. 1–5, 2017.
- BARNARD, M. E.; BOEKE, C. E.; TAMIMI, R. M. Established breast cancer risk factors and risk of intrinsic tumor subtypes. **Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer**, v. 1856, n. 1, p. 73–85, 2015.
- BARSHA, G.; DENTON, K. M.; MIRABITO COLAFELLA, K. M. Sex- and age-related differences in arterial pressure and albuminuria in mice. **Biology of Sex Differences**, v. 7, n. 57, p. 1–15, 2016.
- BERRY, C. C.; CURTIS, A. C. S. G. Functionalization of magnetic nanoparticles for applications in biomedicine: Topical review. **J. Phys. D: Appl. Phys.** v. 36, p. 198–206, 2003.
- BONADIO, R. S. **Perfil de metilação global de dna em células mcf-7 e mcf-10a após exposição transiente de nanopartículas de maghemita funcionalizadas com citrato**. Brasília 2014, 86f. Dissertação de mestrado em Nanociência e Nanobiotecnologia da Universidade de Brasília.
- BONADIO, R. S. et al. DNA methylation alterations induced by transient exposure of MCF-7 cells to maghemite nanoparticles. **Nanomedicine**, p. 02-14, 2017.

BRAY, F. et al. Global Cancer Statistics 2018: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. **CA: Cancer J Clin**, V. 68, n. 6, p. 394-424, 2018.

BRASIL. Ministério da Saúde. Caderno de Ação básica. Controle dos Cânceres do Colo do Útero e da Mama. Brasília DF. 2013.

BRUCE, R.; TODD, J. K.; LE DUNE, L. Serum transaminase: its clinical use in diagnosis and prognosis. **British medical journal**, n. 1957, p. 1125–1128, 1958.

BRUGIN, A. **Avaliação da biocompatibilidade /toxicidade de fluido magnético composto de nanopartículas de maghemita recobertas de citrato em camundongos fêmeas Swiss**. Brasília 2007, 100f. Dissertação de mestrado Patologia molecular, Universidade de Brasília.

CALERO, M. et al. Characterization of interaction of magnetic nanoparticles with breast cancer cells. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 13, n. 1, p. 1–15, 2015.

CALZOLARI, A. et al. Translational Oncology Transferrin Receptor 2 Is Frequently and Highly Expressed in Glioblastomas. **Translational oncology**, v. 3, n. 2, p. 123–134, 2010.

CANÇADO, R. D. Sobrecarga e quelação de ferro na anemia falciforme. **Rev. bras. hematol. hemoter**, v. 29, n. 3, p. 316–326, 2007.

CANDIDO, N. M. et al. High Efficacy in Hyperthermia-associated with Polyphosphate Magnetic Nanoparticles for Oral Cancer Treatment. **Journal of Nanomedicine & Nanotechnology**, v. 05, n. 03, p. 1–11, 2014.

CASTELO BRANCO, A. C. DA S. et al. Parâmetros Bioquímicos e Hematológicos de Ratos Wistar e Camundongos Swiss do Biotério Professor Thomas George. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**, v. 15, n. 2, p. 209–214, 2011.

CHALIFOUX, A.; LAGACÉ, A. Enzymes sériques pour le diagnostic de la nécrose hépatique aigue expérimentale. **Canadian Journal of Comparative Medicine**, v. 33, n. 3, p. 178–186, 1969.

CHANG, L. et al. Breast cancer treatment and its effects on aging. **Journal of Geriatric Oncology**, p. 1–10, 2018.

CHATTERJEE, D. K.; DIAGARADJANE, P.; KRISHNAN, S. Nanoparticle-mediated hyperthermia in cancer therapy. **Ther Deliv**, v. 2, n. 8, p. 1001–1014, 2012.

CHAVES, N. L. et al. Exploring cellular uptake of iron oxide nanoparticles associated with rhodium citrate in breast cancer cells. **Int J. of Nanomedicine**, v.12, p. 5511-5523, 2017.

CHAVES, S. B. et al. Light microscopy and magnetic resonance characterization of a DMSA-coated magnetic fluid in mice. **IEEE Transactions on Magnetism**, v. 38, n. 5 I, p. 3231–3233, 2002.

CHEN, Z. et al. Age-related differences in pulmonary and cardiovascular responses to SiO₂nanoparticle inhalation: Nanotoxicity has susceptible population. **Environmental Science and Technology**, v. 42, n. 23, p. 8985–8992, 2008.

CHO, H. et al. Pre-treatment neutrophil to lymphocyte ratio is elevated in epithelial ovarian cancer and predicts survival after treatment. **Cancer Immunol Immunother**, v. 58, p. 15–23, 2009.

CHOU DHURY, H. et al. Safety against nephrotoxicity in paclitaxel treatment: Oral nanocarrier as an effective tool in preclinical evaluation with marked in vivo antitumor activity. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 91, p. 179–189, 2017.

COLE, A. J.; YANG, V. C.; DAVID, A. E. NIH Public Access. **Trends Biotechnol**, v. 29, n. 7, p. 323–332, 2011.

COSTA-SILVA, B. et al. Pancreatic cancer exosomes initiate pre-metastatic niche formation in the liver. **Nature Cell Biology**, v. 17, n. 6, p. 816–826, 2015.

CRIELAARD, B.; LAMMERS, T.; RIVELLA, S. Targeting iron metabolism in drug discovery and delivery. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 16, n. 6, p. 400–423, 2017.

DALMASSO, B. et al. Age-related microRNAs in older breast cancer patients : biomarker potential and evolution during adjuvant chemotherapy. **BMC Cancer**, v. 18, n. 1014, p. 1–15, 2018.

DE SOUZA, L. R. et al. PVM/MA-shelled Selol nanocapsules promote cell cycle arrest in A549 lung adenocarcinoma cells. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 12, n. 1, p. 1–17, 2014.

DE SOUZA, L. R. et al. Antitumor activity and systemic effects of PVM/MA-shelled Selol nanocapsules in lung adenocarcinoma-bearing mice. **Nanotechnology**, v. 26, n. 50, 2015.

DEWAR, H. A.; ROWELL, N. R.; SMITH, A. J. Serum glutamic oxalacetic transaminase in acute myocardial infarction. **British Medical Journal**, v. 2, n. 5105, p. 1121–1125, 1958.

DIEZ, S. C.; ALLENDE, R. DE LAS C.; GARCÍA, E. C. Estado actual del metabolismo del hierro: implicaciones clínicas y terapéuticas. **Medicina Clinica**, p. 01-7, 2016.

DOMINI AK, A. et al. Selol, an organic selenium donor, prevents lipopolysaccharide-induced oxidative stress and inflammatory reaction in the rat brain. **Neurochemistry International**, v. 108, p. 66–77, 2017.

DURÁN, N.; MATTOSO, L.H.C, MORAIS, P.C. Nanotecnologia: introdução, preparação e caracterização de nanomateriais e exemplos de aplicação. São Paulo, Ed. **Artliber**, 208 p, 2006.

ESTE VANATO, L. et al. Preliminary biocompatibility investigation of magnetic albumin nanosphere designed as a potential versatile drug delivery system. **International Journal of Nanomedicine**, v. 6, n. 1, p. 1709–1717, 2011.

ESTE VANATO, L. L. C. et al. Co-nanoencapsulation of magnetic nanoparticles and Selol for breast tumor treatment: In vitro evaluation of cytotoxicity and magnetohyperthermia efficacy.

International Journal of Nanomedicine, v. 7, p. 5287–5299, 2012.

EWERS, I.; RIZZO, L. V.; FILHO, J. K. Imunologia e envelhecimento Aging and immunology. **Einstein**, v. 6, n. 1, p. 13–20, 2008.

FALQUEIRO, A. M. et al. Selol-loaded magnetic nanocapsules: A new approach for hyperthermia cancer therapy. **Journal of Applied Physics**, v. 109, n. 7, p. 111–114, 2011.

FARRUGIA, A. Albumin Usage in Clinical Medicine: Tradition or Therapeutic? **Transfusion Medicine Reviews**, v. 24, n. 1, p. 53–63, 2010.

FENG, Q. et al. Uptake, distribution, clearance, and toxicity of iron oxide nanoparticles with different sizes and coatings. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–13, 2018.

FENG, S. S.; CHIEN, S. Chemotherapeutic engineering: Application and further development of chemical engineering principles for chemotherapy of cancer and other diseases. **Chemical Engineering Science**, v. 58, n. 18, p. 4087–4114, 2003.

FERLAY, J. et al. Cancer incidence and mortality - Major patterns in GLOBOCAN 2012, worldwide and Georgia. **Int. J. Cancer**, v. 136, n. 1, p. 359–386, 2015.

FRAJACOMO, F. T. T. et al. Solid Ehrlich carcinoma reproduces functional and biological characteristics of cancer cachexia. **Life Sciences**, v. 16, p. 1–23, 2016.

FREEDMAN, R. A. Treatment of Breast Cancer in the Elderly. **Current Oncology Reports**, v. 17, n. 11, p. 1–8, 2015.

GAJEWICZ, A. et al. Advancing risk assessment of engineered nanomaterials: Application of computational approaches. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 64, n. 15, p. 1663–1693, 2012.

GANASSIN, R. et al. Selol nanocapsules with a poly(methyl vinyl ether-co-maleic anhydride) shell conjugated to doxorubicin for combinatorial chemotherapy against murine breast adenocarcinoma in vivo. **Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology**, v. 0, n. 0, p. 1–7, 2018.

GANZ, T. Systemic iron homeostasis. **Physiol Rev**, v. 93, p. 1721–1741, 2013.

GAROUSI, F. The toxicity of different selenium forms and compounds – Review. **Agrártudományi Közlemények**, v. 64, p. 33–38, 2015.

GONTIJO, A. M. M. C; TICE, R. Teste do cometa para a detecção de dano no DNA e reparo em células individualizadas. In: Ribeiro LR, Salvadori DMF, Marques EK (Org). Mutagêneses ambiental. Canoas/RS, Ed. **Ulbra**, p. 247-279. 2003.

GROTTO, H. ELENA Z. W. Fisiologia e metabolismo do ferro. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 32, n. 2, p. 08-17, 2010.

GROTTO, H. Z. W. Metabolismo do ferro : uma revisão sobre os principais mecanismos envolvidos em sua homeostase Iron metabolism : an overview on the main mechanisms

involved in its homeostasis. **Revista brasileira de hematologia e hemoterapia**, v. 30, n. 5, p. 390–397, 2008.

HABIB, S.; ALI, A. Biochemistry of nitric oxide. **Indian Journal of Clinical Biochemistry**, v. 26, n. 1, p. 3–17, 2011.

HAGHNAZ, R.; UMRANI, R. D.; PAKNIKAR, K. M. Hyperthermia mediated by dextran-coated La_{0.7}Sr_{0.3}MnO₃nanoparticles: In vivo studies. **International Journal of Nanomedicine**, v. 11, p. 1779–1791, 2016.

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

HAN, X. et al. Preparation and In Vivo Biodistribution of Ultra-Small Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles with High Magnetic Targeting Response. **Journal of nanoscience and nanotechnology**, v. 18, n. 2, p. 879–886, 2018.

HASTY, P.; VIJG, J. Genomic priorities in aging. **Science**, v. 296, n. 5571, p. 1250–1251, 2002.

HÉQUET, D. et al. Les récepteurs aux androgènes dans le cancer du sein : expression , valeur et perspectives thérapeutiques. **Bulletin du Cancer**, p. 1–7, 2017.

HERRERA, D. A. et al. Nanoparticle albumin bound-paclitaxel for treatment of advanced non-small cell lung cancer: an evaluation of the clinical evidence. **Expert Opinion on Pharmacotherapy**, v.20, n.1, p.95-102, 2018.

HERVAULT, A. et al. Doxorubicin loaded dual pH- and thermo-responsive magnetic nanocarrier for combined magnetic hyperthermia and targeted controlled drug delivery applications. **Nanoscale**, v. 8, n. 24, p. 12152–12161, 2016.

HORTON, J. K. et al. FAS Death Receptor: A Breast Cancer Subtype-Specific Radiation Response Biomarker and Potential Therapeutic Target. **Radiation Research**, v. 184, n. 5, p. 456–469, 2015.

HU, Y. et al. Construction of iron oxide nanoparticle-based hybrid platforms for tumor imaging and therapy Yong. **Chemical Society Reviews**, v. 47, p. 1874–1900, 2018.

HUANG, Z.; ROSE, A. H.; HOFFMAN, P. R. The Role of Selenium in Inflammation and Immunity : **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 16, n. 7, p. 705–733, 2012.

HURRIA, A. et al. Age-Related Changes in Nanoparticle Albumin-Bound Paclitaxel Pharmacokinetics and Pharmacodynamics: Influence of Chronological Versus Functional Age. **The Oncologist**, v. 20, n. 1, p. 37–44, 2015.

INCA. Instituto Nacional de Câncer. **Estimativa 2018: incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA, 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 Immunology, Immunotherapy**, v. 55, n. 3, p. 320–328, 2006.

JADIA, R.; SCANDORE, C.; RAI, P. Nanoparticles for Effective Combination Therapy of Cancer. **Int J Nanotechnol Nanomed.**, v. 1, n. 1, p. 1–27, 2016.

JASMIN et al. Tracking stem cells with superparamagnetic iron oxide nanoparticles : perspectives and considerations. **International Journal of Nanomedicine**, v. 12, p. 779–793, 2017.

JENKINS, E. O. et al. Age-Specific Changes in Intrinsic Breast Cancer Subtypes: A Focus on Older Women. **The Oncologist**, v. 19, n. 10, p. 1076–1083, 2014.

JIA, W. et al. The Peripheral Blood neutrophil-To-Lymphocyte Ratio Is Superior to the Lymphocyte-To-Monocyte Ratio for Predicting the Long-Term Survival of Triple-Negative Breast Cancer Patients. **PLoS One**, v.10, n.11 p. 0143061, 2015.

JIANG, L. et al. Ferroptosis as a p53-mediated activity during tumour suppression. **Nature**, v. 520, n. 7545, p. 57–62, 2015.

JUNIOR, A. P.; CURY, A. J.; GIMENES, A. CANTERO. Clinical laboratory findings in the elderly. **J Bras Patol Med Lab.**, v. 48, n. 3, p. 169–174, 2012.

JUNQUEIRA, L. C. & CARNEIRO, J. Histologia Básica. 12ed. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**, 2013.

KALIA, M. Biomarkers for personalized oncology: Recent advances and future challenges. **Metabolism: Clinical and Experimental**, v. 64, n. 3, p. S16–S21, 2015.

KAMANGAR, F.; DORES, G. M.; ANDERSON, W. F. Patterns of cancer incidence, mortality, and prevalence across five continents: Defining priorities to reduce cancer disparities in different geographic regions of the world. **Journal of Clinical Oncology**, v. 24, n. 14, p. 2137–2150, 2006.

KANDASAMY, G. et al. Functionalized Hydrophilic Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles for Magnetic Fluid Hyperthermia Application in Liver Cancer Treatment. **ACS Omega**, v. 3, p. 3991–4005, 2018.

KARUTURI, M.; VANDERWALDE, N.; MUSS, H. Approach and Management of Breast Cancer in the Elderly. **Clin Geriatr Med**, v. 32, p. 133–153, 2016.

KAUR, P. et al. Hyperthermia using nanoparticles - Promises and pitfalls. **International Journal of Hyperthermia**, v. 32, n. 1, p. 76–88, 2016.

KHANDHAR, A. P. et al. Monodisperse magnetite nanoparticle tracers for in vivo magnetic particle imaging. **Biomaterials**, v. 34, n. 15, p. 3837–3845, 2013.

KHALIL, D.N. et al. The future of cancer treatment: immunomodulation, CARs and combination immunotherapy. **Nat Rev Clin Oncol**, v. 13, n. 5, p. 273-90, 2016.

- KOBAYASHI, T. et al. Antitumor immunity by magnetic nanoparticle-mediated hyperthermia. **Nanomedicine**, v. 09, n. 11, p. 1715–1726, 2014.
- KOSSATZ, S. et al. Efficient treatment of breast cancer xenografts with multifunctionalized iron oxide nanoparticles combining magnetic hyperthermia and anti-cancer drug delivery. **Breast Cancer Research**, v. 17, n. 66, p. 01-17, 2015
- KOTHAMASU, P. et al. Nanocapsules: The weapons for novel drug delivery systems. **BioImpacts**, v. 2, n. 2, p. 71–81, 2012.
- KÜCKELHAUS, S. et al. Optical emission spectroscopy as a tool for the biodistribution investigation of cobalt-ferrite nanoparticles in mice. **Journal of Applied Physics**, v. 97, n. 10, p. 2003–2006, 2005.
- KUMAR, A. et al. Cellular uptake and mutagenic potential of metal oxide nanoparticles in bacterial cells. **Chemosphere**, v. 83, n. 8, p. 1124–1132, 2011.
- KUMARI, M. et al. Repeated Oral Dose Toxicity of Iron Oxide Nanoparticles : Biochemical and Histopathological Alterations in Different Tissues of Rats. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 12, n. 3, p. 2149–2159, 2012.
- LACAVAL, L. M. et al. Use of magnetic resonance to study biodistribution of dextran-coated magnetic fluid intravenously administered in mice. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 252, p. 367–369, 2002.
- LACAVAL, Z. G.M. et al. Toxic effects of ionic magnetic fluids in mice. **J Magn Magn Mater**. v.194, n. 1–3, p.90–95, 1999.
- LACAVAL, Z. G. M. et al. Biodistribution and biocompatibility investigation in magnetoliposome treated mice. **Spectroscopy IOS Press**, v. 00, p. 1–7, 2004.
- LAGUNAS-RANGEL, F. A. Cancer-free aging: Insights from *Spalax ehrenbergi* superspecies. **Ageing Research Reviews**, v. 47, p. 18–23, 2018.
- LAURENT, S. et al. Magnetic fluid hyperthermia: Focus on superparamagnetic iron oxide nanoparticle. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 166, p. 8–23, 2011.
- LEE, J. H.; NAN, A. Combination Drug Delivery Approaches in Metastatic Breast Cancer. **journal of drug delivery**, v. 2012, p. 1–17, 2012.
- LEE, W. Acute liver failure in the United States. **Seminars in Liver Disease**, v. 23, n. 3, p. 217–226, 2003.
- LETAVAYOVÁ, L. et al. Toxicity and mutagenicity of selenium compounds in *Saccharomyces cerevisiae*. **Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 638, n. 1–2, p. 1–10, 2008.
- LI, J. et al. Murine hematopoietic stem cell reconstitution potential is maintained by osteopontin during aging. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–9, 2018.
- LI, Y.; ZHANG, Y.; YAN, B. Nanotoxicity Overview : Nano-Threat to Susceptible

- Populations. **Int. J. Mol. Sci**, v. 15, p. 3671–3697, 2014.
- LIU Y.; NGUYEN, N.; COLDITZ, G. A. Links between alcohol consumption and breast cancer: a look at the evidence. **Women's Health (London, England)**. V. 11, p. 65-77, 2015.
- LOMIS, N. et al. Human Serum Albumin Nanoparticles for Use in Cancer Drug Delivery : Process Optimization and In Vitro Characterization. **nanomaterials**, v. 6, n. 116, p. 1–17, 2016.
- LOWE, A. C. et al. Young investigator challenge: application of cytologic techniques to circulating tumor cell specimens: detecting activation of the oncogenic transcription Factor STAT3. **Cancer Cytopathology**, V. 123, n.12, p. 696-706, 2015.
- MA, L.; KOHIL, M.; SMITH, A. Nanoparticles for Combination Drug Therapy. **ACS Nano**, v. 7, n. 11, p. 9518–9525, 2014.
- MAHIPAL, A. et al. Effect of Age on Clinical Outcomes in Phase 1 Trial Participants. **Cancer control journal of moffitt cancer center**, v. 22, n. 2, p. 235–241, 2015.
- MAHMOUDI, K. et al. Magnetic hyperthermia therapy for the treatment of glioblastoma: a review of the therapy's history, efficacy, and application in humans. **International Journal of Hyperthermia**, v. 34, n.8, p.1-36, 2018.
- MAIER-HAUFF, K. et al. Efficacy and safety of intratumoral thermotherapy using magnetic iron-oxide nanoparticles combined with external beam radiotherapy on patients with recurrent glioblastoma multiforme. **Journal of Neuro-Oncology**, v. 103, n. 2, p. 317–324, 2011.
- MAMANI, J. B. et al. Synthesis and characterization of magnetite nanoparticles coated with lauric acid. **Materials Characterization**, v. 81, p. 1–9, 2013.
- MENDELSON, J. et al. **The Molecular Basis of Cancer**. 4. ed. Philadelphia, PA: Elsevier Saunders, 2015.
- MINN, A. J. et al. Genes that mediate breast cancer metastasis to lung. **Nature Publishing Group**, v. 436, p. 518–524, 2005.
- MIRANDA-VILELA, A. L. et al. The protective effects of nutritional antioxidant therapy on Ehrlich solid tumor-bearing mice depend on the type of antioxidant therapy chosen: Histology, genotoxicity and hematology evaluations. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 22, n. 11, p. 1091–1098, 2011.
- MIRANDA-VILELA, A. L. et al. Dextran-functionalized magnetic fluid mediating magnetohyperthermia combined with preventive antioxidant pequi-oil supplementation: Potential use against cancer. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 9, n. 7, p. 1261–1271, 2013.
- MOTTA, V. T. **Bioquímica Clínica: Princípios e Interpretações**. Porto Alegre: Médica Missau, 2003.
- NALLATHAMBY, P. D. et al. New surface radiolabeling schemes of super paramagnetic

iron oxide nanoparticles (SPIONs) for biodistribution studies. **Nanoscale**, v. 7, n. 15, p. 6545–6555, 2015.

NEVES, W. P. et al. Cancer Science & Therapy Comparative Efficacy of a Biocompatible Citrate-Functionalized Magnetic Fluid Mediating Radiofrequency Hyperthermia and Magnetohyperthermia to Treat Ectopic Ehrlich-Solid-Tumor-Bearing Elderly Mice. **Journal of Cancer Science & Therapy**, v. 9, n. 4, p. 393–400, 2017.

NIH. National Institutes of Health, **United States Department of Health and Human Services**, v.2, n.1. 2013.

NAOUM, P. C.; NAOUM, F. A. **Biologia médica do cancer humano**. Sao Jose do Rio Preto, São Paulo: Editora Vitrine Literaria, 2016.

ORUCEVIC, A. et al. Breast Cancer in Elderly Caucasian Women—An Institution-Based Study of Correlation between Breast Cancer Prognostic Markers, TNM Stage, and Overall Survival. **Cancers (Basel)**, p. 1472–1483, 2015.

OMS, **Preventing Chronic Diseases: A Vital Investment**, Geneva, Organização mundial de saúde, 2015.

OZASLAN, M. et al. Ehrlich ascites carcinoma. **African Journal of Biotechnology**, v.10, n.13, p.2375-2378. 2011.

PAGET, S. The distribution of secondary growths in cancer of the breast. **The Lancet**, v.133, n. 3421, p. 571–573, 1889.

PATRA, S. et al. Evaluation of Antitumor and Antioxidant Activity of *Sargassum tenerrimum* against Ehrlich Ascites Carcinoma in Mice. **Asian Pac J Cancer Prev**, v. 16, n. 3, p. 915–921, 2015.

PAVON, L. F.; OKAMOTO, O. K. Aplicações de recursos nanobiotecnológicos em câncer Applications of nanobiotechnology in cancer. **Einstein: Revendo Ciências Básicas**, v. 5, n. 1, p. 74–77, 2007.

PECORINO, L. **Molecular Biology of Cancer Mechanisms, Targets, and Therapeutics**. Third ed. United Kingdom: [s.n.].2013.

PINNIX, Z. K. et al. and Prognosis. **Sci Transl Med**, v. 2, n. 43, p. 43–56, 2010.

POLLER, W. C. et al. Very small superparamagnetic iron oxide nanoparticles: Long-term fate and metabolic processing in atherosclerotic mice. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 14, n. 8, p. 2575–2586, 2018.

POTEL, C. M.; FASCI, D.; HECK, A. J. R. Mix and match of the tumor metastasis suppressor Nm23 protein isoforms in vitro and in vivo. **Federation of European Biochemical Societies** [s.l: s.n.]. v. 285,

PRADHAN, P. et al. Comparative Evaluation of Heating Ability and Biocompatibility of Different Ferrite-Based Magnetic Fluids for Hyperthermia Application. **J Biomed Mater Res**

Part B: Appl Biomater, v. 81B, p. 12–22, 2006.

PRASAD, N. K. et al. Mechanism of cell death induced by magnetic hyperthermia with nanoparticles of $c\text{-MnxFe}_{22}\text{xO}_3$ synthesized by a single step process. **J. Mater. Chem**, v. 17, p. 5042–5051, 2007.

QUIMBY, F.; LUONG, R. Clinical Chemistry of the Laboratory Mouse. In: **The Mouse in Biomedical Research, Volume 3 2nd Edition**. [s.l: s.n.]. p. 171–216.

RADES, D. et al. A new instrument for estimation of survival in elderly patients irradiated for metastatic spinal cord compression from breast cancer. **Radiation Oncology**, p. 1–5, 2015.

RAMAIAH, S. K. A toxicologist guide to the diagnostic interpretation of hepatic biochemical parameters. **Food Chem Toxicol**, v. 45, p. 1551–1557, 2007.

RAMOS-CABRER, P.; CAMPOS, F. Liposomes and nanotechnology in drug development : Focus on neurological targets. **International Journal of Nanomedicine**, v. 8, p. 951–960, 2013.

RICCIO, G. et al. Trastuzumab and target-therapy side effects: Is still valid to differentiate anthracycline Type I from Type II cardiomyopathies? **Hum Vaccin Immunother**, v.12, n. 5, p. 1124-1131, 2016.

RODRIGUES, D. et al. Quantitative histochemistry for macrophage biodistribution on mice liver and spleen after the administration of a pharmacological-relevant dose of polyacrylic acid-coated iron oxide nanoparticles. **Nanotoxicology**, v. 11, n. 2, p. 256–266, 2017.

ROMOND, E. H. et al. Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable HER2-positive breast cancer. **N Engl J Med**, v. 353, p. 1673-1684, 2005.

RUIZ, A. et al. Magnetic nanoparticles coated with dimercaptosuccinic acid: development, characterization, and application in biomedicine. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 16, n. 11, 2014.

SADEGHIANI, N. et al. Magnetic Resonance of Polyaspartic Acid-Coated Magnetite Nanoparticles Administered in Mice. **IEEE TRANSACTIONS ON MAGNETICS**, v. 41, n. 10, p. 4108–4110, 2005.

SAHAY, G.; ALAKHOVA, D.Y.; KABANOV, A, V. Endocytosis of nanomedicines. **J Control Release**, v.145 n.3. p.182–195, 2010.

SARASWATHY, A. et al. Citrate coated iron oxide nanoparticles with enhanced relaxivity for in vivo magnetic resonance imaging of liver fibrosis. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 117, p. 216–224, 2014.

SCHRAUZER, G. N. The nutritional significance , metabolism and toxicology of selenomethionine. **Advances in food an Nutrition Research**, v. 47, n. 03, p. 73–112, 2003.

SERRA, K. P. et al. Nova classificação dos carcinomas da mama : procurando o luminal A The new classification of breast cancers : finding the luminal A. **Rev Bras Ginecol Obstet**, v.

36, n. 12, p. 575–580, 2014.

SHARMA, A. et al. Size- and age-dependent neurotoxicity of engineered metal nanoparticles in rats. **Molecular Neurobiology**, v. 48, n. 2, p. 386–396, 2013.

SHEEDFAR, F. et al. Liver diseases and aging: Friends or foes? **Aging Cell**, v. 12, n. 6, p. 950–954, 2013.

SHRESTHA, S. et al. Citrate-capped iron oxide nanoparticles impair the osteogenic differentiation potential of rat mesenchymal stem cells. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 4, n. 2, p. 245–256, 2015.

SIDDIQI, K. S. et al. Biogenic Fabrication of Iron / Iron Oxide Nanoparticles and Their Application. **Nanoscale Research Letters**, v. 11, n. 498, p. 1–13, 2016.

SIEGEL, R. L.; MILLER, K. D.; JEMAL, A. Cancer Statistics, 2016. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 66, n. 1, p. 7–30, 2016.

SIGNORINI, L.; SIGNORINI, L. Hepcidina Um hormônio essencial à homeostase do ferro Resumo. **Revista NewsLab**, v. 1, n. 4, p. 44–56, 2015.

SILVA, A. C. DA et al. Magnetohyperthermia for treatment of gliomas: experimental and clinical studies. **Einstein**, v. 8, n. 3, p. 361, 2010.

SINGH, R. et al. Tissue biodistribution and blood clearance rates of intravenously administered carbon nanotube radiotracers. **PNAS, Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 9, p. 3357–3362, 2006.

ŚLUSARCZYK, J. et al. Antimitotic effect of Selol and sodium selenate (IV) on Allium test cells. **Caryologia**, v. 67, n. 3, p. 250–259, 2014.

SOCHACKA, M. et al. Effects of Selol 5% supplementation on the activity or concentration of antioxidants and malondialdehyde level in the blood of healthy mice. **Pharmacological Reports**, v. 67, n. 8, p. 301–310, 2014.

SOCHACKA, M. et al. Effects of Selol 5% supplementation on tissue antioxidant enzyme levels and peroxidation marker in healthy mice. **Pharmacological Reports**, v. 70, n. 6, p. 1073–1078, 2018.

SOHAIL, A. et al. Revue sur le traitement par hyperthermie médiée par nanoparticules. **Bulletin du Cancer**, v. 104, n. 5, p. 452–461, 2017.

SOUSA, C. R. S. **Nanopartículas magnéticas recobertas com citrato e nanocápsulas contendo selol no tratamento do adenocarcinoma mamário de Ehrlich ortotópico em camundongo swiss**. Brasília 2015, 143f. Tese de Doutorado em Nanociência e Nanobiotecnologia da Universidade de Brasília.

SUCHOCKI, P. et al. The activity of Selol in multidrug-resistant and sensitive human leukemia cells. **Oncology Reports**, v. 18, n. 4, p. 893–899, 2007.

SUN, C.; LEE, J. S. H.; ZHANG, M. Magnetic Nanoparticles in MR Imaging and Drug

Delivery Conroy. **Adv Drug Deliv Rev**, v. 60, n. 11, p. 1252–1265, 2008.

SUTHERLAND, R. Biochemical Evaluation of the Hepatobiliary System in Dogs and Cats. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 19, n. 5, p. 899–927, 1989.

TANAK, T. et al. Nanotechnology for breast cancer therapy. **Biomed Microdevices**, v. 11, p. 49–63, 2009.

TEDESCO, A. C. et al. Determination of binding constant K_b of biocompatible, ferrite-based magnetic fluids to serum albumin. **Journal of applied Physics**, v. 93, n. 6704, p. 1–4, 2003.

TEMPLETON, A. J. et al. Prognostic Role of Neutrophil-to-Lymphocyte Ratio in Solid Tumors: A Systematic Review and Meta-Analysis. **J Natl Cancer Inst**, v. 106, n.6, p. 1-11, 2014.

THRALL, M. . **Hematologia e bioquímica clínica veterinária**. 7. ed. São Paulo: Roca, 2007.

TIETZE, R. et al. Efficient drug-delivery using magnetic nanoparticles — biodistribution and therapeutic effects in tumour bearing rabbits. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, p. 1–11, 2013.

TORTI, S. V.; TORTI, F. M. Iron and cancer: More ore to be mined. **Nature Reviews Cancer**, v. 13, n. 5, p. 342–355, 2013.

TRIPATHI, A. K. et al. **Prion protein functions as a ferrireductase partner for ZIP14 and DMT1**. [s.l.] Elsevier, 2015.

TURAJLIC, S.; SWANTON, C. Metastasis as an evolutionary process. **science**, v. 352, n. 6282, p. 169–175, 2016.

VERMA, J.; LAL, S.; NOORDEN, C. J. VAN. Nanoparticles for hyperthermic therapy: synthesis strategies and applications in glioblastoma. **International Journal of Nanomedicine**, v. 9, p. 2863–2877, 2014.

WEINBERG, R. A. LLAN. **The Biology of Cancer**. [s.l.: s.n.]. v. second edi

WEINSTEIN, J. R.; ANDERSON, S. The aging kidney: physiological changes. **Adv Chronic Kidney Dis**, v. 17, n. 4, p. 302–307, 2010.

WHITEHEAD, J. C. et al. A clinical frailty index in aging mice: Comparisons with frailty index data in humans. **Journals of Gerontology - Series A Biological Sciences and Medical Sciences**, v. 69, n. 6, p. 621–632, 2014.

WOLFF, A. C. et al. Recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Clinical Practice Guideline Update. **J Clin Oncol**, v. 3, p. 3997-4013, 2013.

WU, W.; JIANG, C. Z.; ROY, V. A. L. Designed synthesis and surface engineering strategies of magnetic iron oxide nanoparticles for biomedical applications. **Nanoscale**, v. 8, n. 47, p. 19421–19474, 2016.

XIAO, K. et al. The effect of surface charge on in vivo biodistribution of PEG-oligocholeic acid based micellar nanoparticles. **Biomaterials**, v. 32, n. 13, p. 3435-46, 2011.

XU, X. et al. Cancer Nanomedicine: From Targeted Delivery to Combination Therapy. **Trends Mol Med**, v. 21, n. 4, p. 223–232, 2015.

ZAGO, M. A.; FALCÃO, R. P.; PASQUINI, R. **Hematologia - Fundamentos e Prática**. São Paulo: Atheneu, 2004.

Brasília, 5 de julho de 2016.

DECLARAÇÃO

Declaramos que o projeto intitulado "EFICÁCIA TERAPÊUTICA DA MAGNETOHIPERTERMIA COM NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS RECOBERTAS COM CITRATO COMBINADA COM QUIMIOTERAPIA COM NANOCÁPSULAS DE SEIOL, NO TRATAMENTO DO TUMOR DE MAMA INDUZIDO ORTOTÓPICAMENTE POR CÉLULAS DE EHRLLICH EM CAMUNDONGOS SWISS IDOSOS.", UnBDoC n.º 17672/2016, 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 Mus musculus: 182. A presente aprovação é válida pelo período de 10/03/2016 a 21/12/2018.

Paula Diniz

Profa. 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.