



Universidade de Brasília

Faculdade de Medicina

Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular

**LÍVIA CARNEIRO MATOS AVELINO**

**Potencial aplicação de nanoestruturas magnéticas contendo Selol no  
tratamento do câncer de pele e como contraste em exames de  
microtomografia computadorizada**

Brasília – DF

Dezembro 2013

Universidade de Brasília  
Faculdade de Medicina  
Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular

**LÍVIA CARNEIRO MATOS AVELINO**

**Potencial aplicação de nanoestruturas magnéticas contendo Selol no  
tratamento do câncer de pele e como contraste em exames de  
microtomografia computadorizada**

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

**Orientadora: Profa. Dra. Zulmira Guerrero Marques Lacava**

Brasília – DF  
Dezembro 2013

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade de Brasília. Acervo 1013705.

A948p Avelino, Lívia Carneiro Matos.  
Potencial aplicação de nanoestruturas magnéticas contendo  
Selol no tratamento do câncer de pele e como contraste  
em exames de microtomografia computadorizada / Lívia  
Carneiro Matos Avelino. -- 2013.  
160 f. : il. ; 30 cm.

Tese (doutorado) - Universidade de Brasília, Faculdade  
de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Patologia  
Molecular, 2013.

Inclui bibliografia.

Orientação: Zulmira Guerrero Marques Lacava.

1. Pele - Câncer. 2. Nanotecnologia. 3. Nanobiotecnologia.  
I. Lacava, Zulmira Guerrero Marques. II. Título.

CDU 616.5-006.6

**LÍVIA CARNEIRO MATOS AVELINO**

**Potencial aplicação de nanoestruturas magnéticas contendo Selol no  
tratamento do câncer de pele e como contraste em exames de  
microtomografia computadorizada**

Comissão examinadora:

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

Profa. Dra. Patrícia Pommé Confessori Sartoratto (IQ, UFG)  
(Membro titular)

Profa. Dra. Fabiana Pirani Carneiro (FM, UnB)  
(Membro titular)

Prof. Dr. João Paulo Figueiró Longo (IB, UnB)  
(Membro titular)

Prof. Dr. Paulo Tadeu de Souza Figueiredo (FS, UnB)  
(Membro titular)

Profa. Dra. Maria de Fátima Menezes Almeida Santos (IB, UnB)  
(Suplente)

Brasília, 18 de dezembro de 2013

*Dedico este trabalho aos meus  
queridos pais, meus maiores exemplos.*

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, pela oportunidade concedida de realizar este trabalho, pelos desafios colocados ao longo do caminho que me fizeram crescer e, acima de tudo, por me dar força para superá-los e pela presença e proteção, sempre.

Aos meus pais, Neli e José Vasconcelos, pelo apoio incondicional em todos os momentos da minha vida acadêmica. Agradeço o amor, o suporte e o exemplo de vida que me dão até hoje. Amo vocês!

Ao meu querido e amado esposo Samuel, por ter suportado todas as dificuldades junto comigo e por ter vibrado com cada momento gratificante dessa pesquisa. Agradeço as horas intermináveis de discussão do projeto, as ideias e as sugestões vindas de um físico! Você foi praticamente co-orientador e co-autor deste trabalho! Obrigada pelo carinho e companheirismo!

Aos meus irmãos Lara e Felipe, pelos bons momentos quando estamos juntos. Agradeço o modo como nossos laços se fortificam com o passar do tempo, dando a certeza de que estaremos festejando e lutando juntos, sempre. Obrigada por estarem comigo em mais essa etapa da minha vida!

Aos queridos tio Nilton e tia Raquel, que aguentaram minha falta de tempo enquanto eu fazia o doutorado. Obrigada pela compreensão e por estarem por perto!

À minha sogra Nailde, também doutora, agradeço o apoio, pois você sabe o quanto é sofrido, porém recompensador chegar a esse momento. Obrigada pela torcida! Agradeço a Deus por ter me dado pessoas tão especiais como nova família.

A toda a minha família e amigos distantes, mas que sempre perguntam e torcem por mim. Agradeço em especial à minha querida avó Ana e à minha tia Natalina, por serem pessoas tão presentes e importantes na minha vida.

Aos amigos do NUGEN, por me confortarem nos momentos difíceis, e principalmente ao Marcone, pelo incentivo à minha qualificação e pela compreensão nas trocas de horário para eu poder realizar experimentos, disciplinas e terminar o doutorado.

À minha orientadora Zulmira, que carinhosamente me recebeu em 2009, sem nem mesmo me conhecer, acreditou no meu trabalho e deixou que eu crescesse e aprendesse muitas coisas no laboratório. Obrigada pela oportunidade, pela sua paciência, confiança e por estar sempre ao meu lado.

A todos os amigos que fiz no laboratório NANOGEM: à Adriana, Ana Luísa, Flávia e Lane pela grande experiência que compartilharam e pela ajuda nos experimentos e análises; ao César, à Laise e à Mary-Ann, por todas as ajudas de modo geral; e em especial à Mariana e à Luciana, que foram grandes parceiras de experimentos, discussões e também de conversas jogadas fora. No final do doutorado, senti demais a falta de vocês. Obrigada por terem feito (e ainda fazerem) parte da minha vida de forma tão próxima!

À Ludmilla e Mayara, que me ajudaram muito nos experimentos de microscopia eletrônica e citometria de fluxo. Agradeço também as boas risadas e a convivência gostosa que a gente tinha no lab!

Aos professores Ricardo Bentes e César Grisólia, do Departamento de Genética e Morfologia, por terem me deixado à vontade para trabalhar em seus laboratórios, e aos seus alunos, por terem me disponibilizado tempo e conhecimento.

Ao professor Marcos Célio de Almeida, pela ajuda nas análises histológicas.

Ao professor Paulo Souza, por ter colocado em operação nosso equipamento de magnetohipertermia e por estar sempre à disposição para esclarecer dúvidas.

Ao professor Sebastião Silva e sua aluna Queila Ferreira, do Instituto de Física da UnB, por terem me recebido tão bem, por terem me ensinado um pouquinho de Raman e terem ajudado com os experimentos e análises.

À professora Emilia Lima e ao aluno Fernando Damasceno, por terem preparado e cedido as amostras de fluido magnético.

Aos pesquisadores da Polônia que trabalham com o Selol, por terem cedido a amostra para o nosso grupo de pesquisa.

Aos outros professores do Departamento de Genética e Morfologia, mesmo não tendo ajudado diretamente no trabalho, agradeço a convivência e experiência.

Ao Laboratório Sabin, por ter me proporcionado a oportunidade de obter os resultados de análises bioquímicas.

Às agências de fomento CAPES, FAPDF, CNPq e INCT de Nanobiotecnologia, as quais permitiram a realização deste trabalho.

## RESUMO

Nanopartículas magnéticas (NPM) representam ferramentas versáteis para a aplicação na área oncológica, uma vez que podem ser utilizadas como carreadores de medicamentos, instrumento para a magnetohipertermia (MHT) e como meio de contraste em exames de imagem. O objetivo principal deste trabalho foi investigar um novo fluido magnético, denominado FMS, que é constituído de nanopartículas de magnetita cobertas com bicamada de ácido láurico contendo Selol, um composto de baixa toxicidade e não mutagênico com importante ação antitumoral. Experimentos realizados para caracterização da amostra revelaram que FMS é composto de NPM esféricas com distribuição de tamanho monomodal, com diâmetro físico médio de 8,3 nm e com pouca variação do diâmetro hidrodinâmico ao longo do tempo. Medidas do potencial zeta ao longo do tempo evidenciaram NPM de carga negativa e extremamente estáveis por até 48 meses após seu preparo. Foi verificado, pelo ensaio de viabilidade celular por MTT, que FMS não foi tóxico para as células de melanoma da linhagem B16-F10 em concentrações até 75 µg Fe/mL. Foi mostrada também a capacidade dessas células tumorais em interiorizar as NPM, as quais foram encontradas no interior celular dentro de estruturas semelhantes a vesículas. Além disso, ensaios *in vitro* e *in vivo* foram realizados em equipamento de microtomografia computadorizada (microTC) para avaliar a capacidade de FMS ser um potencial meio de contraste neste tipo de imagem. Os testes *in vitro* revelaram que FMS possui densidade adequada para ser visualizada em imagens de microTC e os testes *in vivo* mostraram que FMS injetado diretamente no melanoma induzido nos camundongos permaneceu no tumor por até 72 h. Apesar da retenção tumoral prolongada, FMS não foi tóxico para os órgãos fígado, baço, rins, pulmões e cérebro, nem para o organismo como um todo, como visto nas análises histológicas, hematológicas e bioquímicas. Testes *in vitro* e *in vivo* demonstraram o potencial de aquecimento de FMS quando submetido a um campo magnético de frequência alternada. A amostra foi então testada para o tratamento do melanoma murino utilizando magnetohipertermia e os resultados dos pesos e volumes tumorais, percentual de necrose e exames hematológicos e bioquímicos foram promissores após 1 dia do término do tratamento. Em conjunto, os dados deste trabalho indicam que a amostra FMS apresenta grande potencial como estratégia terapêutica contra o câncer.

**Palavras-chave:** nanopartículas magnéticas, Selol, selênio, melanoma, magnetohipertermia, biocompatibilidade.

## ABSTRACT

Magnetic nanoparticles (MNP) represent versatile tools for application in the oncologic field, especially when used as drug carriers, magnetic hyperthermia inducer and contrast improvement in imaging exams. The main goal of this study was to investigate a new magnetic fluid sample, named FMS, based on magnetite nanoparticles coated with lauric acid bilayer impregnated with Selol. Selol is a low toxic and non-mutagenic compound with an important antitumoral activity. In this work, FMS was characterized and tested for its ability to be used for a contrast agent in microcomputed tomography (microCT) imaging and for melanoma treatment using magnetic hyperthermia (MHT). Characterization assays revealed that FMS was composed by spherical MNP with monomodal size distribution, with an average physical diameter of 8.3 nm, and with little hydrodynamic diameter variation along time. Stability of FMS was also tested along time through zeta potential measurements and results highlighted negative charge MNP highly stable for up to 48 months after its preparation. Nanoparticles toxicity was evaluated by MTT viability cell assay and FMS was not toxic for melanoma cell line B16-F10 in concentrations up to 75  $\mu\text{g Fe/mL}$ . It was also showed that tumoral cells are able to internalize these MNP, as they were seen in vesicle-like structures in the cytoplasm. Further, *in vitro* and *in vivo* assays were performed in microCT equipment. *In vitro* tests revealed that FMS presented elevated density in microCT imaging and *in vivo* experiments showed that after intratumoral FMS injections, MNP remains in mouse melanoma tumor site for at least 72 hours. Although prolonged tumor retention, FMS was not toxic to the organs liver, spleen, kidneys, lungs and brain, neither to the whole organism, as verified by histological, hematological and biochemical analysis. In addition, 1 mL FMS aliquot exposed to an alternating magnetic field raised its temperature to 57°C and *in vivo* experiments confirmed intratumoral FMS heating potential. So, FMS was tested for murine melanoma treatment and showed promising results related to tumor volumes, tumor weights, necrosis percentage and hematological and biochemical analysis when data were evaluated the day after the end of the treatment. In conjunction, the data obtained by this work indicate that FMS presents the antitumor activities of both Selol and MNP, thus representing a potential therapeutic strategy against cancer.

**Keywords:** magnetic nanoparticles, Selol, selenium, melanoma, magnetic hyperthermia, biocompatibility.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Organização estrutural da pele mostrando as camadas epidérmica, dérmica e hipodérmica.....	24
<b>Figura 2.</b> Modelo de progressão do melanoma proposto por Clark, em 1984.....	27
<b>Figura 3.</b> Principais vias moleculares envolvidas na formação e regulação do melanoma.....	28
<b>Figura 4.</b> Via de sinalização da beta-catenina, envolvida na progressão para o melanoma metastático.....	29
<b>Figura 5.</b> Características ABCDE para identificação de uma lesão como sendo melanoma.....	31
<b>Figura 6.</b> Richard Feynman, físico que proferiu uma palestra com as primeiras ideias e conceitos sobre nanotecnologia, em 1959.....	39
<b>Figura 7.</b> Eric Drexler, que estudou os princípios dos nanosistemas e nanomáquinas, no início dos anos 80.....	40
<b>Figura 8.</b> Alguns alótropos do carbono.....	41
<b>Figura 9.</b> Don Eigler, primeiro pesquisador a manipular os átomos utilizando o microscópio de tunelamento com varredura, em 1989.....	42
<b>Figura 10.</b> Vasto campo de aplicação da nanotecnologia.....	44
<b>Figura 11.</b> Principais nanomateriais utilizados em nanobiotecnologia.....	47
<b>Figura 12.</b> Esquematização da nanopartícula magnética, sua cobertura e as diversas possibilidades de ligantes em sua superfície.....	49
<b>Figura 13.</b> Quantum dots ou pontos quânticos, que são cristais semicondutores luminescentes com larga aplicação em técnicas de imagem.....	50
<b>Figura 14.</b> Esquema do efeito EPR que permite a entrega passiva de nanopartículas diretamente ao tumor.....	53

<b>Figura 15.</b> Magnetohipertermia no tumor gerada pelo uso de nanopartículas magnéticas quando submetidas a um campo magnético de frequência alternada.....	58
<b>Figura 16.</b> Entrega das nanopartículas magnéticas ao tumor.....	59
<b>Figura 17.</b> Estrutura do Selol.....	61
<b>Figura 18.</b> Equipamento gerador de campo magnético de frequência alternada.....	67
<b>Figura 19.</b> Equipamento de microtomografia computadorizada, modelo 1076.....	68
<b>Figura 20.</b> Esquema das nanopartículas de magnetita cobertas com bicamada de ácido láurico.....	78
<b>Figura 21.</b> Caracterização do tamanho das nanopartículas feita por microscopia eletrônica de transmissão.....	79
<b>Figura 22.</b> Fotomicrografias dos fluidos magnéticos FMS e FM por microscopia eletrônica de transmissão.....	80
<b>Figura 23.</b> Gráficos do diâmetro hidrodinâmico da amostra FMS obtidos pela técnica de espalhamento de luz dinâmico.....	81
<b>Figura 24.</b> Gráficos do diâmetro hidrodinâmico da amostra FM obtidos pela técnica de espalhamento de luz dinâmico.....	81
<b>Figura 25.</b> Análise da viabilidade das células de melanoma B16-F10 submetidas ao tratamento com FMS e FM em diferentes concentrações, por um período de 24 e 48 horas.....	83
<b>Figura 26.</b> Imagens de microscopia de luz das células B16-F10 marcadas com coloração de Perls.....	84
<b>Figura 27.</b> Fotomicrografia eletrônica de células de melanoma B16-F10 incubadas ou não com nanopartículas magnéticas.....	85
<b>Figura 28.</b> Imagens de microtomografia e quantificação da densidade obtida com as amostras FMS e FM.....	87
<b>Figura 29.</b> Imagem de microtomografia do Selol puro.....	88

<b>Figura 30.</b> Quantificação da densidade obtida com os fluidos magnéticos, Selol puro e um agente à base de iodo em imagens de microTC.....	88
<b>Figura 31.</b> Curva de aquecimento e imagens termográficas para as amostras FMS, FM e água (controle) quando colocadas no equipamento gerador de CMA a uma frequência de 624 kHz.....	90
<b>Figura 32.</b> Curvas de aquecimento e imagens termográficas para as amostras FMS, FM e água (controle) quando colocadas no equipamento gerador de CMA nas frequências de 110 e 165 kHz.....	91
<b>Figura 33.</b> Curvas de aquecimento e imagens termográficas para as amostras FMS, FM e água (controle) quando colocadas no equipamento gerador de CMA nas frequências de 330 e 467 kHz.....	92
<b>Figura 34.</b> Curvas de aquecimento para pequenos volumes da amostra FMS quando colocados no equipamento gerador de CMA na frequência de 330 kHz.....	93
<b>Figura 35.</b> Peso corporal de camundongos acompanhados durante o desenvolvimento do melanoma, após injeção subcutânea de células B16-F10.....	94
<b>Figura 36.</b> Monitoração do desenvolvimento do melanoma nos animais durante 21 dias.....	95
<b>Figura 37.</b> Análise histopatológica do melanoma murino corado com hematoxilina e eosina.....	96
<b>Figura 38.</b> Seções histológicas coradas com hematoxilina e eosina dos órgãos dos camundongos (fígado, baço, rim, pulmão e cérebro) coletados no dia 1 e dia 7 após a injeção de FMS no tumor dos animais.....	98
<b>Figura 39.</b> Fotomicrografias de melanoma murino 24 horas após a injeção da amostra FMS no tumor.....	99
<b>Figura 40.</b> Fotomicrografias de melanoma murino 24 horas após a injeção da amostra FM no tumor.....	100
<b>Figura 41.</b> Seções histológicas de fígado e pulmão de um animal 24 h após a injeção de FM e que apresentou acúmulo de nanopartículas nestes órgãos.....	101

<b>Figura 42.</b> Seções histológicas do tumor de um animal 24 h após a injeção de FM e que apresentou nanopartículas em vasos sanguíneos.....	102
<b>Figura 43.</b> Imagens de tomografia de um camundongo com melanoma em diferentes tempos da injeção do fluido magnético FMS.....	109
<b>Figura 44.</b> Quantificação ao longo do tempo para os fluidos FMS e FM injetados dentro do tumor de camundongos.....	110
<b>Figura 45.</b> Imagens tomográficas tridimensionais de um camundongo que recebeu FMS dentro do tumor.....	111
<b>Figura 46.</b> Magnetohipertermia utilizando o fluido magnético FMS.....	112
<b>Figura 47.</b> Peso corporal dos camundongos acompanhados por 1 e 7 dias após um ciclo de tratamento tumoral com magnetohipertermia.....	113
<b>Figura 48.</b> Volume tumoral dos camundongos acompanhados por 1 e 7 dias após um ciclo de tratamento do melanoma com magnetohipertermia.....	114
<b>Figura 49.</b> Peso dos tumores dos camundongos em diferentes grupos após 1 dia e 7 dias do tratamento tumoral com magnetohipertermia.....	115
<b>Figura 50.</b> Porcentagem de necrose nos tumores dos camundongos em diferentes grupos após 1 dia do tratamento tumoral com magnetohipertermia.....	115

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Estadiamento para o melanoma, segundo o sistema TNM.....	34
<b>Tabela 2.</b> Estadiamento clínico e patológico para o melanoma, segundo o sistema TNM.....	35
<b>Tabela 3.</b> Processamento para coloração com hematoxilina e eosina (HE) ou coloração com reagente de Perls.....	76
<b>Tabela 4.</b> Caracterização dos fluidos magnéticos FMS e FM feita pelo grupo da Profa. Emilia Lima.....	78
<b>Tabela 5.</b> Valores do diâmetro médio e IPD, determinados pela técnica de espalhamento de luz dinâmico, para as amostras FMS e FM ao longo do tempo e em diferentes temperaturas.....	80
<b>Tabela 6.</b> Caracterização da estabilidade dos fluidos magnéticos FMS e FM, obtida através da medida do potencial zeta ao longo do tempo e em diferentes temperaturas.....	82
<b>Tabela 7.</b> Valores de tensão (voltagem), corrente (amperagem) e campo magnético obtidos durante os ensaios <i>in vitro</i> de aquecimento de fluidos magnéticos.....	89
<b>Tabela 8.</b> Eritrograma de camundongos com melanoma realizado após 1 dia ou 7 dias da injeção intratumoral de PBS, FMS e FM.....	104
<b>Tabela 9.</b> Leucograma de camundongos com melanoma realizado após 1 dia ou 7 dias da injeção intratumoral de PBS, FMS e FM.....	105
<b>Tabela 10.</b> Plaquetograma de camundongos com melanoma realizado após 1 dia ou 7 dias da injeção intratumoral de PBS, FMS e FM.....	106
<b>Tabela 11.</b> Análises bioquímicas de camundongos com melanoma realizadas após 1 dia ou 7 dias da injeção intratumoral de PBS, FMS e FM.....	107
<b>Tabela 12.</b> Pesos corporal, do fígado, baço e rins de camundongos com melanoma que foram eutanaziados em 1 dia ou 7 dias após injeção intratumoral de PBS, FMS e FM.....	108

<b>Tabela 13.</b> Eritrograma de camundongos com melanoma realizado após 1 dia ou 7 dias do tratamento com magnetohipertermia.....	117
<b>Tabela 14.</b> Leucograma de camundongos com melanoma realizado após 1 dia ou 7 dias do tratamento com magnetohipertermia.....	118
<b>Tabela 15.</b> Plaquetograma de camundongos com melanoma realizado após 1 dia ou 7 dias do tratamento com magnetohipertermia.....	119
<b>Tabela 16.</b> Análises bioquímicas de camundongos com melanoma realizado após 1 dia ou 7 dias do tratamento com magnetohipertermia.....	120

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C – grau Celsius

μA – microampère

μL – microlitro

μm – micrômetro

A – ampère

ABCDE – assimetria, borda, cor, diâmetro, evolução

AJCC – *American Joint Committee on Cancer*: Comitê da Junta Americana sobre Câncer

Al – Alumínio

ALT – alanina aminotransferase

AST – aspartato aminotransferase

B16-F10 – linhagem de células de melanoma murino

C57BL/6 – linhagem de camundongo

CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais

CHCM – Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média

CMA – campo magnético de frequência alternada

DMSO – dimetilsulfóxido

DNA – ácido desoxirribonucleico

EDTA – ácido etilenodiamino tetra-acético

EPR – retenção e permeabilidade aumentada

Fe – ferro

FM – fluido magnético sem Selol

FMS – fluido magnético com Selol

h – hora

HCl – ácido clorídrico

HCM – Hemoglobina Corpuscular Média

HE – hematoxilina e eosina

HU – unidade de Hounsfield

ICP-AES – Espectroscopia de Emissão Atômica com Plasma Indutivamente Acoplado

IFN  $\alpha$ 2b – interferon alfa 2b

IL-2 – interleucina 2

ip – intraperitoneal

IPD – índice de polidispersividade

it – intratumoral

kHz – quilohertz

kV – quilovolts

LDH – lactato desidrogenase

MCTI – Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação

MET – microscopia eletrônica de transmissão

MHT – magnetohipertermia

microTC – microtomografia computadorizada

min – minuto

mL – mililitro

mm – milímetro

ms – milissegundo

mT – militesla

MTT – (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)

mV – milivolt

nm – nanômetro

NPM – nanopartículas magnéticas

PBS – salina tamponada com fosfato

PDW – Largura de Distribuição de Plaquetas

P-LCR – razão de macroplaquetas

PLT – plaquetas

RDW – largura de distribuição dos eritrócitos

RM – ressonância magnética

rpm – rotações por minuto

sc – subcutâneo

Se – selênio

SPECT – tomografia computadorizada de emissão de fóton único

SPION – nanopartículas de óxido de ferro superparamagnéticas

TC – tomografia computadorizada

TNM – tumor, linfonodos, metástase

V – volt

VCM – Volume Corpuscular Médio

VPM – Volume Plaquetário Médio

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	23
1.1 CÂNCER.....	23
1.1.1 Pele.....	23
1.1.2 Câncer de pele.....	25
1.1.3 Melanoma.....	26
<i>1.1.3.1 Progressão do melanoma</i> .....	26
<i>1.1.3.2 Fatores de risco para o melanoma</i> .....	29
<i>1.1.3.3 Diagnóstico do melanoma</i> .....	30
<i>1.1.3.4 Prognóstico do melanoma</i> .....	32
<i>1.1.3.5 Estadiamento do melanoma</i> .....	33
<i>1.1.3.6 Tratamento do melanoma</i> .....	35
1.2 NANOTECNOLOGIA.....	39
1.2.1 Conceito.....	39
1.2.2 História.....	39
1.2.3 Impacto econômico da Nanotecnologia.....	42
1.2.4 Características e aplicações da Nanotecnologia.....	44
1.3 NANOBIOTECNOLOGIA.....	46
1.3.1 Nanomateriais.....	47
1.3.2 Aplicações.....	49
<i>1.3.2.1 Diagnóstico</i> .....	49
<i>1.3.2.2 Tratamento</i> .....	52

1.3.3 Nanopartículas magnéticas e magnetohipertermia.....	55
1.4 COMPOSTOS DE SELÊNIO NO TRATAMENTO E PREVENÇÃO DO CÂNCER.....	59
1.4. 1 Selol.....	61
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>63</b>
2.1 OBJETIVOS GERAIS.....	63
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	63
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>65</b>
3.1 FLUIDOS MAGNÉTICOS FMS E FM.....	65
3.1.1 Preparo das amostras.....	65
3.1.2 Caracterização do tamanho das nanopartículas por Microscopia Eletrônica de Transmissão.....	66
3.1.3 Caracterização do tamanho e potencial zeta das nanopartículas no instrumento Zetasizer.....	66
3.1.4 Aquecimento dos fluidos magnéticos no campo magnético alternado..	67
3.1.5 Microtomografia computadorizada.....	68
3.2 EXPERIMENTOS <i>IN VITRO</i> .....	69
3.2.1 Linhagem celular de melanoma B16-F10.....	69
3.2.2 Viabilidade celular por MTT.....	69
3.2.3 Detecção de nanopartículas de ferro por Coloração de Perls.....	70
3.2.4 Interiorização celular das nanopartículas magnéticas por MET.....	71
3.3 EXPERIMENTOS <i>IN VIVO</i> .....	72
3.3.1 Animais.....	72

3.3.2	Indução de melanoma nos animais.....	72
3.3.3	Microtomografia computadorizada.....	73
3.3.4	Ensaio de biocompatibilidade – toxicidade aguda.....	73
3.3.5	Magnetohipertermia.....	74
3.4	PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO.....	75
3.5	ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	76
<b>4</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>78</b>
4.1	CARACTERIZAÇÃO PRÉVIA DOS FLUIDOS MAGNÉTICOS.....	78
4.2	CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE FMS E FM.....	79
4.2.1	Diâmetro físico e forma das nanopartículas.....	79
4.2.2	Diâmetro hidrodinâmico e potencial zeta das nanopartículas.....	80
4.3	AValiação da citotoxicidade dos fluidos FMS e FM.....	82
4.4	INTERIORIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS.....	83
4.5	NANOPARTÍCULAS COMO CONTRASTE PARA MICROTOMOGRÁFIA COMPUTADORIZADA.....	86
4.6	AQUECIMENTO DAS AMOSTRAS NO CAMPO MAGNÉTICO DE FREQUÊNCIA ALTERNADA.....	89
4.7	ENSAIOS <i>IN VIVO</i> .....	93
4.7.1	Estudo do modelo animal de melanoma.....	93
4.7.2	Biocompatibilidade dos fluidos magnéticos.....	97
4.7.3	Biodistribuição de FMS no tumor.....	108
4.7.4	Magnetohipertermia.....	111
4.7.5	Tratamento do melanoma.....	112

<b>5 DISCUSSÃO.....</b>	<b>121</b>
<b>6 CONCLUSÕES.....</b>	<b>140</b>
<b>7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>142</b>
<b>ANEXO.....</b>	<b>160</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 CÂNCER

O câncer é uma doença que surge como resultado de uma divisão descontrolada de células que são capazes de invadir tecidos e órgãos. As células cancerosas dividem-se rapidamente e acumulam-se, formando os tumores malignos ou neoplasias malignas. Essas células tendem a ser agressivas e podem espalhar-se para outras regiões do corpo, caracterizando a metástase – principal causa de morte por câncer (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2013).

Por outro lado, um crescimento celular desordenado também ocorre no tumor benigno. Mas essa neoplasia benigna significa simplesmente uma massa localizada de células que se multiplicam vagarosamente e se assemelham ao seu tecido original, mas não são capazes de formar metástases. Os tumores benignos, portanto, raramente constituem um risco de vida (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER, 2013).

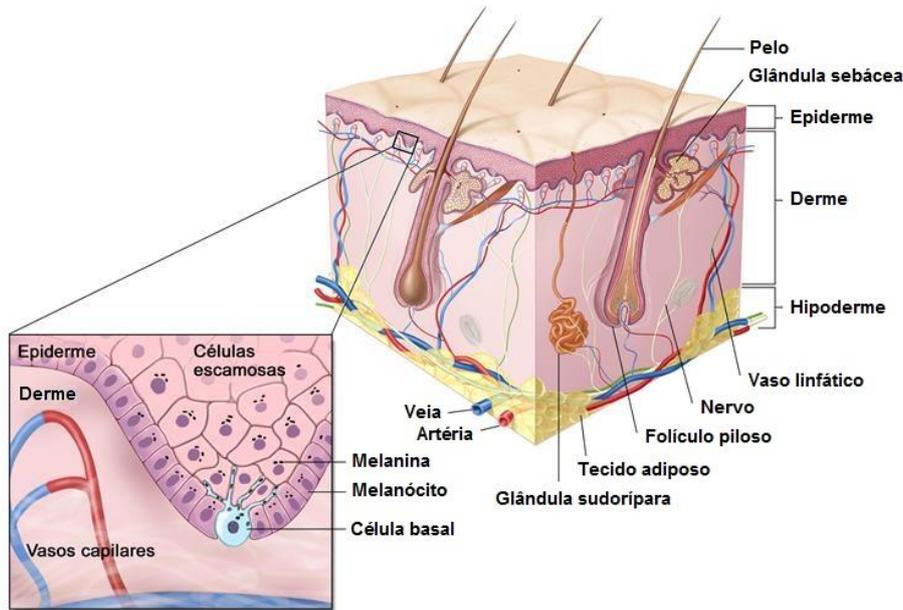
O levantamento mais completo sobre o ônus global do câncer no mundo é feito pela Agência Internacional para Pesquisa em Câncer (*International Agency for Research on Cancer – IARC*), da Organização Mundial de Saúde. A versão mais recente desse levantamento mostrou a ocorrência de quase 13 milhões de novos casos de câncer e 7,6 milhões de mortes pela doença para o ano de 2008. Para 2020, a estimativa é de 17 milhões de casos incidentes e 10 milhões de mortes por câncer (GLOBOCAN, 2008).

O câncer pode afetar qualquer parte do corpo e os diferentes tipos de câncer correspondem aos vários tipos de células do organismo.

### 1.1.1 Pele

Suscetível a vários tipos de câncer, a pele, o maior órgão do corpo, tem como principais funções proteger o organismo contra infecções e lesões, ajudar a regular a temperatura corporal, produzir vitamina D, controlar a perda de líquidos e proteger o corpo da radiação ultravioleta (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2013).

Estruturalmente, a pele consiste em três partes principais: epiderme, derme e hipoderme (Figura 1).



**Figura 1.** Organização estrutural da pele mostrando as camadas epidérmica, dérmica e hipodérmica.

A epiderme é a camada mais fina e superficial da pele, que protege do meio ambiente as camadas mais profundas e os outros tecidos e órgãos do corpo. É constituída de tecido epitelial e seu principal tipo celular é o queratinócito, o qual produz a queratina, que é uma proteína fibrosa, resistente e impermeável responsável pela proteção da pele e dos tecidos subjacentes contra a abrasão, o calor, microrganismos e substâncias químicas. O segundo tipo de célula epidérmica mais comum é o melanócito, que produz o pigmento melanina, o qual contribui para a cor da pele e tem a função de protegê-la contra a radiação ultravioleta. Embora os queratinócitos recebam proteção dos grânulos de melanina, os próprios melanócitos são particularmente suscetíveis aos danos causados pela luz ultravioleta. Outras células presentes na epiderme participam de respostas imunes contra antígenos que invadem a pele (células de Langerhans) ou ficam em contato com neurônios sensoriais e ajudam a detectar as sensações de toque na pele (células de Merkel). A epiderme é composta de quatro estratos: córneo, granuloso, espinhoso e basal. A camada córnea é a camada mais externa da epiderme, constituída basicamente de queratina e com constante renovação celular, e a camada basal é a camada mais profunda e em contato com a derme (TORTORA; DERRICKSON, 2012).

A derme, camada mais espessa da pele, é formada principalmente por tecido conjuntivo contendo fibras colágenas e elásticas, o que torna esta camada responsável

pela resistência e elasticidade da pele. A derme contém os folículos pilosos, as glândulas sudoríparas, os vasos sanguíneos e nervos. Essa camada contém grande quantidade de colágeno, produzida pelos fibroblastos e que fornecem a resiliência e resistência da pele.

A hipoderme, camada mais profunda da pele, é composta por tecido conjuntivo que envolve os adipócitos. O tecido subcutâneo é o local de armazenamento de gordura e contém grandes vasos sanguíneos que irrigam a pele. A função dessa camada é conservar o calor do corpo e absorver possíveis choques, fornecendo proteção contra traumas físicos.

### **1.1.2 Câncer de pele**

O câncer de pele é a neoplasia maligna mais comum no mundo e representa mais da metade dos diagnósticos de câncer. Há dois tipos de câncer de pele: os melanomas e os não melanomas.

O câncer de pele não melanoma é o tumor mais incidente no Brasil e no mundo, e acomete mais as populações de pele clara. Geralmente, são tumores de crescimento lento, localmente invasivos e raramente resultam em metástases. É uma neoplasia de bom prognóstico, com alta taxa de cura se tratado de forma adequada e oportuna. No entanto, em alguns casos em que há demora no diagnóstico, esse câncer pode levar a ulcerações e deformidades físicas severas.

O câncer de pele não melanoma compreende vários tipos, mas os mais comuns são o carcinoma de células basais (basocelular) e o carcinoma de células escamosas (espinocelular).

O carcinoma basocelular tem origem nas células basais da epiderme e é o mais comum entre eles, representando 70% dos casos. Esses tumores se desenvolvem lentamente, dificilmente se espalham para outras áreas do corpo, raramente são letais e são mais frequentes em partes do corpo comumente expostas ao sol, como rosto, pescoço, orelhas e antebraço. A exposição excessiva, repetida e a longo prazo à radiação ultravioleta é o principal fator de risco para essas neoplasias (DUBAS; INGRAFFEA, 2013; NETSCHER et al., 2011).

O carcinoma espinocelular tem origem na camada mais externa da epiderme, na camada córnea. Esses tumores geralmente aparecem no rosto, orelhas, lábios, pescoço e no dorso da mão, mas também podem aparecer nos órgãos genitais. Possuem um risco

maior que o carcinoma basocelular de invadir tecidos adjacentes, como o tecido adiposo e linfonodos (DUBAS; INGRAFFEA, 2013; NETSCHER et al., 2011).

Há outros tipos de câncer de pele não melanoma, mas são bem mais raros e representam apenas 1% do total (DUBAS; INGRAFFEA, 2013).

O tratamento dos tumores de pele não melanoma geralmente é cirúrgico, seguido por terapias adjuvantes, quando indicado (SAMARASINGHE; MADAN, 2012).

### **1.1.3 Melanoma**

O melanoma é um tumor maligno formado a partir dos melanócitos, que são células localizadas na camada basal da epiderme e na superfície de mucosas, responsáveis pela produção do pigmento melanina.

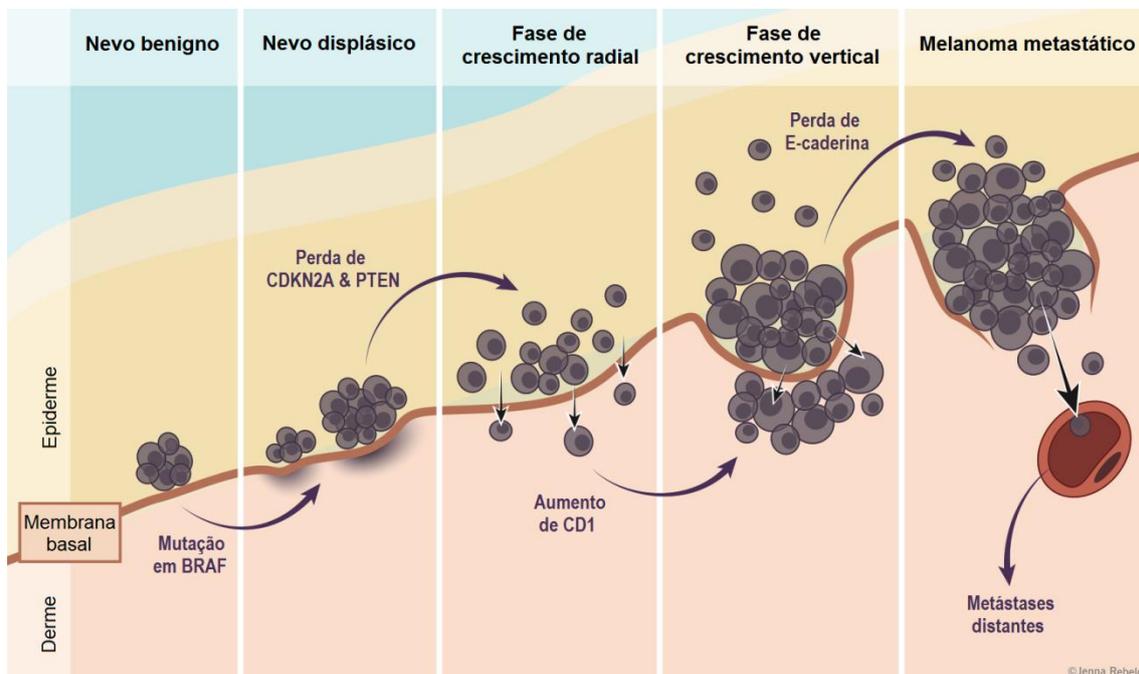
Embora represente apenas 5% dos tumores cutâneos, o melanoma é responsável por 80 a 85% dos óbitos por câncer de pele (MENDES, 2010). O principal motivo da elevada taxa de mortalidade é que o melanoma possui grande potencial de disseminação, sendo os linfonodos, cérebro, fígado e pulmão os principais sítios acometidos por metástases.

#### ***1.1.3.1 Progressão do melanoma***

O entendimento de como o melanoma se inicia e de como ele progride é essencial para se estabelecer as formas de prevenção da doença e desenvolver novas terapias. Atualmente, o modelo de progressão do melanoma mais aceito é o proposto por Clark (1984). Neste modelo, ele descreve um sistema de classificação para o melanoma de acordo com o nível de invasão nas camadas da pele, considerando a proliferação de melanócitos no processo de formação do nevo e o subsequente desenvolvimento das seguintes características: displasia, hiperplasia, invasão e metástase (Figura 2).

De acordo com Clark (1984), a primeira mudança fenotípica que acontece nos melanócitos é o desenvolvimento do nevo benigno, uma lesão de bordas regulares, composta pelo acúmulo de melanócitos na camada basal da epiderme. O crescimento do nevo benigno é limitado e raramente progride para um câncer. Mas mutações em alguns genes podem levar à desregulação no ciclo celular dessas lesões, dando início ao processo de carcinogênese (KHAN et al., 2011). Os dois principais genes envolvidos

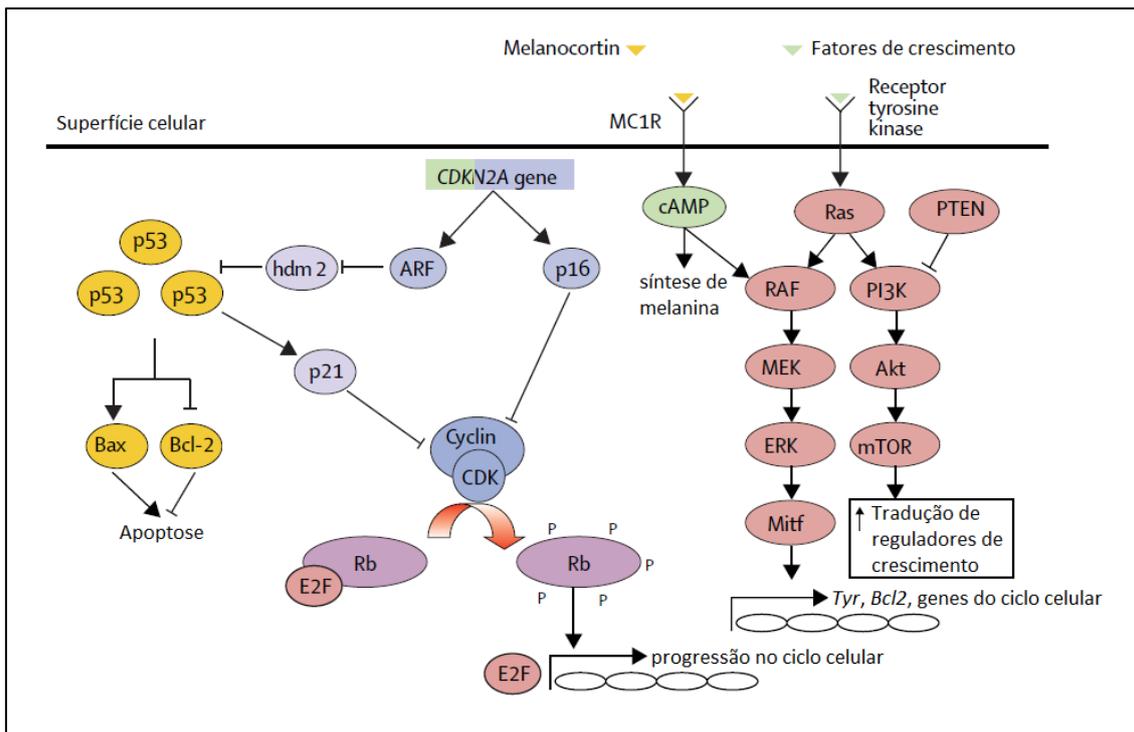
nessa etapa inicial são o NRAS (homólogo do oncogene RAS viral de neuroblastoma - *Neuroblastoma RAS viral oncogene homolog*) e o BRAF (homólogo B1 do oncogene v-raf murino de sarcoma viral - *v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1*). A maioria dos estudos mais recentes mostra que a frequência da mutação em NRAS nos melanomas humanos é de 10 a 20%, enquanto que para BRAF as estimativas variam entre 30 a 70%, sugerindo que aproximadamente 50% dos melanomas carregam mutação nesse gene. Sabe-se que esses genes causam ativação da via de sinalização ERK/MAPK (cinase regulada por sinal extracelular/proteína cinase ativada por mitógeno - *extracellular signal-regulated kinase/mitogen-activated protein kinase*) e já foi demonstrado que uma ativação anormal dessa via estimula o crescimento nas células do melanoma (OMHOLT et al., 2003).



**Figura 2.** Modelo de progressão do melanoma proposto por Clark, em 1984. (Figura retirada de *McMaster Pathophysiology Review*, 2013).

Com o crescimento celular estimulado, o próximo evento biológico que contribui para a progressão do tumor é o desenvolvimento de atipias citológicas, o que caracteriza o nevo displásico. Nevos displásicos são lesões pré-malignas que podem surgir como novas lesões ou a partir de um nevo benigno pré-existente. São lesões que podem regredir, mas novas mutações nessa fase levam à diminuição da diferenciação e hiperplasia. As principais mudanças moleculares nos nevos displásicos ocorrem no gene CDKN2A (inibidor 2A de cinase dependente de ciclina - *cyclin-dependent kinase*

*inhibitor 2A*) e no gene supressor de tumor PTEN (homólogo da fosfatase e tensina - *phosphatase and tensin homolog*). Mutações tornam esses genes inativados e, de um modo geral, essas perdas contribuem para a proliferação e sobrevivência de células danificadas. O gene CDKN2A codifica duas proteínas supressoras de tumor (p14<sup>ARF</sup> e p16<sup>INK4A</sup>) e a sua inativação provoca a ausência desses produtos. A ausência de p16<sup>INK4A</sup> permite a fosforilação de pRB (proteína retinoblastoma) e liberação do fator de transcrição E2F, o que promove a transição G1-S do ciclo celular. A ausência de p14<sup>ARF</sup> direciona a proteína p53 para degradação e a perda desse supressor de tumor prejudica mecanismos de reparo, que normalmente levam células alteradas a terem uma parada no ciclo celular ou até mesmo apoptose. A proteína PTEN age atenuando a via de sinalização de AKT, ativada por fatores de crescimento. A perda de PTEN evidenciada nos melanomas permite, portanto, a progressão dessa cascata de sinalização, culminando em crescimento e sobrevivência celular (Figura 3).

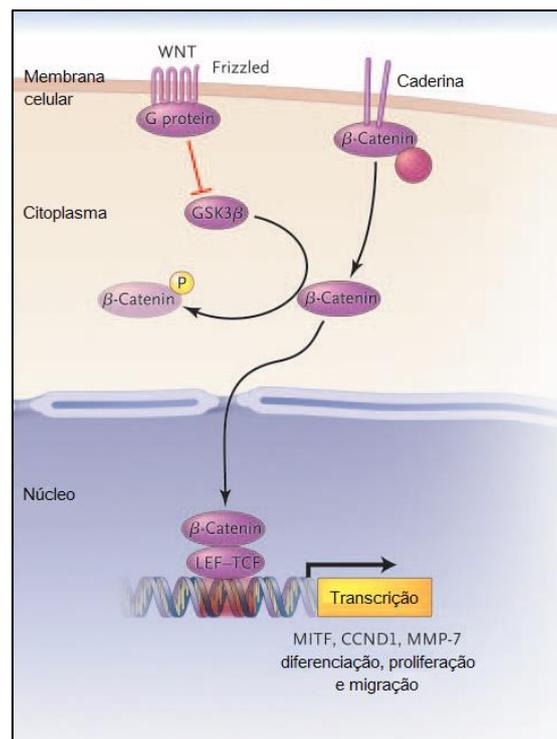


**Figura 3.** Principais vias moleculares envolvidas na formação e regulação do melanoma (THOMPSON; SCOLYER; KEFFORD, 2005).

O próximo estágio, denominado fase de crescimento radial, é caracterizado pela hiperplasia. A constante ativação da via de sinalização ERK/MAPK promove o aumento da transcrição de muitos genes, entre eles o CD1 (SHTUTMAN et al., 1999).

No modelo de Clark, características invasivas aparecem somente na fase de crescimento vertical, quando as células do melanoma penetram a membrana basal e crescem de modo intradérmico como um nódulo expansivo.

O melanoma metastático se desenvolve quando as células tumorais se dissociam da lesão primária, migram através do estroma e invadem vasos sanguíneos e linfáticos para formar um tumor em sítios distantes. A invasão e o espalhamento do melanoma estão relacionados a alterações na adesão celular. A progressão da fase de crescimento vertical para o melanoma metastático é marcada pela perda de E-caderina e a expressão de N-caderina. A diminuição da expressão de E-caderina e a expressão aumentada de N-caderina aumenta a sobrevivência das células do melanoma através do estímulo da via de sinalização de beta-catenina, que por sua vez leva à transcrição de fatores relacionados com a diferenciação, proliferação e migração (Figura 4) (QI et al., 2005; SHTUTMAN et al., 1999; WIDLUND et al., 2002).



**Figura 4.** Via de sinalização da beta-catenina, envolvida na progressão para o melanoma metastático (MILLER; MIHM, 2006).

### 1.1.3.2 Fatores de risco para o melanoma

Os principais fatores de risco para a carcinogênese do melanoma incluem fatores ambientais como a exposição excessiva à radiação ultravioleta e também fatores

genéticos como a sensibilidade da pele ao sol e história pessoal ou familiar de câncer de pele.

A exposição solar é sem dúvida o fator ambiental que está mais envolvido com a causa do melanoma (KANAVY; GERSTENBLITH, 2011). Sabe-se que a exposição intermitente e elevada aos raios solares ultravioletas leva a um risco maior de desenvolver a doença. Alguns estudos epidemiológicos apontam, ainda, uma maior susceptibilidade das crianças ao efeito carcinogênico da luz solar.

Em relação aos fatores intrínsecos das pessoas, aquelas que apresentam características fenotípicas de sensibilidade ao sol, ou seja, aquelas pessoas que possuem sensibilidade a ter queimaduras e não bronzeamento, pessoas de pele clara, olhos azuis, que possuem sardas e cabelos loiros ou ruivos têm um risco aumentado de desenvolver o melanoma (DUNKI-JACOBS et al., 2013; THOMPSON; SCOLYER; KEFFORD, 2005). Pessoas de pele clara têm uma incidência de melanoma de 10 a 20 vezes maior do que pessoas de pele escura (DUMMER et al., 2011).

Indivíduos com história de queimaduras de sol ou câncer de pele também aumentam o risco de melanoma. Um histórico familiar positivo para melanoma também representa um fator de risco substancial e o principal gene associado com essa predisposição é o gene CDKN2A (ALSTON; BREWER, 2013; THOMPSON; SCOLYER; KEFFORD, 2005).

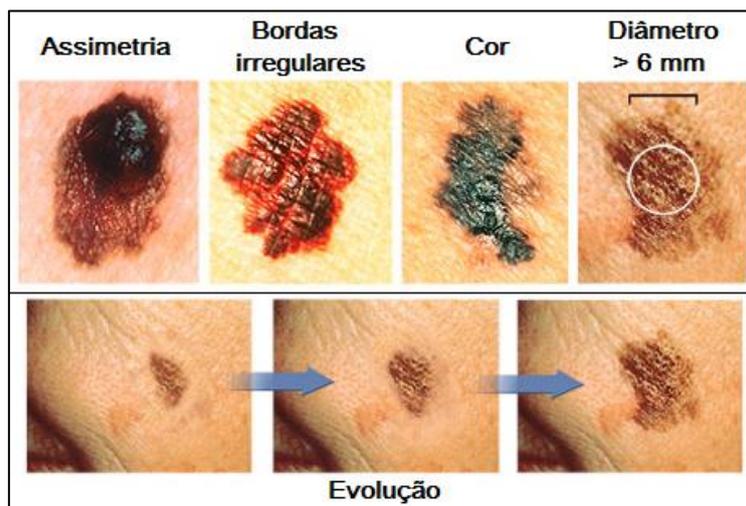
Elevado número de nevos na pele é o fator independente de risco mais importante para o melanoma, principalmente em populações de pele clara (RUSSAK; RIGEL, 2012).

Outros fatores também estão associados com o risco de melanoma, como bronzeamento artificial, sexo (maior incidência em homens), idade (incidência elevada acima de 50 anos) e condição socioeconômica (mais incidente em pessoas de renda maior) (DUNKI-JACOBS et al., 2013; RUSSAK; RIGEL, 2012).

### ***1.1.3.3 Diagnóstico do melanoma***

O melanoma possui alto potencial de cura se diagnosticado em estágios iniciais. Por isso, é essencial que os pacientes sejam avaliados clinicamente pelos médicos dermatologistas para o câncer de pele. Além disso, a auto-examinação também é importante para tentar identificar lesões com potencial maligno e relatar ao médico para uma avaliação mais precisa.

O diagnóstico inicial do melanoma é justamente baseado no exame físico, na observação de lesões e pintas na pele que possuem as características definidas como ABCDE do melanoma (Figura 5). Lesões assimétricas, com bordas irregulares, que possuem variações de cor, com diâmetro maior que 6 mm e que possuem evolução ou mudança ao longo do tempo são lesões que preenchem os requisitos ABCDE para o melanoma e devem ser avaliadas por um dermatologista.



**Figura 5.** Características ABCDE para identificação de uma lesão como sendo melanoma.

No entanto, alguns melanomas não exibem essas características clássicas (existem lesões amelanóticas e que se manifestam na cor rosa ou vermelha), portanto, deve haver suspeita clínica em qualquer mudança significativa em um nevo ou lesão de pele pré-existente (em tamanho, cor, forma), se a lesão coçar ou ainda se tiver um histórico de sangramento. Além disso, novas lesões pigmentadas que surgem após os 40 anos de idade também devem ser avaliadas (COUNCIL, 2013).

Ao exame clínico o diagnóstico do melanoma se torna mais acurado quando os especialistas utilizam o dermatoscópio. A dermatoscopia é uma técnica que utiliza magnificação e luz polarizada para examinar a lesão de um paciente para procurar por características de um processo benigno ou maligno. É uma técnica que ajuda muito na avaliação de novas lesões ou mudanças em lesões pigmentadas, mas não substitui o padrão do diagnóstico para o melanoma, que é feito pelo exame histopatológico através da biópsia (THOMPSON; SCOLYER; KEFFORD, 2005).

A análise histopatológica da biópsia fornece detalhes importantes como a espessura do tumor e outras características desfavoráveis como ulceração e alta taxa de

mitoses. Existem três tipos básicos de biópsia da pele: excisional, incisional e por raspagem. A biópsia excisional é feita com anestesia local e remove completamente a lesão, deixando uma margem cirúrgica. Este é o método mais prudente para se obter o diagnóstico de lesões pequenas. A profundidade da biópsia deve se estender através da derme e deve incluir um pouco de gordura subcutânea. Na biópsia incisional, a profundidade é a mesma, porém não remove a lesão inteira, apenas uma parte do tecido que seria suficiente para o diagnóstico. Esse tipo de biópsia é mais apropriada para lesões extensas. A forma mais simples de realizar a biópsia incisional é através de perfuração utilizando um instrumento que remove um cilindro de derme e tecido subcutâneo de pelo menos 4 mm de diâmetro, o que permite uma avaliação patológica mais precisa, já que pedaços menores não fornecem tecido adequado para as análises. A biópsia por raspagem retira apenas uma parte da lesão em relação à profundidade. Pode ser um método efetivo para diagnosticar câncer de pele não melanoma, mas para o melanoma pode haver um diagnóstico inadequado devido ao não acesso à profundidade da pele. Mesmo se um diagnóstico de melanoma for estabelecido, o não acesso à profundidade de invasão pode ter implicações no tratamento do paciente. No entanto, esse tipo de biópsia é muito utilizada por ser um método rápido, simples e não necessitar de suturas para o fechamento do corte (COUNCIL, 2013; DUNKI-JACOBS et al., 2013).

#### ***1.1.3.4 Prognóstico do melanoma***

Apesar de ser um dos tumores cutâneos mais severos, o melanoma é uma neoplasia de bom prognóstico quando diagnosticada precocemente. No mundo, a sobrevida média estimada em cinco anos para tumores localizados é de mais de 90% (BONFÁ, et al., 2011; KHAN et al., 2011).

O prognóstico para um paciente diagnosticado com melanoma depende principalmente de dois fatores: a espessura do tumor primário e a presença ou ausência de metástases para os linfonodos regionais. No entanto, outros fatores também importantes podem piorar o prognóstico do paciente, como achados histológicos de ulceração do tumor, elevado índice mitótico das células tumorais, o aumento da idade, o sexo masculino e a localização do tumor no tronco, cabeça ou pescoço (CHUDNOVSKY et al., 2005; THOMPSON; SCOLYER; KEFFORD, 2005).

Os níveis de Clark descritos no item 1.1.3.1 também se correlacionam significativamente com a sobrevida total dos pacientes (DUNKI-JACOBS et al., 2013).

O prognóstico está diretamente relacionado com o estágio do câncer. Pacientes com estágio IA possuem uma taxa de 97% de sobrevida livre de doença de 5 anos, enquanto pacientes em estágio IIIC baixam essa taxa para 38% (COUNCIL, 2013).

#### ***1.1.3.5 Estadiamento do melanoma***

O principal propósito de um sistema de estadiamento para o câncer é acessar o risco de um paciente antes de se determinar o tratamento apropriado a ele.

Desde o início dos anos 80, o Comitê da Junta Americana sobre Câncer (*American Joint Committee on Cancer – AJCC*) e a União Internacional para Controle do Câncer (*Union for International Cancer Control – UICC*) colaboram para a classificação de diversos tumores e que hoje resultam em definições e agrupamentos do câncer de uma maneira uniforme para todos os sítios anatômicos, disponibilizando, assim, um sistema universal de classificação. Essa classificação é feita de acordo com os fatores prognósticos. A grande vantagem da classificação e estadiamento do câncer é permitir ao médico estratificar os pacientes e conduzir melhores decisões para o tratamento e também desenvolver uma linguagem comum que auxiliará na criação de testes clínicos para delinear futuras estratégias para o tratamento de câncer (AMERICAN JOINT COMMITTEE ON CANCER, 2002).

Um sistema de estadiamento para o melanoma só foi introduzido em 2002 e segue o sistema TNM (tumor, linfonodos e metástase) adotado para outros tumores. A classificação TNM descreve a extensão de comprometimento do câncer de uma pessoa. O sistema T refere-se ao tamanho do tumor primário e se ele invadiu tecidos adjacentes, o sistema N refere-se aos linfonodos regionais que estão comprometidos com a doença e o sistema M refere-se à presença ou não de metástases.

Uma versão revisada do estadiamento do melanoma, baseado em uma análise de mais de 30 mil pacientes, foi recentemente publicada e está descrita na Tabela 1 (AMERICAN JOINT COMMITTEE ON CANCER, 2009).

**Tabela 1.** Estadiamento para o melanoma, segundo o sistema TNM.

<b>Categoria T</b>	<b>Definição</b>	<b>Status de ulceração ou mitoses</b>
TX	Tumor primário não determinado	ND
T0	Sem evidência de tumor primário	ND
Tis	Melanoma in situ	ND
T1	Melanomas $\leq 1,00$ mm	a: sem ulceração e mitose $< 1/ \text{mm}^2$ b: sem ulceração e mitoses $\geq 1/ \text{mm}^2$
T2	Melanomas de 1,01 a 2,00 mm	a: sem ulceração b: com ulceração
T3	Melanomas de 2,01 a 4,00 mm	a: sem ulceração b: com ulceração
T4	Melanomas $> 4,00$ mm	a: sem ulceração b: com ulceração

<b>Categoria N</b>	<b>Definição</b>	<b>Metástase no linfonodo</b>
NX	Linfonodos regionais não determinados	ND
N0	Sem metástase regional	ND
N1	1 linfonodo metastático	a: micrometástases b: macrometástases
N2	2 a 3 linfonodos metastáticos	a: micrometástases b: macrometástases c: metástases em trânsito ou satélites sem linfonodos metastáticos
N3	4 ou mais linfonodos metastáticos ou linfonodos matted ou metástases em trânsito ou satélites com linfonodos metastáticos	

<b>Categoria M</b>	<b>Definição</b>	<b>LDH sérico</b>
M0	Sem evidência de metástases distantes	ND
M1a	Metástases distantes para pele, tecido subcutâneo ou linfonodos	Normal
M1b	Metástases para o pulmão	Normal
M1c	Todas as outras metástases viscerais Qualquer metástase distante	Normal Elevado

A ulceração no melanoma é a ausência de um epitélio intacto cobrindo o tumor primário, acessado por exames histopatológicos. Níveis elevados de LDH (lactato desidrogenase) no soro devem ser utilizados somente quando há duas ou mais determinações obtidas com mais de 24 h entre elas.

Existem dois tipos de estadiamento para o melanoma: o clínico e o patológico (Tabela 2). A diferença entre eles é que no estadiamento clínico os linfonodos regionais são classificados de acordo com exames clínicos e radiológicos, e no estadiamento patológico os linfonodos são acessados após exames patológicos realizados após linfadenectomia parcial ou completa (AMERICAN JOINT COMMITTEE ON CANCER, 2002).

**Tabela 2.** Estadiamento clínico e patológico para o melanoma, segundo o sistema TNM.

Estágio Anatômico e Grupos de Prognóstico para o Melanoma Cutâneo							
Estadiamento Clínico				Estadiamento Patológico			
Estágio 0	Tis	N0	M0	0	Tis	N0	M0
Estágio IA	T1a	N0	M0	IA	T1a	N0	M0
Estágio IB	T1b	N0	M0	IB	T1b	N0	M0
	T2a	N0	M0		T2a	N0	M0
Estágio IIA	T2b	N0	M0	IIA	T2b	N0	M0
	T3a	N0	M0		T3a	N0	M0
Estágio IIB	T3b	N0	M0	IIB	T3b	N0	M0
	T4a	N0	M0		T4a	N0	M0
Estágio IIC	T4b	N0	M0	IIC	T4b	N0	M0
Estágio III	Qualquer T	≥ N1	M0	IIIA	T1-4a	N1a	M0
					T1-4a	N2a	M0
				IIIB	T1-4b	N1a	M0
					T1-4b	N2a	M0
					T1-4a	N1b	M0
					T1-4a	N2b	M0
				IIIC	T1-4a	N2c	M0
					T1-4b	N1b	M0
					T1-4b	N2b	M0
					T1-4b	N2c	M0
	Qualquer T	N3	M0				
Estágio IV	Qualquer T	Qualquer N	M1	IV	Qualquer T	Qualquer N	M1

### 1.1.3.6 Tratamento do melanoma

O tratamento do melanoma varia de acordo com a profundidade do tumor primário. A cirurgia é a forma de tratamento mais indicada para a maior parte dos casos de melanoma (TESTORI et al., 2009). O padrão cirúrgico envolve a retirada da lesão com uma margem cirúrgica, ou seja, a incisão deve não só retirar a lesão tumoral, mas também uma margem de pele e tecido subcutâneo ao redor do tumor. O objetivo é que

essa margem dê resultados negativos para a doença na avaliação histopatológica final, evitando recorrências do câncer. Muitos estudos clínicos vêm avaliando a largura adequada para essa margem cirúrgica e o consenso é que a largura da margem deve variar em função da espessura do tumor primário. Para o melanoma *in situ*, recomenda-se uma margem de 0,5 cm; lesões menores ou iguais a 1 mm de espessura são retiradas com uma margem de 1 cm; e lesões maiores que 1 mm de espessura são retiradas com margens de 2 cm (COUNCIL, 2013).

Além da cirurgia, é aconselhável que pacientes que possuem melanoma maior que 1 mm de espessura considerem a opção de realizar a biópsia do linfonodo sentinela no momento da cirurgia. Essa biópsia é o método padrão para o estadiamento dos linfonodos regionais. O linfonodo sentinela é o primeiro a receber a drenagem linfática do sítio do tumor primário e, conseqüentemente, é também o primeiro a receber as células tumorais metastáticas. Atualmente, o achado de doença micrometastática na biópsia do linfonodo sentinela é uma indicação para realização de linfadenectomia completa. Apesar da morbidade do procedimento, essa técnica promove um excelente controle da doença regional (DUNKI-JACOBS et al., 2013).

Para melanomas menores que 1 mm de espessura, geralmente são considerados outros fatores prognósticos para a tomada de decisão de se realizar ou não a biópsia do linfonodo sentinela. Se houver presença de ulceração ou elevada taxa de mitose no diagnóstico do melanoma, é recomendável a realização da biópsia do linfonodo sentinela. Ou seja, de acordo com a atual estadiamento para o melanoma (Tabela 1), a biópsia é recomendável para tumores T1b.

A radioterapia e quimioterapia podem ser utilizadas para tratar o melanoma, dependendo do estágio e localização do tumor (KHAN et al., 2011; MORENO-RAMÍREZ et al., 2009). A radioterapia é pouco utilizada porque os melanomas são conhecidos por sua resistência à irradiação. Essa terapia tem sido mais utilizada em melanomas de alto risco de cabeça e pescoço, onde o risco de recorrência local é maior do que o melanoma em outros sítios. A radioterapia também é o tratamento de escolha para o cuidado paliativo de metástases cerebrais múltiplas e para metástases ósseas irresecáveis (THOMPSON; SCOLYER; KEFFORD, 2005).

Para o tratamento de tumores que se encontram no estágio III, tem sido utilizado o interferon alfa-2b (IFN  $\alpha$ 2b) em altas doses. O IFN  $\alpha$ 2b é a única terapia adjuvante aprovada pela agência americana de Administração de Alimentos e Medicamentos (*Food and Drug Administration – FDA*).

Os sítios mais comuns de metástase do melanoma são o cérebro, pulmão e fígado. De modo menos comum, o melanoma pode metastatizar para a pele e linfonodos distantes, ossos, glândulas adrenais ou trato gastrointestinal. A terapia indicada para pacientes que possuem melanoma no estágio IV é a cirurgia. Se a doença for irressecável, a terapia sistêmica ou o cuidado paliativo devem ser considerados. A quimioterapia é pouco utilizada e os principais compostos são utilizados na terapia sistêmica para o melanoma metastático. São drogas de simples aplicação e baixa toxicidade, mas possuem taxas de resposta de no máximo 24%. Dois agentes quimioterápicos são utilizados normalmente para o tratamento do melanoma: dacarbazine ou interleucina 2 (IL-2).

Muito se tem estudado acerca da biologia molecular do melanoma, sobre suas vias de sinalização e o papel da imunidade celular sobre a tumorigênese da pele. Este conhecimento tem resultado no desenvolvimento de terapias promissoras que utilizam como alvo moléculas envolvidas nas vias de sinalização para a progressão do melanoma (BIS; TSAO, 2013). Como exemplo dessas novas terapias, pode-se citar a imunoterapia que interfere no receptor de linfócitos CTLA-4, a terapia antisense com a molécula anti-apoptótica Bcl-2 (que é superexpressa em muitos melanomas), a utilização de drogas antiangiogênicas (KASPER et al., 2007) e terapias baseadas na inibição de tirosina cinase e da via MEK-ERK (KUDCHADKAR et al., 2013).

Outra modalidade de tratamento que também pode ser utilizada para o melanoma é a hipertermia, que consiste na destruição de células tumorais por meio do aumento da temperatura da região afetada para 41 a 44°C (VAN DER ZEE, 2002). A explicação para o tratamento do câncer com aumento de temperatura é que, geralmente, um aquecimento em torno de 45°C provoca danos às proteínas e às membranas celulares somente das células tumorais, por elas serem mais suscetíveis à hipertermia do que as células sadias (BALIVADA et al., 2010). A maior sensibilidade das células tumorais a temperaturas elevadas pode ser explicada principalmente pela desorganização vascular do tumor, o que inviabiliza a dissipação de calor através da corrente sanguínea. Além disso, o tratamento com temperaturas entre 40 e 45°C é citotóxico para células que se encontram em ambiente com baixa  $pO_2$  e pH, condições normalmente encontradas no tumor onde o aporte sanguíneo é insuficiente (MATSUMINE et al., 2011). Adicionalmente, alguns experimentos já revelaram que a hipertermia pode aumentar a imunogenicidade do tumor por meio da estimulação das células apresentadoras de antígenos pelas proteínas de choque térmico que são liberadas

pelas células tumorais lisadas (BARONZIO; GRAMAGLIA, FIORENTINI, 2009; ITO; HONDA; KOBAYASHI, 2006; VAN DER ZEE, 2002; YANASE et al., 1998b). Dependendo da temperatura aplicada e da duração do aquecimento, a hipertermia tanto pode resultar na morte direta das células tumorais quanto pode torná-las mais sensíveis a outras terapias (HORSMAN; OVERGAARD, 2007; HUANG, C. et al., 2011). Muitos trabalhos já mostraram que quando a hipertermia é aplicada conjuntamente com a radioterapia e quimioterapia, parece haver um aumento da sobrevida dos pacientes e menor taxa de recorrência da doença em casos avançados de câncer (BISCHOFF et al., 2006; GINGRICH, 2011; KANG; KIM, M.; KIM, J., 2011; LAMMERS et al., 2011).

Para o melanoma, a hipertermia é mais comumente utilizada de modo combinado com a quimioterapia ou com a radioterapia. Com a quimioterapia, a hipertermia é principalmente aplicada de modo regional, com perfusão do membro afetado (VAN DER ZEE, 2002). Em combinação com a radioterapia, ela geralmente é aplicada com um sistema guiado por ondas (GONZALEZ GONZALEZ et al., 1986; HULSHOF et al., 2010). Esse tratamento alternativo de combinação de hipertermia com radioterapia pode ser utilizado em casos inoperáveis da doença, como por exemplo, no trabalho mostrado por Hulshof (2010) para dois casos de melanoma do esôfago. O tratamento combinado de radiação com hipertermia também já foi utilizado para o melanoma metastático e mostrou taxas de resposta mais satisfatórias quando o tratamento foi combinado, comparado com as terapias aplicadas isoladamente (GONZALEZ GONZALEZ et al., 1986; OVERGAARD et al., 1995).

Apesar de apresentar resultados promissores, a hipertermia do modo como é feita atualmente é agressiva e muitas vezes os pacientes apresentam dor e intolerância a elevadas temperaturas regionais. Alguns pacientes também apresentam reações agudas na pele como efeitos adversos do tratamento (GONZALEZ GONZALEZ et al., 1986).

Atualmente, o cenário do tratamento com hipertermia para o melanoma e para outros tipos de câncer começou a mudar, com o surgimento e crescimento de uma área promissora para a medicina, a nanobiotecnologia. Avanços em nanobiotecnologia possibilitaram a utilização de nanopartículas magnéticas como instrumento para a realização da hipertermia tumoral (detalhada no item 1.3.3) sem apresentar invasividade e efeitos adversos. A nanotecnologia, hoje no auge de sua visibilidade, é considerada como uma revolução na ciência e vista como um grande progresso nas áreas que abrange.

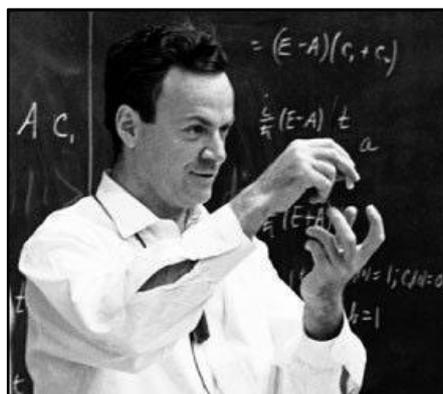
## 1.2 NANOTECNOLOGIA

### 1.2.1 Conceito

A nanotecnologia é o estudo e a aplicação de materiais em escala nanométrica (1 nanômetro = 1 bilionésimo do metro), os quais apresentam novos fenômenos físicos, químicos e biológicos decorrentes dessa nova escala. Materiais que possuem entre 1 e 100 nm em pelo menos uma dimensão são considerados objetos da nanotecnologia e podem ser utilizados em diversas áreas da ciência como biologia, medicina, química, física, ciência dos materiais, tecnologia e engenharia.

### 1.2.2 História

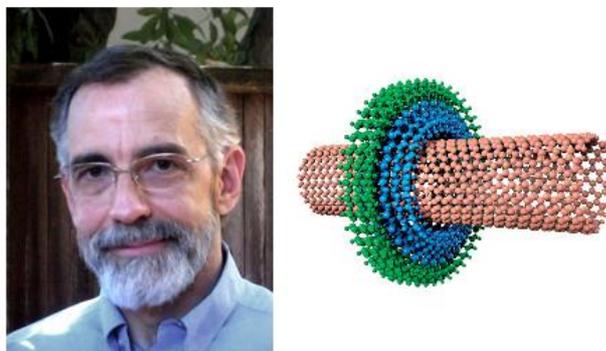
O desenvolvimento desta área é muito recente no mundo e historicamente, as ideias e conceitos por trás da nanotecnologia iniciaram com uma palestra intitulada “There’s plenty of room at the bottom” (Há muito espaço lá embaixo) proferida pelo físico Richard Feynman no encontro da Sociedade Americana de Física no Instituto de Tecnologia da Califórnia, em 29 de dezembro de 1959. Em sua palestra, Feynman discursou sobre a possibilidade de se manipular materiais na escala atômica e molecular, e desafiou a comunidade a escrever tão pequeno que a enciclopédia britânica pudesse estar totalmente escrita na ponta de uma caneta. Em sua palestra, ele observou ainda que algumas questões de escala iriam surgir a partir da mudança de magnitude de vários efeitos físicos: a gravidade se tornaria menos importante e a tensão superficial e a atração das forças de Van der Waals se tornariam mais relevantes (FEYNMAN, 1960).



**Figura 6.** Richard Feynman, físico que proferiu uma palestra com as primeiras ideias e conceitos sobre nanotecnologia, em 1959.

No entanto, o termo “nano-tecnologia” só foi utilizado pela primeira vez em 1974 quando o pesquisador Norio Taniguchi, da Universidade de Tóquio, em uma conferência se referiu à capacidade de máquinas operarem em escala menor que 1 micron (TANIGUCHI, 1974).

Mas foi com Kim Eric Drexler que o conceito de nanotecnologia foi explorado mais profundamente. Eric Drexler vinha explorando a visão articulada por Feynman e estudando os princípios físicos de nanosistemas/ nanomáquinas que poderiam ser usados para fazer produtos com precisão atômica. Em 1981, ele publicou seu primeiro artigo científico, cujo tema abordava a capacidade de manipulação molecular (DREXLER, 1981). Em 1986, Drexler publicou o livro “Engines of creation: the coming era of nanotechnology” (Máquinas da criação: a vinda da era da nanotecnologia), no qual usou independentemente a palavra nanotecnologia (paralelamente ao termo nano-tecnologia usado por Taniguchi) para se referir a um sistema de montagem a nível preciso (molecular/ atômico) que seria capaz de produzir cópias de si mesmo e outros itens de complexidade arbitrária (DREXLER, 2013). Foi com esse livro que Drexler desenvolveu e popularizou o arcabouço conceitual da nanotecnologia molecular. Seu trabalho de doutorado sobre nanotecnologia molecular, em 1991 no Instituto de Tecnologia de Massachusetts (DREXLER, 1991), resultou em outro livro chamado “Nanosystems: Molecular Machinery, manufacturing, and computation” (Nanosistemas: máquina molecular, fabricação e computação) em 1992. Neste livro ele escreveu sobre os princípios da física, química, computação e engenharia de sistemas para descrever os fundamentos da fabricação molecular e como alcançá-la.

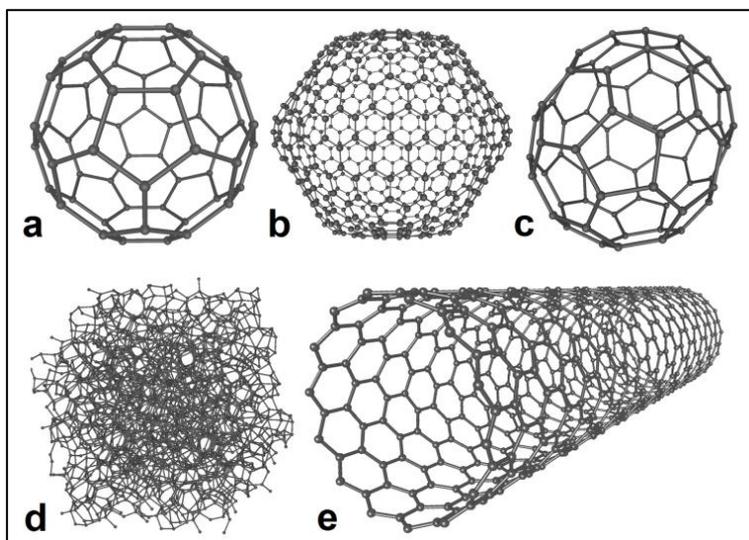


**Figura 7.** Eric Drexler, que estudou os princípios dos nanosistemas e nanomáquinas, no início dos anos 80.

O início da nanotecnologia experimental se deu em 1981, quando os pesquisadores Gerd Binnig e Heinrich Rohrer, do Laboratório de Pesquisa da IBM em Zurique, desenvolveram o microscópio de tunelamento com varredura, que proporcionou a visualização de superfícies em nível atômico. O desenvolvimento do microscópio de tunelamento com varredura deu a esses pesquisadores o prêmio Nobel em Física, em 1986 (NOBEL PRIZE, 2013).

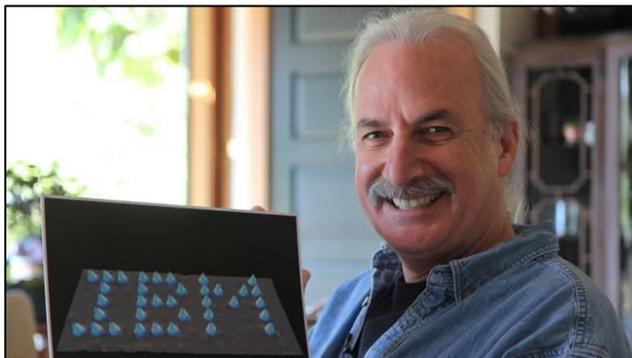
No início dos anos 80, aconteceu a descoberta dos cristais semicondutores, conhecidos hoje como *quantum dots* ou pontos quânticos. Enquanto o físico russo Alexei Ekimov descobriu os *quantum dots* em matriz de vidro, o químico americano Louis E. Brus os descobriu em soluções coloidais. O nome *quantum dots* só foi mesmo utilizado a partir de 1988 com Mark Reed.

Em 1985, os pesquisadores Harry Kroto, Richard Smalley e Robert Curl descobriram os fulerenos, que são moléculas compostas inteiramente de carbono ligados entre si em formações ocas esféricas, elipsóides ou tubulares (Figura 8). Juntos, esses pesquisadores receberam o prêmio Nobel em Química no ano de 1996. Primeiramente, eles descobriram o C<sub>60</sub>, também conhecido como *bulbball*, uma molécula cuja forma se assemelha a uma bola de futebol (KROTO et al., 1985). No ano seguinte, eles descobriram toda a família de fulerenos. Esta descoberta expandiu hoje o número de carbonos alotrópicos conhecidos. A descoberta dos nanotubos de carbono foi atribuída ao pesquisador Sumio Iijima, em 1991, embora outros pesquisadores já tenham feitos observações sobre essas estruturas de carbono tubulares anteriormente.



**Figura 8.** Alguns alotrópicos do carbono: (a) C<sub>60</sub> ou *buckball*, (b) Fulereo C<sub>540</sub>, (c) Fulereo C<sub>70</sub>, (d) Carbono amorfo e (e) nanotubo de carbono.

Em 1986, foi inventado o primeiro microscópio de força atômica, pelos pesquisadores Gerd Binnig, Calvin Quate e Christoph Gerber. O primeiro equipamento comercialmente disponível só foi introduzido em 1989. Neste mesmo ano, o pesquisador da IBM Don Eigler foi o primeiro a manipular átomos usando o microscópio de tunelamento com varredura. Ele utilizou 35 átomos de xenônio para escrever o logotipo da IBM (Figura 9).



**Figura 9.** Don Eigler, primeiro pesquisador a manipular os átomos utilizando o microscópio de tunelamento com varredura, em 1989.

Efetivamente, tais descobertas colocaram a nanotecnologia como uma nova revolução científica e a área tornou-se alvo de grandes investimentos por parte dos governos federais.

### 1.2.3 Impacto econômico da Nanotecnologia

A nanotecnologia passou a ter maior visibilidade no ano 2000, quando o governo americano comandado por Bill Clinton criou a Iniciativa Nacional de Nanotecnologia (*National Nanotechnology Initiative – NNI*), proporcionando investimentos de US\$ 464 milhões no ano de 2001. A Iniciativa Nacional de Nanotecnologia é um programa americano de pesquisa e desenvolvimento envolvendo atualmente 27 departamentos e unidades de agência que possuem atividades individuais ou cooperativas relacionadas à nanotecnologia. Das 27 unidades participantes, 15 delas possuem orçamento específico para pesquisa e desenvolvimento em nanotecnologia. Para o ano fiscal de 2014, o orçamento do governo americano será de mais de US\$ 1,7 bilhões. Deste investimento, mais de 460 milhões vão para o Instituto Nacional de Saúde (*National Institute of Health – NIH*) para investimento em pesquisa biomédica, principalmente no desenvolvimento de sistemas e dispositivos em nanoescala. Cumulativamente, o

investimento americano em nanotecnologia chega a quase US\$ 20 bilhões desde o início da Iniciativa em 2001 (NATIONAL NANOTECHNOLOGY INITIATIVE, 2013).

No Brasil, somente em agosto de 2013 é que foi lançada a Iniciativa Brasileira de Nanotecnologia (IBN) pelo Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação (MCTI). A iniciativa é um conjunto de ações com o objetivo de criar, integrar e fortalecer o desenvolvimento científico e tecnológico no setor de nanociência e nanotecnologia, para tornar a indústria brasileira mais inovadora e competitiva (MCTI, 2013). A IBN pretende aproximar a infraestrutura acadêmica e as empresas, fortalecendo as relações entre pesquisa, conhecimento e setor privado.

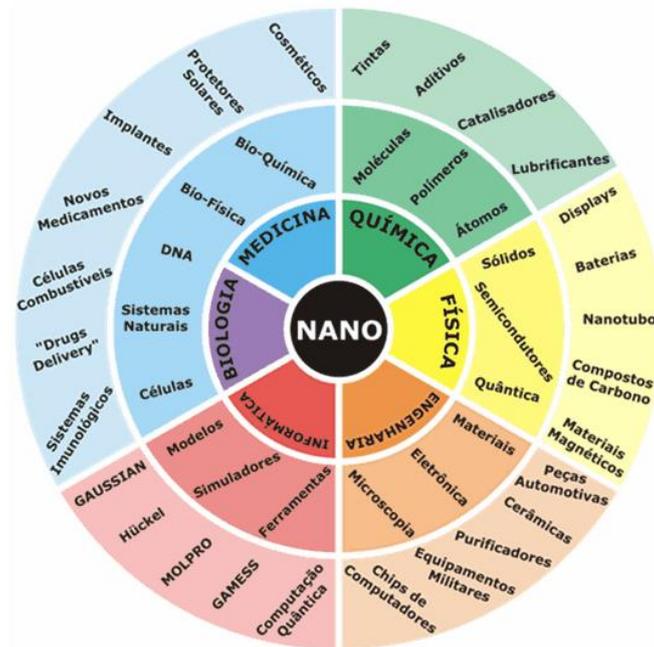
Historicamente, em 2003, foi concebido o Programa de Desenvolvimento da Nanociência e da Nanotecnologia, inserido no Plano Plurianual 2004-2007. Este programa tinha como principais ações apoiar a construção e reestruturação de laboratórios de nanotecnologia, garantir a manutenção desses laboratórios e redes de nanotecnologia e estimular projetos institucionais de pesquisa e desenvolvimento em nanociência e nanotecnologia. Em agosto de 2005, houve uma reestruturação desse programa e o presidente Luiz Inácio Lula da Silva, junto com o ministro da Ciência e Tecnologia Sérgio Rezende, criou o Programa Nacional de Nanotecnologia (PNN). O objetivo do PNN é atender as demandas estratégicas identificadas pela comunidade envolvida com o desenvolvimento da nanociência e da nanotecnologia e colocar em prática uma das medidas da Política Industrial, Tecnológica e de Comércio Exterior, política esta que incentiva a inovação tecnológica.

A primeira etapa dos grandes investimentos realizados pelo governo federal foi neste momento, quando o Ministro Sérgio Rezende anunciou a contratação de R\$ 71 milhões em programas e projetos nas áreas de Nanotecnologia e Nanobiotecnologia para o ano de 2005 e primeiro semestre de 2006.

Recentemente, o governo federal brasileiro anunciou o investimento de R\$ 440 milhões em nanotecnologia para os próximos dois anos (AGÊNCIA BRASIL, 2013). Estima-se que o mercado total de produtos que incorporam nanotecnologias (incluindo semicondutores e eletrônicos) atinja cerca de US\$ 2,95 trilhões em 2015 (PORTAL BRASIL, 2013).

### 1.2.4 Características e aplicações da Nanotecnologia

A nanotecnologia é um campo multidisciplinar cujos materiais e dispositivos podem ser aplicados em diversas áreas como medicina, química, física, eletrônica, tecnologia da informação, meio ambiente, produção de energia, indústria entre outras (DOLL et al., 2013; FAKRUDDIN; HOSSAIN; AFROZ, 2012; STAGGERS et al., 2008).



**Figura 10.** Vasto campo de aplicação da nanotecnologia.

Uma característica que torna os materiais nanométricos tão especiais e com esta vasta aplicabilidade é que nas dimensões nanométricas, os materiais adquirem propriedades físicas, químicas e biológicas que são diferentes das propriedades observadas em escala macroscópica. Isso porque os efeitos quânticos começam a dominar as propriedades da matéria em nanoescala e alguns aspectos como ponto de fusão, fluorescência, condutividade elétrica, comportamento magnético e reatividade química podem mudar em função do tamanho da partícula, tornando estes materiais muitas vezes mais vantajosos do que os sistemas convencionais (GAJEWICZ et al., 2012; KANAPARTHY, R.; KANAPARTHY, A., 2011).

Um exemplo dessa mudança de propriedade acontece com o ouro. Devido ao movimento restrito dos elétrons confinados em escala nanométrica, as nanopartículas de

ouro reagem à luz de forma diferente das partículas de ouro em escalas maiores, e apresentam uma cor vermelha ou roxa, ao invés da cor tradicionalmente amarela (CHATTERJEE; DIAGARADJANE; KRISHNAN, 2011).

Outra característica extremamente importante dos materiais nanométricos é a sua elevada área de superfície em relação à sua massa. Isso faz com que os nanomateriais sejam altamente reativos, uma vez que uma grande quantidade do nanomaterial pode entrar em contato com os materiais ao redor. Esse aumento de reatividade faz com que as nanopartículas possam ser utilizadas como nanocatalisadores, por exemplo. Baterias, células de combustível e catalisadores projetados com nanoengenharia podem utilizar esse aumento de reatividade para produzir modos mais limpos e mais seguros de gerar e estocar energia (TAN; CHAI, MOHAMED, 2012).

A elevada área de superfície também torna os materiais nanoestruturados bons candidatos à aplicação em sistemas de tratamento de água. Os nanoabsorventes oferecem melhoras significativas não só pela grande área de superfície, mas também por seus sítios de sorção associados, pequena distância de difusão intrapartícula e o fato do tamanho do poro e a química da superfície serem ajustáveis (QU; ALVAREZ; LI, 2013). Os nanotubos de carbono, por exemplo, possuem maior eficiência em absorver compostos orgânicos e metais pesados do que o carvão ativado, que é atualmente empregado para reter impurezas e elementos poluentes das águas (QU; ALVAREZ; LI, 2013; QU et al., 2013; TAN; CHAI, MOHAMED, 2012).

Além de nanocatalisadores e nanoabsorventes, a grande área de superfície relativa também beneficia a funcionalização de uma nanopartícula para aplicações biomédicas (item 1.3.2).

Partículas em escala nanométrica sempre existiram na ciência ou na natureza. O funcionamento do organismo, por exemplo, ocorre em escala nano e de uma maneira perfeitamente natural. Muitos cientistas estão observando princípios biológicos em nanoescala como a automontagem molecular, autorganização ou mecânica quântica para usar no desenvolvimento de novas plataformas computacionais para aplicação em nanotecnologia. Na natureza, algumas folhas apresentam superfícies hidrofóbicas (como as folhas de lótus, repolho e arroz) que fazem com que as gotas de água escorreguem facilmente por elas. Baseado nessa observação, pesquisadores desenvolveram nanomateriais capazes de produzir superfícies superhidrofóbicas que agem como uma cobertura autolimpante quando aplicados nos objetos (HANUS; HARRIS, 2013).

A nanotecnologia também tem potencial para mudar o cenário atual da agricultura e indústria alimentícia. Novas ferramentas estão sendo desenvolvidas para melhorar o acondicionamento dos alimentos utilizando-se materiais com propriedades antimicrobianas; proteger alimentos que ficam expostos ao ar livre como frutas e vegetais através da utilização de filmes finos e comestíveis; detectar e quantificar patógenos nos alimentos usando biosensores; e utilizar o nanoencapsulamento para o sistema de entrega de pesticidas reduzindo, assim, o dano a outras plantas e a quantidade de agentes químicos liberados para o ambiente (DURÁN; MARCATO, 2013; RAI; INGLE, 2012).

Muitas das aplicações da nanotecnologia estão presentes no nosso cotidiano, como, por exemplo, nanopartículas utilizadas em cosméticos, permitindo que os ingredientes ativos penetrem mais facilmente e mais profundamente nas camadas da pele, e em protetores solares, fazendo com que as nanopartículas bloqueiem os raios ultravioletas e ao mesmo tempo não deixem resíduos brancos do produto na pele (MORGANTI, 2010).

Nos esportes, muitos nanomateriais estão sendo empregados com diversas finalidades: nanotubos de carbono para aumentar a força e a resistência das raquetes de tênis e ainda deixá-las mais leves; nanopartículas para preencher imperfeições dos materiais, aumentando sua uniformidade; nanopartículas de sílica para aumentar a força das varas de pescar sem aumentar o seu peso; utilização de nanocompósitos em bolas de tênis para prevenir que o ar saia com facilidade, através da formação de uma barreira (UNDERSTANDING NANO, 2013).

Nanopartículas de prata tem propriedades antimicrobianas e por isso possuem aplicação em vestuários, deixando as roupas frescas e resistentes a odores, e em lençóis e outros tecidos hospitalares a fim de inibir o crescimento bacteriano e evitar infecções hospitalares. A mesma tecnologia é utilizada em curativos para pequenos cortes, onde os íons de prata exercem sua ação antimicrobiana, ajudando na recuperação do tecido lesionado (DELOUISE, 2012).

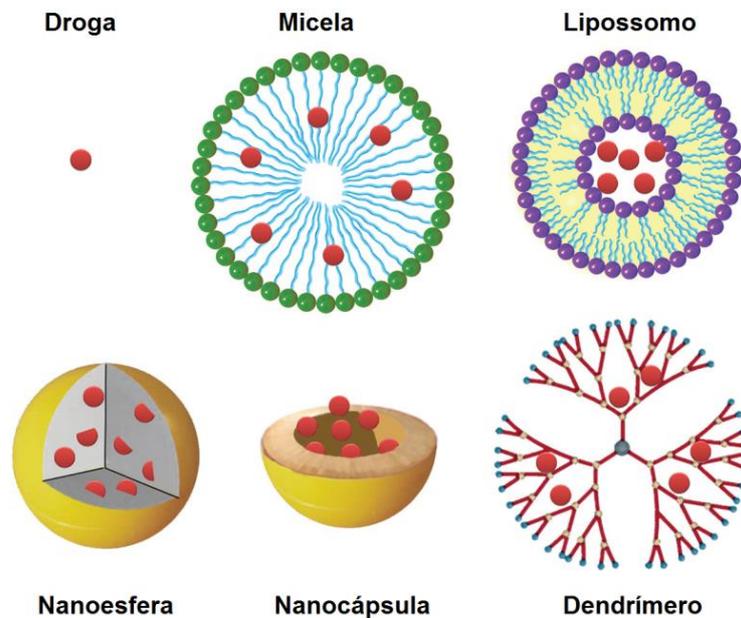
### **1.3 NANOBIOTECNOLOGIA**

A nanobiotecnologia é uma subdivisão da nanotecnologia que abrange a pesquisa, desenvolvimento e aplicação de nanomateriais na área biomédica. A nanobiotecnologia tem potencial para transformar o campo da medicina, porque ela

oferece novas oportunidades para compreender marcadores que são clinicamente relevantes, realizar imagens da doença em seu nível molecular e utilizar novas ferramentas para a intervenção terapêutica (SAHOO; PARVEEN; PANDA, 2007).

### 1.3.1 Nanomateriais

Vários tipos de nanopartículas são utilizadas na área biomédica. Elas são desenhadas de forma que variam em relação ao tamanho, forma e material. As principais nanopartículas utilizadas na medicina são os lipossomos, nanocápsulas, nanoesferas, dendrímeros, nanotubos de carbono e nanopartículas magnéticas (HALEY; FRENKEL, 2008).



**Figura 11.** Principais nanomateriais utilizados em nanobiotecnologia (RAMOS-CABRER; CAMPOS, 2013).

Os lipossomos são vesículas fechadas compostas de bicamada lipídica. O sistema é bastante versátil e permite o carregamento de drogas lipídicas, carregando-as entre as camadas lipídicas, e permite também o encapsulamento de drogas hidrossolúveis no interior da vesícula (DEBBAGE; JASCHKE, 2008). A estabilização dessa estrutura pode ser feita cobrindo-a com polímeros inertes.

Nanocápsulas são sistemas vesiculares que exibem uma estrutura do tipo núcleo-concha (em inglês, *core-shell*), na qual a droga pode ser confinada em uma cavidade ou

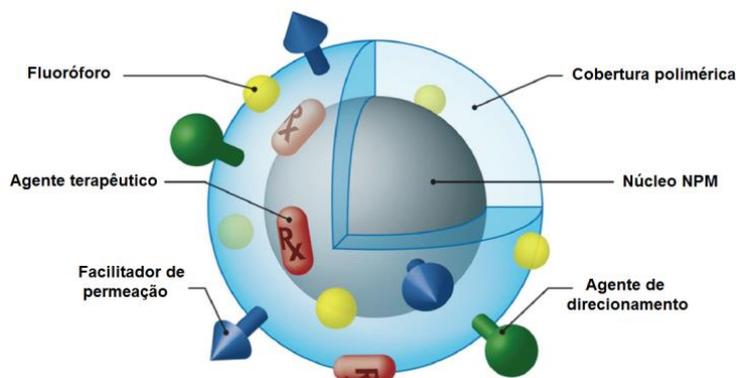
núcleo central. Esse núcleo é cercado por uma membrana ou cobertura polimérica, a qual também pode ser modificada para ligações de moléculas como anticorpos para o direcionamento das nanocápsulas. O material carregado dentro do núcleo pode ser sólido, líquido ou gasoso e o ambiente dessa cavidade pode ser aquoso ou oleoso, dependendo do método de preparação e dos materiais utilizados (ESTEVANATO et al., 2012b; MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2009).

Nanoesferas são estruturas esféricas compostas de um sistema de matriz polimérica. Podem carregar drogas através de encapsulamento, ligação ou aprisionamento da molécula. A superfície da esfera pode ser modificada por polímeros, ligantes ou anticorpos para fins de direcionamento específico (CINTRA E SILVA et al., 2012; ESTEVANATO et al., 2011).

Os dendrímeros são estruturas de forma esférica e que são regularmente ramificadas de forma tridimensional. Os dendrímeros possuem uma molécula multifuncional em seu núcleo central e as unidades de ramificação podem emergir por polimerização a partir do núcleo central ou podem ser sintetizadas a partir da periferia e terminar na molécula central. O tamanho dessas ramificações tem limitações estéricas e, apesar de possuírem peso molecular pequeno, os dendrímeros possuem alto peso molecular. Essas nanoestruturas podem ser utilizadas como carreadores de drogas ligadas em sua superfície ou entremeada no interior da esfera, podendo carregar moléculas hidrofóbicas e também hidrofílicas (DEBBAGE; JASCHKE, 2008).

Os nanotubos de carbono são partículas da família dos fulerenos compostas de carbono na forma tubular elipsóide. A estrutura pode ter paredes simples ou multicamadas e átomos podem ser presos dentro dos tubos e ligantes também podem ser acoplados em sua superfície.

Por sua vez, nanopartículas magnéticas são as nanopartículas que possuem um núcleo magnético. Para serem aplicadas em nanobiotecnologia, elas precisam ser biocompatíveis e isso é alcançado utilizando-se uma cobertura para a nanopartícula magnética, que pode ser um polímero ou um composto biológico. A droga pode ser carregada entremeada na sua cobertura (CARNEIRO et al., 2013) e a sua superfície pode ser modificada com ligantes para o direcionamento específico da partícula (DA PAZ et al., 2012) (Figura 12). Mais informações sobre as nanopartículas magnéticas, objeto deste estudo, são fornecidas no item 1.3.3.



**Figura 12.** Esquemática da nanopartícula magnética, sua cobertura e as diversas possibilidades de ligantes em sua superfície (HU et al., 2011).

### 1.3.2 Aplicações

O campo de aplicação da nanobiotecnologia é vasto e a principal utilização dos materiais nanométricos é na detecção, acompanhamento e tratamento de doenças. Por esse motivo, o termo nanomedicina também tem sido utilizado para se referir ao uso de materiais e dispositivos em escala nanométrica para o diagnóstico e terapia de doenças, principalmente o câncer (JAIN, 2010).

#### 1.3.2.1 Diagnóstico

Em relação às aplicações diagnósticas, os nanomateriais estão sendo utilizados para aperfeiçoar o diagnóstico molecular através da disponibilidade de novas ferramentas de detecção, de sondas que se ligam a alvos individuais e nanopartículas que podem ser utilizadas em exames por imagem.

Nanopartículas magnéticas, por exemplo, podem ser utilizadas para substituir a detecção por fluorescência ou radioatividade dos biochips e microarranjos utilizados atualmente. Apesar de serem procedimentos altamente sensíveis, o uso de fluorescência ou radioatividade são métodos caros e que consomem muito tempo (SAHOO; PARVEEN; PANDA, 2007) e a substituição pelas nanopartículas magnéticas tornariam os testes biológicos mais rápidos, sensíveis e flexíveis. Neste caso, as nanopartículas magnéticas seriam ligadas a anticorpos adequados para reconhecer moléculas, estruturas ou microrganismos específicos, e elas seriam detectadas através de imunensaio magnético, na qual o campo magnético gerado pelo alvo marcado é detectado diretamente por um magnetômetro sensível (JAIN, 2005).

Nanopartículas de ouro podem ser marcadas com pequenos segmentos de DNA complementar e serem usadas para identificar sequências genéticas de interesse em uma determinada amostra. Essa abordagem pode detectar com mais rapidez (cerca de 42 h antes) um quadro de infecção bacteriana sanguínea como a sepse, cuja identificação das cepas de bactérias e o padrão de resistência a antibióticos são atualmente feitos por metodologias de cultura microbiana (BUCHAN et al., 2013).

Microarranjos de proteínas são bastante utilizados tanto na área farmacêutica, para o desenvolvimento de drogas, quanto como diagnóstico, visto que as proteínas são as moléculas mais importantes para se estabelecer o fenótipo biológico de uma doença. A nanotecnologia também está atuando nos chips de proteínas, os quais estão sendo dimensionados em escala nanométrica (nanoarranjos de proteínas) com a vantagem de permitir a miniaturização dos receptores para a escala dos analitos biológicos. Isso ocasiona mudança nas propriedades físicas dos receptores e na sua relação com os analitos, disponibilizando novas reações de triagem diagnóstica (LEE et al., 2002).

Os *quantum dots*, que são nanocristais semicondutores luminescentes, também podem ser aplicados em diagnóstico, pois eles permitem a geração de um código óptico multicolorido para ser usado nos ensaios biológicos (Figura 13). A ideia seria substituir os anticorpos conjugados a corantes orgânicos ou inorgânicos (utilizados para detectar moléculas ou organismos específicos causadores de alguma doença), já que os *quantum dots* suportam mais ciclos de excitação e emissão de luz do que as moléculas orgânicas tipicamente utilizadas, as quais se decompõem mais rapidamente (FAKRUDDIN; HOSSAIN; AFROZ, 2012; MEDINTZ et al., 2005).



**Figura 13.** Quantum dots ou pontos quânticos, que são cristais semicondutores luminescentes com larga aplicação em técnicas de imagem (MADANI et al., 2013).

No diagnóstico oncológico, as técnicas de imagem mais utilizadas como ferramenta para detectar o câncer são a ressonância magnética (RM) e a tomografia computadorizada (TC). A imagem por RM é utilizada clinicamente para visualizar a estrutura e função em todo o corpo, oferecendo um excelente contraste entre os tecidos

moles do organismo (CHO et al., 2010). Nanopartículas de óxido de ferro, devido ao seu elevado momento magnético, são capazes de distorcer as características magnéticas locais dos tecidos, obtendo uma melhoria no contraste da imagem (SANTHOSH; ULRIH, 2013), e por isso, vem sendo largamente utilizadas como meio de contraste em imagem por RM.

A TC utiliza raios x para criar imagens tridimensionais e o contraste entre os diferentes tecidos vem da diferença de atenuação dos raios x no corpo. Esta é eficiente no osso, mas não nos tecidos moles, o que faz com que os tecidos moles necessitem de um agente de contraste para ajudar na atenuação dos raios x e melhorar sua visualização (KALENDER, 2006). Atualmente, a TC é a modalidade de imagem mais utilizada nos hospitais e centros de diagnóstico em termos de disponibilidade, eficiência e custo (HUANG, H. et al., 2011). Os meios de contraste predominantemente utilizados são moléculas contendo iodo, as quais são muito efetivas em absorver raios x. No entanto, são moléculas de alvos não específicos, uma vez que não podem ser conjugadas a muitos componentes biológicos e marcadores tumorais, além de permitirem somente imagens em tempos muito curtos, já que são eliminadas rapidamente da corrente sanguínea pelos rins. Por esse motivo, a nanotecnologia também tem atuado nesta área de diagnóstico por imagem e algumas nanoestruturas experimentais têm sido testadas como agentes de contraste para TC (BONITATIBUS et al., 2010; NARAYANAN et al., 2012; POPOVTZER et al., 2008). Essas nanoestruturas, que incluem dendrímeros, nanopartículas e moléculas iodadas dentro de lipossomos, precisam ter alta densidade de átomos pesados e uma cobertura compatível para terem a aplicação biomédica (GALPERIN et al., 2007; SAMEI et al., 2009). Além dos materiais nanométricos permitirem a conjugação de moléculas alvo em sua superfície, eles geralmente são formulados de modo que possuam meia-vida vascular mais longa que os meios de contraste normalmente utilizados, permitindo que os nanoagentes de contraste sejam monitorados por um tempo maior, e sem toxicidade, após serem entregues ao organismo (RABIN et al., 2006).

Atualmente, está disponível em laboratório a técnica de nanotomografia computadorizada, que permite o estudo de nanocompostos em imagens com resolução espacial da ordem de centenas de nanômetros (BRUKER, 2013). Além disso, instrumentos de microtomografia computadorizada (microTC) também foram desenvolvidos para uso *in vivo* e com alta resolução. Por ter alta resolução, a microTC pode permitir a visualização de materiais nanoestruturados em pequenos animais de

laboratório, o que gera oportunidades de ensaios de caracterização e estudos pré-clínicos de nanoemulsões para serem utilizadas como novos meios de contraste (HALLOUARD et al., 2013; SAMEI et al., 2009; WANG et al., 2011). A microTC também é utilizada como ferramenta para se investigar alterações na estrutura morfológica dos ossos, por exemplo, induzidas pelo câncer de próstata (BI et al., 2013) e já foi utilizada também para visualizar a migração de células troncos marcadas com nanopartículas magnéticas (TORRENTE et al., 2006).

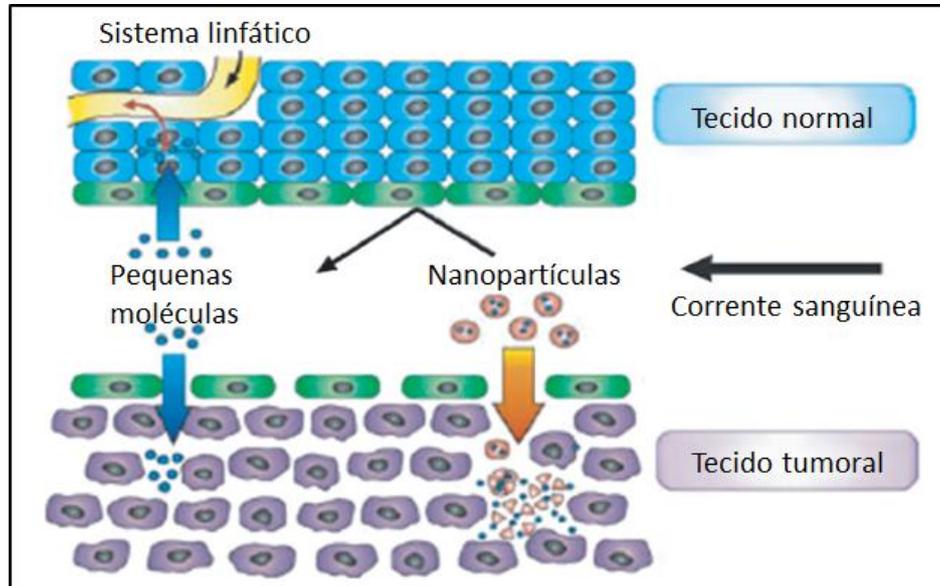
Outro ganho da nanotecnologia em diagnóstico por imagem foi permitir a imagem em multimodalidade devido à capacidade das nanopartículas de serem multifuncionais (CHENG et al., 2012; XIAO et al., 2012). Se nanopartículas de óxido de ferro superparamagnéticas (SPION, do inglês *superparamagnetic iron oxide nanoparticles*) forem conjugadas a alguma molécula fluorescente, por exemplo, esta nanopartícula poderá ser visualizada tanto por RM quanto por microscopia de fluorescência óptica (YEN et al., 2013). Do mesmo modo, nanopartículas poliméricas funcionalizadas com SPION e ligantes que incorporem um traçador radioativo podem ser visíveis em técnicas de imagem multimodalidade, como a RM e tomografia computadorizada de emissão de fóton único (SPECT, em inglês) (BARREFELT et al., 2013). A grande vantagem desse tipo de imagem multimodalidade é que ela permite não só a visualização dos sítios anatômicos, mas também pode fornecer dados funcionais a partir das diferentes técnicas utilizadas. Outra vantagem é poder diminuir o número de animais de laboratório utilizados em pesquisa científica, ao mesmo tempo em que reduz o tempo e os custos da pesquisa (BARREFELT et al., 2013).

### **1.3.2.2 Tratamento**

As principais aplicações terapêuticas dos nanomateriais referem-se aos sistemas de entrega de drogas, cuja terapia carregada pode ser quimioterapia (BISHT; MAITRA, 2009; REN et al., 2012), radiação, terapia gênica ou antígenos para vacinação. Diversos nanomateriais já foram desenvolvidos como sistemas de entrega de drogas com alvos seletivos e com entrega controlada.

A primeira grande vantagem dos sistemas de entrega de drogas nanoformuladas é poder levar a medicação ao seu sítio alvo de maneira mais eficaz, seja por direcionamento ativo, quando moléculas são conjugadas na superfície das nanopartículas permitindo a seleção específica de um alvo, seja por carreamento

passivo, se a finalidade for tratar um câncer. Se o alvo das nanopartículas for um tumor, elas podem ser levadas passivamente a ele devido ao efeito da retenção e permeabilidade aumentada, conhecido como efeito EPR (do inglês, *enhanced permeability and retention*), que faz com que as partículas se acumulem preferencialmente no tumor (BISHT; MAITRA, 2009). Esse acúmulo preferencial na massa tumoral acontece principalmente por dois motivos: [1] os tumores que estão em crescimento produzem fatores de crescimento endotelial vascular (VEGF) que promovem a angiogênese e, portanto, permitem o acesso das nanopartículas ao tumor. A vasculatura tumoral é mais fraca que a vasculatura normal e seus vasos sanguíneos apresentam grandes poros formados entre as células endoteliais, o que permite a liberação de nanopartículas circulantes no interstício tumoral; e [2] a maioria dos tumores não possui um sistema de drenagem linfática efetivo, levando ao subsequente acúmulo das nanopartículas que foram liberadas naquela região (CORCHERO; VILLAVARDE, 2009; MAEDA; NAKAMURA; FANG, 2013). Desta forma, o carregamento passivo de nanomateriais ocorre devido à neovasculatura altamente permeável e ao sistema linfático ineficiente associado aos tumores (Figura 14).



**Figura 14.** Esquema do efeito EPR (retenção e permeabilidade aumentada) que permite a entrega passiva de nanopartículas diretamente ao tumor.

Devido a essa maior especificidade de entrega da droga, evita-se as consequências da biodistribuição sistêmica da medicação, que pode provocar toxicidade em tecidos não-alvo, ocorrência de maior metabolismo e excreção do medicamento,

dificultando, assim, a manutenção da concentração do medicamento dentro da janela terapêutica. Tudo isso, além de causar possíveis efeitos adversos, pode reduzir a eficácia da terapia.

Outra grande vantagem dos nanossistemas é em relação à entrega de drogas pouco solúveis, pois essas substâncias podem ser encapsuladas dentro de lipossomos ou adsorvidas em nanopartículas magnéticas e, assim, serem entregues ao alvo (WANG; CHUI; HO, 2011; YANG et al., 2012). Medicamentos que possuem baixa biodisponibilidade ao serem aplicados por via oral, por exemplo, também podem ser reformulados utilizando nanopartículas a fim de aumentar sua eficácia (HU; JOHNSTON; WILLIAMS, 2004). Essas formulações protegem as drogas suscetíveis à degradação ou desnaturação em regiões com pH severo, ou ainda prolongam a duração da exposição de uma droga aumentando a retenção da formulação através de bioadesão.

Uma outra vantagem dos nanocarreadores é permitir a liberação da medicação de forma controlada. Algumas formulações foram desenvolvidas de modo a liberar a droga somente quando moléculas específicas estiverem presentes ou quando algum ativador externo for acionado (como, por exemplo, calor por infravermelho), permitindo, deste modo, uma entrega controlada e diferencial. São esses fatores que melhoram a estabilidade, absorção e a concentração terapêutica da droga no seu tecido alvo, permitindo a redução da dosagem total ou a frequência de administração da droga, proporcionando maior conforto ao paciente, já que pode diminuir alguns efeitos adversos da medicação.

Ainda citando aplicações terapêuticas da nanobiotecnologia, muito tem sido explorado em relação à entrega de genes. A terapia gênica é um método de tratamento ou prevenção de desordens genéticas através da correção dos genes defeituosos responsáveis pelo desenvolvimento da doença. No campo da nanobiotecnologia, a entrega de genes reparados pode ser feita utilizando-se lipossomos, nanopartículas (CORCHERO; VILLAVERDE, 2009) e dendrímeros. Os lipossomos são muito utilizados porque, devido à sua composição de bicamada lipídica, eles atravessam facilmente as membranas celulares para atingir o alvo. Neste caso, os nanomateriais vieram para melhorar algumas dificuldades atuais, como a chance de um vírus modificado reverter para sua forma selvagem e a potencial imunogenicidade dos vetores virais.

A nanotecnologia também tem sido bastante aplicada na área de cardiologia, com o desenvolvimento de ferramentas que podem ajudar em diagnóstico, imagem e

engenharia de tecidos. Alguns dispositivos em nanoescala estão sendo utilizados como sensores capazes de monitorar sinais em resposta a eventos cardíacos ou inflamatórios. Algumas moléculas desenvolvidas para funcionar como motores moleculares são capazes de imitar ou incorporar sistemas biológicos em escala molecular e podem ser utilizadas para o tratamento de doenças cardiovasculares. Um exemplo de nanomáquina foi desenvolvida para diminuir a chance de ataque cardíaco em pessoas que precisam de intervenção coronária percutânea. Ela tem sensores que se ligam a um receptor e tem efetores que bloqueiam esse receptor por impedimento alostérico. Esse receptor fica então impedido de se ligar ao fibrinogênio e a nanomáquina que tem anticorpo muda o comportamento das plaquetas, impedindo agregação e ativação plaquetária (KONG; GOLDSCHMIDT-CLERMONT, 2005).

Na ortopedia, a nanotecnologia vem oferecendo materiais compatíveis e com características desejáveis para um bom implante, melhorando a qualidade de vida dos pacientes que sofrem com fraturas ósseas debilitantes. Alguns nanomateriais como nanopolímeros, nanofibras de carbono e nanocompósitos de cerâmica, podem ajudar com uma deposição mais eficiente de minerais contendo cálcio nos implantes, melhorando a união do implante com o osso e diminuindo as falhas dos implantes (SAHOO; PARVEEN; PANDA, 2007).

Na oncologia, o uso de nanobiotecnologia para o manejo do câncer é sem dúvida o capítulo mais importante da nanomedicina. A maioria das aplicações descritas anteriormente pode ser empregada para o diagnóstico e tratamento desta doença. De um modo geral, a nanobiotecnologia foi capaz de refinar e estender os limites para o diagnóstico molecular do câncer, melhorar a descoberta de biomarcadores, permitir a entrega de terapias de modo a aumentar a eficácia e diminuir os efeitos adversos através da redução das doses administradas e melhorar a detecção de tumores por RM (JAIN, 2010).

### **1.3.3 Nanopartículas magnéticas e magnetohipertermia**

As nanopartículas magnéticas (NPM) apresentam uma variedade de atributos que as tornam muito interessantes para a aplicação biomédica, como por exemplo, manipulação das nanopartículas com o auxílio de um campo magnético externo (ALEXIOU et al., 2007), possibilidade de se usar estratégias passiva e ativa para a entrega de drogas (COLE; YANG; DAVID, 2011), habilidade de visualização em

técnicas de imagem (YANG et al, 2009), elevada interiorização pelo tecido alvo resultando em um tratamento efetivo com dose otimizada, fácil manipulação de seu tamanho durante sua preparação (SANTHOSH; ULRIH, 2013) e fácil preparação em larga escala (DAS et al., 2010). Por isso, as NPM estão entre os nanomateriais mais utilizados em diagnóstico e tratamento de doenças.

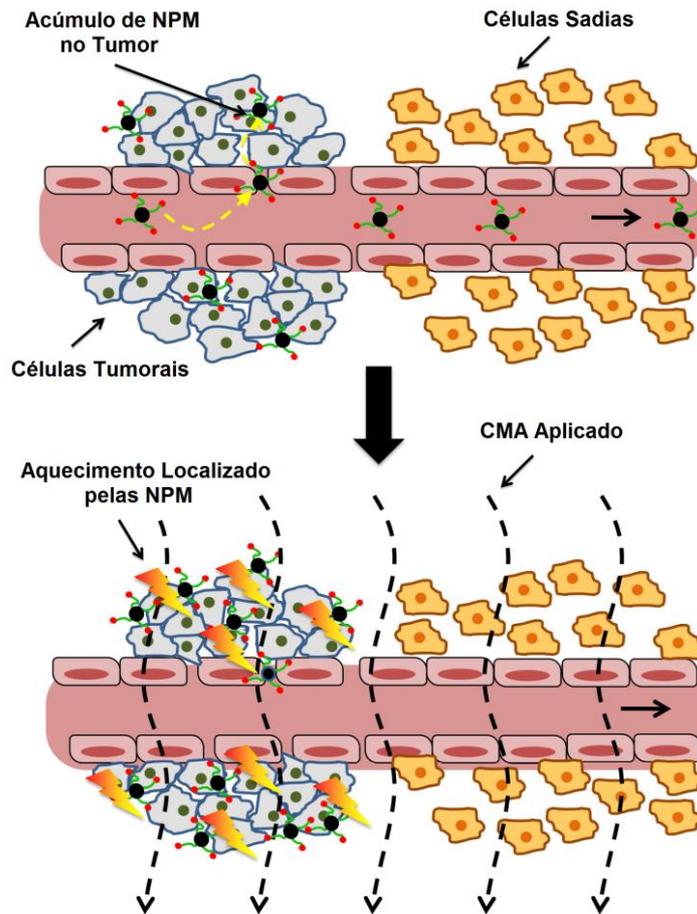
Para possuírem aplicabilidade na área médica, como citado anteriormente, as NPM necessitam ser recobertas com substâncias que as tornem biocompatíveis, estáveis e não tóxicas no meio fisiológico. Sabe-se que diferentes coberturas das NPM podem levar a diferenças na sua nanotoxicidade e na interiorização pelas células (BARBOSA, 2004; ESTEVANATO et al., 2012a; LACAVA et al., 2002; MARTINEZ-BOUBETA et al., 2010; MONGES-FUENTES, 2009; PORTILHO, 2007; VILLANUEVA et al, 2009). Dependendo da cobertura, da via de administração e do tamanho das NPM, elas podem se associar com componentes extracelulares ou com a membrana celular, influenciando na sua biodistribuição pelo organismo (ROOHI et al, 2012; WILCZEWSKA et al., 2012). Hoff e colaboradores (2013) mostraram que quanto menor o tamanho de SPION maior a permeabilidade de passarem por um modelo de barreira hematoencefálica, o que sugere que as NPM possuem capacidade de atravessar essa barreira, fato também observado em relação a nanocápsulas magnéticas de albumina (CINTRA E SILVA et al., 2012).

De acordo com suas propriedades magnéticas, as NPM podem ser divididas em metais puros (como cobalto, níquel, manganês e ferro), ligas e óxidos metálicos. No entanto, para aplicações biomédicas, a escolha do material fica mais restrita, pois muitos são tóxicos ou ainda não foram testados quanto à sua toxicidade para o organismo (HOFMANN-AMTENBRINK; HOFMANN; MONTET, 2010). As NPM de óxido de ferro (magnetita e maghemita) são as únicas que possuem o uso aprovado pela agência americana FDA e, portanto, estão entre as mais utilizadas na área da medicina e biotecnologia (COLE; YANG; DAVID, 2011; XU; SUN, 2009). Além disso, outras características as tornam favoráveis ao uso biomédico: possuem um método de fácil preparo através da co-precipitação alcalina de  $Fe^{+2}$  e  $Fe^{+3}$ , possuem estabilidade química em condições fisiológicas e apresentam possibilidade de modificação química através da cobertura de seu núcleo de ferro com vários compostos biocompatíveis. Adicionalmente, sabe-se que os óxidos de ferro ocorrem naturalmente no organismo, no coração, baço e fígado, o que indica que esses compostos não são tóxicos. Após a degradação das nanopartículas no organismo, os íons de ferro liberados não aumentam

muito a quantidade de ferro nativo do corpo, sendo incorporados na hemoglobina dos eritrócitos e sendo degradados no ciclo normal de reciclagem de ferro no organismo (SCHLACHTER et al., 2011).

As NPM são geralmente utilizadas na forma de fluidos magnéticos. Fluidos magnéticos são suspensões coloidais estáveis compostas de NPM dispersas em líquidos carreadores orgânicos ou inorgânicos (ROSENWEIG, 1985). Os fluidos magnéticos exibem um novo comportamento magnético, chamado superparamagnetismo, que não é observado em nenhum outro material em escala macroscópica. Esse comportamento se assemelha ao paramagnetismo, no qual materiais paramagnéticos se orientam na mesma direção de um campo magnético externo aplicado e seu magnetismo não permanece após a remoção deste campo. A diferença é que enquanto os materiais paramagnéticos possuem pequena susceptibilidade magnética, os fluidos superparamagnéticos apresentam uma magnetização muito maior, mesmo quando submetidos a um pequeno campo magnético (HOFMANN-AMTENBRINK; HOFMANN; MONTET, 2010; ROSENWEIG, 1985; SANTHOSH; ULRIH, 2013). Devido a esse fenômeno, a principal aplicação biomédica dos fluidos magnéticos é na terapia antitumoral utilizando a magnetohipertermia.

Magnetohipertermia é a elevação da temperatura provocada pelas NPM que respondem a um campo magnético de frequência alternada (CHATTERJEE; DIAGARADJANE; KRISHNAN, 2011). Quando as NPM são submetidas a este campo, seus domínios magnéticos se alinham com o campo aplicado e uma vez que esse campo possui frequência alternada, os domínios do material também se alternam com o campo. A constante mudança de orientação faz com que as nanopartículas dissipem energia na forma de calor, gerando assim o aquecimento necessário ao tratamento do tumor (LAURENT et al., 2011).



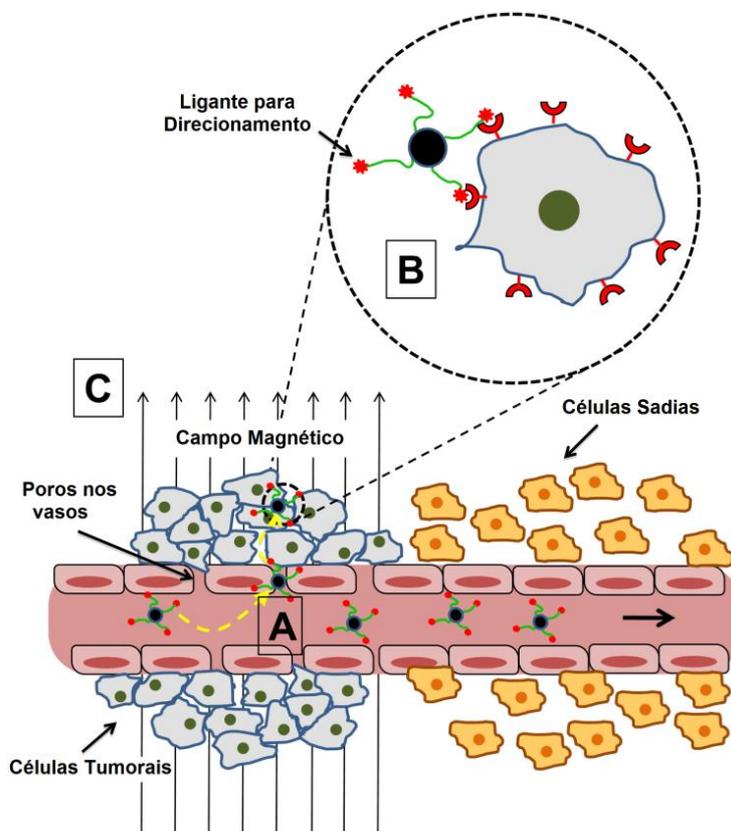
**Figura 15.** Magnetohipertermia no tumor gerada pelo uso de nanopartículas magnéticas (NPM) quando submetidas a um campo magnético de frequência alternada (CMA) (COLE; YANG; DAVID, 2011).

Diversos trabalhos mostram o sucesso da aplicação de NPM para o tratamento de tumores experimentais (DU et al., 2009; ESTEVANATO, 2012; HOU et al., 2009; ITO et al., 2003a; PORTILHO, 2011; REN et al., 2012; WANG; SONG; ZHANG, 2009) e alguns deles apresentaram a remissão completa da massa tumoral (ITO et al., 2003b; YANASE et al., 1998a; 1998b). O melanoma também é alvo de muitos estudos de magnetohipertermia (BALIVADA et al., 2010; RACHAKATLA et al., 2010; SUZUKI et al., 2003).

O grande avanço e a principal vantagem da utilização de NPM para o diagnóstico e tratamento do câncer referem-se à multifuncionalidade dessas estruturas.

Além de poderem atuar como meios de contraste em exames de imagem e permitir aplicações diagnósticas e de acompanhamento da doença, as NPM podem atuar no tratamento do câncer utilizando a magnetohipertermia e também atuar como sistemas carreadores de drogas para levar uma terapia adicional aos tumores. As NPM podem ser direcionadas ativamente para a massa tumoral, tanto pela ligação de anticorpos ou

moléculas específicas em sua superfície que permitem a interação com as células tumorais, como pelo direcionamento das nanopartículas utilizando um campo magnético externo (ALEXIOU et al., 2007).



**Figura 16.** Entrega das nanopartículas magnéticas ao tumor (A) passivamente devido ao efeito EPR, (B) ativamente devido ao direcionamento por ligantes em sua superfície, ou (C) pela aplicação de um campo magnético externo direcionador (COLE; YANG; DAVID, 2011).

#### 1.4 COMPOSTOS DE SELÊNIO NO TRATAMENTO E PREVENÇÃO DO CÂNCER

Diversos agentes quimioterápicos ou novas drogas vêm sendo utilizadas para serem entregues diretamente ao tumor. Novos compostos estão sendo estudados e testados, e substâncias a base de selênio vem apresentando resultados promissores para o tratamento do câncer.

O selênio é um oligoelemento (elemento-traço) encontrado em carnes, peixes, vegetais, grãos e leite e é um cofator essencial da enzima antioxidante glutathione peroxidase. A proteção contra danos oxidativos é importante para manter a homeostase do organismo e essa proteção é principalmente relevante para a pele, uma vez que a

exposição à luz ultravioleta exerce efeitos biológicos adversos na pele e parte desses efeitos ocorre devido à geração de espécies reativas de oxigênio e radicais livres (JENSEN; WING; DELLAVALLE, 2010).

A associação dos níveis de selênio com a incidência do câncer é muito controversa na literatura. Enquanto alguns estudos mostram associação da deficiência de selênio com o câncer, outros mostram que o status desse elemento não tem relação com a neoplasia. Diversos trabalhos já mostraram que pequenas quantidades de selênio adicionadas na alimentação reduzem o risco do aparecimento de tumores em órgãos como a próstata, colon, reto, estômago, fígado e pulmão (GROMADZINSKA et al., 2008; WHANGER, 2004), mas o fato é que a sensibilidade em relação à prevenção do câncer pelo selênio varia de tumor para tumor.

No caso do melanoma, essa prevenção é ainda um pouco discutida. Herberg e colaboradores (2007) mostraram que a suplementação com antioxidantes, incluindo o selênio, aumentou o risco de câncer de pele em mulheres, mas não em homens. Já o grupo de Asgari publicou em 2009 um artigo contradizendo o estudo de Herberg, mostrando que a ingestão de antioxidantes não aumenta o risco de melanoma. Em 2010, nova publicação mostrou que terminado o período de suplementação alimentar com antioxidantes, homens e mulheres foram acompanhados por um período de cinco anos e não foi possível observar aumento da incidência de melanoma em ambos os sexos, mas também não foi observado nenhum efeito protetor contra o câncer (EZZEDINE et al., 2010).

Em relação ao tratamento do tumor de pele, as pesquisas são mais consistentes. Estudos *in vitro* mostraram que o selênio causa apoptose de uma maneira dose-dependente nas linhagens celulares de melanoma humano A375 (CHEN et al., 2008) e SK-MEL-28 (JARIWALLA; GANGAPURKAR; NAKAMURA, 2009). Outro importante estudo demonstrou diminuição significativa de metástases pulmonares em camundongos portando melanoma quando estes foram submetidos ao tratamento com selênio (SONG et al., 2009).

Ainda não se sabe o exato mecanismo de ação do selênio, mas tem sido proposto que ele exerce sua ação antitumorigênica por meio da inibição do crescimento celular pela regulação de p53, danos no DNA e apoptose, sendo este último o mecanismo mais aceito na literatura (FAIRWEATHER-TAIT et al., 2011; GROMADZINSKA et al., 2008). Compostos que contêm selênio no seu nível de oxidação +4 (selenito) possuem elevada atividade como um sequestrador de radicais livres e, conseqüentemente, como

um agente antitumoral (RAHDEN-STARON; SUCHOCKI; CZECZOT, 2010; SUCHOCKI et al., 2007).

#### 1.4. 1 Selol

O Selol é um composto orgânico sintetizado a partir de selenitotriglicerídeos de óleo de girassol, os quais possuem selênio tetravalente (+4) (Figura 17).

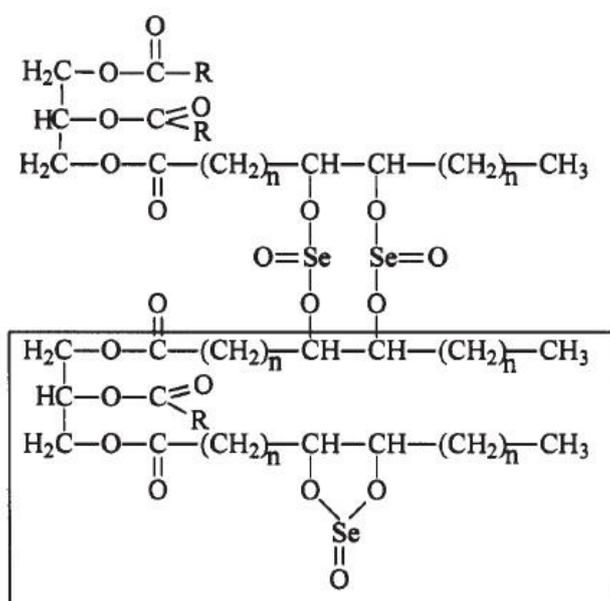


Figura 17. Estrutura do Selol (SUCHOCKI et al., 2007).

Suchocki e colaboradores (2007) mostraram que o Selol tornou sensíveis células leucêmicas resistentes a quimioterápicos, indicando que este composto poderia ser utilizado como agente quimiossensibilizador no tratamento do câncer. Outro dado importante da atividade antitumoral do Selol vem de estudos do nosso grupo de pesquisa, que mostraram, recentemente, que células de adenocarcinoma mamário foram mais afetadas do que células de mama normal quando ambas foram tratadas com nanocápsulas magnéticas contendo Selol, na ausência e presença de campo magnético alternado (ESTEVANATO et al., 2012b). Outro trabalho realizado com nanocápsulas magnéticas contendo Selol também mostrou queda de viabilidade em linhagens celulares de melanoma e de carcinoma oral de células escamosas quando foram tratadas com o nanocomposto de Selol e submetidas a um campo magnético de frequência alternada (FALQUEIRO et al., 2012).

Uma vantagem da utilização do Selol como substância antitumoral é que ele possui toxicidade extremamente baixa, uma vez que não foi possível estabelecer a DL50 por via subcutânea (sc) ou intraperitoneal (ip) em ratos, mesmo injetando Selol em concentrações de até 500 mg/kg sc e 100 mg/kg ip (JASTRZEBSKI et al., 1995). Além disso, dados recentes de ensaios de mutagenicidade utilizando a cepa bacteriana *Salmonella typhimurium* mostraram que o Selol não é um composto mutagênico (RAHDEN-STARON; SUCHOCKI; CZECZOT, 2010).

Os trabalhos que investigam o Selol como agente antitumoral vêm crescendo nos últimos anos e mais recentemente foi publicado por Ksiazek e colaboradores (2013) um estudo de expressão gênica em células normais e malignas de próstata, realizados em um painel contendo 84 genes envolvidos no estresse oxidativo e na defesa antioxidante. Os resultados mostraram as células de câncer de próstata sob a influência de Selol exibiram menor potencial de defesa antioxidante quando comparadas com as células normais nas mesmas condições. Resultados complementares indicaram que o Selol causou a diminuição da expressão de vários genes vitais nas células de câncer prostático (KSIAZEK et al., 2013).

Neste contexto, o presente trabalho associou Selol a nanopartículas de magnetita com a finalidade de potencializar o efeito antitumoral das nanopartículas magnéticas quando utilizadas para o tratamento do melanoma murino com magnetohipertermia.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVOS GERAIS

Investigar os efeitos biológicos e potenciais aplicações de um novo material nanoestruturado constituído de nanopartículas de magnetita e Selol.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Caracterizar o fluido magnético contendo Selol (FMS) em relação ao tamanho e morfologia das nanopartículas;
- 2) Avaliar a estabilidade de FMS ao longo de 48 meses;
- 3) Avaliar a toxicidade *in vitro* de diferentes concentrações de FMS por meio da análise de viabilidade de células de melanoma;
- 4) Analisar *in vitro* o processo de interiorização e retenção das nanopartículas de FMS pelas células tumorais;
- 5) Avaliar o potencial da amostra FMS em promover contraste em imagens de microtomografia computadorizada (microTC);
- 6) Avaliar a distribuição intratumoral da amostra FMS e a sua retenção no melanoma dos animais por meio de microTC;
- 7) Analisar *in vivo* a biocompatibilidade do FMS por meio de hemograma e ensaios bioquímicos, assim como de análises histológicas de diferentes órgãos dos animais;
- 8) Verificar o potencial de aquecimento da amostra FMS durante exposição a campo magnético de frequência alternada;

- 9) Realizar a magnetohipertermia nos animais administrados com FMS e analisar a eficácia desse procedimento em regredir o melanoma induzido nos animais ou de promover melhoras clínicas nos camundongos portadores de tumor.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 FLUIDOS MAGNÉTICOS FMS E FM

##### 3.1.1 Preparo das amostras

Fluidos magnéticos compostos de nanopartículas de magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) recobertas com bicamada de ácido láurico foram preparados por Fernando Cruvinel Damasceno, sob orientação da Profa. Dra. Emilia Celma de Oliveira Lima, do Instituto de Química da Universidade Federal de Goiás (UFG) - GO.

Resumidamente, as nanopartículas de magnetita foram obtidas a partir da coprecipitação dos íons  $\text{Fe}^{+2}$  e  $\text{Fe}^{+3}$  (0,1 e 0,05 mol/L, respectivamente) em meio alcalino (solução aquosa de hidróxido de sódio 1,6 mol/L). O precipitado negro de magnetita formado foi lavado diversas vezes com água e foi coletado com o auxílio de um ímã. Para a funcionalização com a bicamada de ácido láurico, 18 g do precipitado foram dissolvidos em 90 mL de água e aquecido a 75-80°C. Ácido láurico (3 g) foi adicionado lentamente sob agitação contínua, o que causou a dispersão espontânea das nanopartículas no meio aquoso. A suspensão foi resfriada à temperatura ambiente e filtrada para remover o excesso de ácido láurico. A solução foi dializada contra água deionizada, o pH foi ajustado para 7.0 – 7.2, produzindo uma amostra denominada FM.

Para preparar a amostra FMS, 0,3 g de Selol dissolvidos em 3 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) foram adicionados a 70 mL da amostra FM e mantida sobre agitação por 48 h. A suspensão foi esterilizada utilizando uma membrana de 0,22  $\mu\text{m}$  e a amostra foi denominada FMS. O Selol (5% de selênio) foi fornecido por pesquisadores da Universidade Médica de Varsóvia, na Polônia (JASTRZEBSKI et al., 1995).

O grupo da profa. Emilia Lima realizou a caracterização dos fluidos FMS e FM quanto ao diâmetro físico utilizando a técnica de difração de raios x, diâmetro hidrodinâmico pela técnica de espalhamento de luz dinâmico e potencial zeta. A quantidade de ferro das amostras foi determinada pela técnica de absorção atômica e para a amostra FMS também foi feita a dosagem da quantidade de selênio pela técnica de Espectroscopia de Emissão Atômica com Plasma Indutivamente Acoplado (ICP-AES) e, assim, estimada a quantidade de Selol.

As amostras FM e FMS foram armazenadas a 4°C e trazidas à temperatura ambiente antes da realização de cada experimento.

### **3.1.2 Caracterização do tamanho das nanopartículas por Microscopia Eletrônica de Transmissão**

O diâmetro físico e a morfologia das nanopartículas foram determinados por microscopia eletrônica de transmissão (MET).

Os fluidos magnéticos FMS e FM foram diluídos em água milli-Q na proporção 1:400 e 3 µL dessa diluição foram colocados sobre telas de cobre cobertas com Formvar 0,5%. Após a secagem dessa solução na tela, foi feita uma fixação e contrastação com vapor de tetróxido de ósmio 1% durante 20 minutos. As telas de cobre foram analisadas no microscópio eletrônico (JEOL JEM 1011) do Laboratório de Microscopia Eletrônica do Departamento de Biologia Celular da Universidade de Brasília. As imagens foram adquiridas em diferentes campos e os diâmetros de 300 nanopartículas foram medidos com o auxílio do software Image-Pro Plus versão 5.1. Os histogramas de distribuição de tamanho das nanopartículas foram construídos e as curvas de distribuição normal foram ajustadas utilizando o programa GraphPad Prism versão 5.0.

### **3.1.3 Caracterização do tamanho e potencial zeta das nanopartículas no instrumento Zetasizer**

A distribuição do diâmetro hidrodinâmico e o potencial zeta das nanopartículas foram analisados ao longo do tempo utilizando o equipamento Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments).

A medida do tamanho foi feita pela técnica de espalhamento de luz dinâmico e o potencial zeta foi o parâmetro escolhido para avaliar a estabilidade da dispersão coloidal. O potencial zeta é o potencial elétrico existente entre a superfície da partícula e o líquido dispersante no plano de cisalhamento, e esse valor ajuda a compreender os processos de dispersão e agregação das nanopartículas. Assim, o potencial zeta fornece não só a carga elétrica superficial dos materiais nanoparticulados, mas também sua magnitude dá uma indicação da estabilidade do sistema coloidal.

Para a caracterização do tamanho e estabilidade, soluções de FMS e FM foram preparadas na diluição 1:100 em água milli-Q e todas as medidas foram feitas em

triplicata e nas temperaturas de 25 e 37°C. Os dados foram coletados em 24, 36 e 48 meses após o preparo das nanopartículas.

### 3.1.4 Aquecimento dos fluidos magnéticos no campo magnético alternado

Para testar o aquecimento das nanopartículas magnéticas submetidas a um campo magnético de frequência alternada (CMA), alíquotas de 1 mL das amostras FMS e FM foram colocadas em microtubos e estes foram posicionados no centro da bobina do equipamento que gera CMA (MagneTherm, NanoTherics) (Figura 18).



**Figura 18.** Equipamento gerador de campo magnético de frequência alternada (MagneTherm, NanoTherics). À esquerda, osciloscópio; ao centro, a bobina geradora do campo magnético; e à direita, a fonte de tensão.

Para este experimento foi utilizada onda quadrada, bobina de 17 voltas e os diferentes conjuntos de capacitores utilizados permitiu testar cinco diferentes frequências do CMA: 110, 165, 330, 467 e 624 kHz. A operação do equipamento, assim como os ajustes de voltagem e amperagem realizados na fonte e no osciloscópio, seguiram as instruções contidas no manual do instrumento. Em cada frequência testada, os tubos foram incubados por 30 minutos e a temperatura foi registrada a cada minuto usando o termômetro digital MT 525 (Minipa). Alíquotas de 1 mL de água também foram testadas para o aquecimento, sendo utilizadas como controle negativo. Imagens termográficas capturadas utilizando-se uma câmera infravermelha (FLIR InfraCAM, FLIR Systems) foram obtidas de todas as amostras nos tubos no momento antes e imediatamente após saírem do CMA. Antes da aquisição das fotos, a câmera foi calibrada manualmente de modo a fornecer a mesma escala de temperatura, a fim de

permitir a comparação entre as diferentes amostras em uma mesma condição ou entre diferentes frequências de uma mesma amostra.

Alíquotas com volumes menores (25, 50, 100, 120, 140 e 160  $\mu\text{L}$ ) do fluido FMS também foram testadas para avaliar a quantidade mínima necessária para o aquecimento adequado para a realização da magnetohipertermia, utilizando a condição de 330 kHz, onda quadrada e bobina de 17 voltas. As alíquotas foram deixadas no equipamento por 30 minutos e as temperaturas foram medidas a cada minuto.

### 3.1.5 Microtomografia computadorizada

Os experimentos de microtomografia computadorizada (microTC) *in vitro* e *in vivo* (item 3.3.5) foram realizados no microtomógrafo SkyScan 1076 (SkyScan) (Figura 19).



**Figura 19.** Equipamento de microtomografia computadorizada, modelo 1076 (SkyScan).

Para os experimentos *in vitro*, alíquotas de FMS, FM, Selol, contraste iodado e água foram colocadas em microtubos e estes foram inseridos dentro de tubos do tipo Falcon contendo água. Os tubos foram escaneados utilizando-se os seguintes parâmetros: 50 kV, 180  $\mu\text{A}$ , filtro de Al 0,5 mm, 100 ms de exposição, e tamanho do pixel de 35  $\mu\text{m}$ . As reconstruções das imagens foram feitas utilizando-se os parâmetros mais adequados de *smoothing*, correção de artefatos de anel, e correção de *beam-*

*hardening*. Para efeitos comparativos, os parâmetros de aquisição e reconstrução foram iguais para todas as amostras.

As análises foram feitas no software CT-Analyser da SkyScan, versão 1.11.4.2. A quantificação da atenuação de raios x por Unidades de Hounsfield (HU) foi feita através de uma calibração de densidade utilizando-se água como o padrão e seguindo o protocolo fornecido pelo equipamento.

## **3.2 EXPERIMENTOS *IN VITRO***

### **3.2.1 Linhagem celular de melanoma B16-F10**

Para os experimentos *in vitro*, foi utilizada a linhagem celular B16-F10 de melanoma murino (ATCC<sup>®</sup> CRL-6475<sup>™</sup>).

As células foram rotineiramente mantidas em frascos de cultura celular de 75 cm<sup>2</sup> em meio de cultura RPMI-1640 (Gibco) suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado (Gibco), 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina (Gibco). As células foram mantidas em estufa a 37°C em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Quando atingiam 80 a 90% de confluência nos frascos de cultura (a cada 2 ou 3 dias), as células eram soltas do fundo do frasco por adição de 0,25% de tripsina (Gibco) por 5 minutos e posteriormente centrifugadas a 1500 rpm por 5 minutos.

### **3.2.2 Viabilidade celular por MTT**

A avaliação da citotoxicidade induzida pelos fluidos magnéticos sobre as células de melanoma foi feita pelo método de MTT (*3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide*), que é um ensaio que mede a viabilidade das células através da quantificação da redução do reagente MTT em um composto roxo, conhecido como formazan. Esta redução é feita por desidrogenases mitocondriais de células que estão metabolicamente ativas, portanto, a quantificação dos cristais de formazan fornece o percentual de células viáveis.

Para este ensaio,  $2 \times 10^3$  células B16-F10 foram plaqueadas em placas de 96 poços. A quantificação das células foi realizada por meio de contagem direta em câmara de Neubauer, utilizando o corante Azul de Tripán 0,4% (Sigma). Após 24 horas do plaqueamento, as células foram incubadas com meio de cultura contendo FMS e FM em

diferentes concentrações (150; 75; 37,5; 18; 9 e 4,5 µg Fe/mL de meio de cultura) por 24 e 48 horas. Como controle positivo de citotoxicidade as células foram incubadas com DMSO 5% e como controle negativo elas não foram submetidas a nenhum tratamento e foram incubadas somente com meio de cultura. Após 24 e 48 horas, o meio de cultura contendo FMS, FM ou DMSO foi retirado e adicionou-se meio de cultura contendo MTT (5 mg/mL, Invitrogen) na proporção 1:10. Essa solução foi deixada em contato com as células por 2 horas em estufa a 37°C e atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Após a incubação, o meio de cultura com MTT foi retirado, os cristais de formazan formados foram solubilizados com 200 µL de Dimetilsufóxido (DMSO, Vetec) e o produto foi quantificado a 595 nm no espectrofotômetro SpectraMax M2 (Molecular Devices). A porcentagem de viabilidade celular foi calculada como a razão entre a média de absorbância das leituras em quadruplicata para cada concentração testada e a média de absorbância dos poços utilizados como controle negativo, onde:

$$\text{Viabilidade celular} = [(m\u00e9dia A_{amostra}) / (m\u00e9dia A_{controle})] \times 100$$

Foram realizados quatro experimentos independentes e o resultado final foi a média desses quatro ensaios.

### 3.2.3 Detecção de nanopartículas de ferro por Coloração de Perls

Para avaliar se as nanopartículas magnéticas dos fluidos FMS e FM possuíam a capacidade de serem interiorizadas pelas células de melanoma murino, foi realizada a técnica de coloração de Perls, que marca a presença de ferro em células ou tecido com uma coloração azul.

Células B16-F10 foram cultivadas em placas de 24 poços (6×10<sup>3</sup> células/ poço) contendo lamínulas circulares de vidro em cada poço e meio de cultura RPMI-1640 (Gibco). Após as células aderirem nas lamínulas por 24 horas, o meio de cultura foi retirado e foi colocado meio de cultura contendo FMS ou FM em diferentes concentrações (150; 75; 37,5; 18; 9 e 4,5 µg Fe/mL de meio de cultura). Como controle negativo, células não foram incubadas com nenhum tratamento e o poço continha somente meio de cultura. Todos os tratamentos foram incubados por 4, 8, 24 e 48h. Após esses tempos, o meio de cultura foi retirado, as células foram lavadas 3 vezes com PBS 1x e foram submetidas à coloração de Perls, segundo protocolo descrito por

Villanueva *et. al.* (2009), com adaptações, conforme descrito a seguir. As células aderidas às lamínulas foram fixadas com metanol gelado por 5 minutos e após a fixação, foram coradas com uma solução de ferrocianeto de potássio 2% e HCl 2% (misturados na hora na proporção v/v de 1:1) durante 15 minutos. Depois as células foram novamente lavadas três vezes com PBS 1x e foram contra-coradas com uma solução de Vermelho Rápido Nuclear 0,5% (Sigma) durante 15 minutos. As células foram lavadas em PBS 1x para retirar o excesso de corante, as lamínulas foram retiradas dos poços e montadas em lâminas para microscopia utilizando meio de montagem aquoso (5% de gelatina em glicerol e água destilada na mesma proporção v/v). As lâminas foram visualizadas e fotomicrografadas em microscópio de luz Leica DM 750 com câmera Leica DFC 295 (Leica Microsystems), nos aumentos de 20 e 40x.

### 3.2.4 Interiorização celular das nanopartículas magnéticas por MET

A interiorização das nanopartículas magnéticas dos fluidos FMS e FM foi visualizada por MET.

As células B16-F10 foram plaqueadas em uma densidade de  $1,5 \times 10^4$  células/poço em placas de 6 poços. Após aderirem na placa por 24 h, as células foram incubadas com os fluidos magnéticos na concentração de 37,5  $\mu\text{g Fe/mL}$  por 24 h. Após esse período, as células foram lavadas com PBS 1x, coletadas por centrifugação (2000 rpm por 5 minutos) após digestão com tripsina 0,25% (Gibco) e processadas para análises de MET de acordo com protocolo seguido por Carneiro *et. al.* (2011), descrito a seguir. As células foram fixadas em fixador Karnovsky (2% de glutaraldeído, 2% de paraformaldeído e 3% de sacarose em 0,1 M de tampão cacodilato de sódio em pH 7.2) por 1 h, lavadas em tampão cacodilato de sódio 0,1 M e pós-fixadas por 50 minutos em uma solução contendo 1% de tetróxido de ósmio, 0,8% de ferrocianeto de potássio e 10 mM de cloreto de cálcio em tampão cacodilato de sódio 0,2 M. As células foram lavadas em água destilada e depois foram contrastadas *in bloc* com acetato de uranila 0,5% durante 16 h a 4°C. As amostras foram desidratadas utilizando-se um gradiente crescente de acetona (de 50 a 100%) e incubando-as por 10 minutos em cada solução. As células foram embebidas em resina Spurr e cortes ultrafinos foram realizados no ultramicrotomo Leica EM UC7 (Leica Microsystems). Os cortes foram visualizados e fotomicrografados em microscópio eletrônico JEOL JEM 1011 a 80 kV.

### 3.3 EXPERIMENTOS *IN VIVO*

#### 3.3.1 Animais

Neste estudo foram utilizados camundongos fêmeas da linhagem C57BL/6, com 10 a 12 semanas de idade. Os animais foram fornecidos pelo Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área da Ciência em Animais de Laboratório (CEMIB) da Universidade Estadual de Campinas (Unicamp) - SP e foram mantidos no Biotério do Departamento de Genética e Morfologia da Universidade de Brasília durante a fase experimental. Os camundongos foram alojados em gaiolas de ventilação individual com temperatura controlada, submetidos a um ciclo claro/escuro de 12/12 horas e receberam água filtrada e ração balanceada *ad libitum*. Todos os procedimentos utilizados para anestesia e eutanásia dos animais estão em acordo com os métodos recomendados pelas diretrizes internacionais de ética animal e o presente projeto de doutorado foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Medicina da UnB através do número 140199/2012 (Anexo I).

#### 3.3.2 Indução de melanoma nos animais

Para a indução experimental do tumor de pele nos animais,  $5 \times 10^5$  células da linhagem B16-F10 suspensas em 50 $\mu$ L de PBS foram inoculadas subcutaneamente no flanco dos camundongos sob anestesia intraperitoneal com 10 mg/kg de xilazina e 90 mg/kg de cetamina.

Para estabelecer uma curva de crescimento do melanoma, os animais foram acompanhados por até 21 dias e o peso corporal e o tamanho do nódulo tumoral foram medidos periodicamente. Os camundongos foram pesados em balança digital AY 220 (Marte) e a medida do tumor foi feita com um paquímetro digital (Digimess) a partir do sétimo dia de inoculação tumoral, quando os nódulos tornavam-se mensuráveis. O volume tumoral foi determinado segundo a equação utilizada por Yu (2013):

$$Volume = comprimento \times (largura)^2 \times 0,52$$

Todos os experimentos *in vivo* foram realizados após 7 dias da inoculação do tumor, o que significava um tamanho aproximado de 5 mm de diâmetro no maior eixo do nódulo tumoral (aproximadamente 45 mm<sup>3</sup> de volume).

### 3.3.3 Microtomografia computadorizada

Para os experimentos *in vivo* de microTC, os camundongos com melanoma foram divididos em dois grupos: [1] os que receberam 40 µL de FMS (735 µg de Fe total e 231 µg de Selol) e [2] os que receberam 40 µL de FM (832 µg de Fe total), ambos com injeção intratumoral (n = 4 em cada grupo). Todos os animais foram tomografados antes da injeção das nanopartículas, logo após a administração das mesmas e 2, 6, 12, 24, 48 e 72 h após a injeção das amostras. Para todas as aquisições, os camundongos foram anestesiados com 10 mg/kg de xilazina e 90 mg/kg de cetamina intraperitoneal, colocados no equipamento na posição decúbito ventral e a parte do corpo onde estava o tumor foi escaneada. Os parâmetros utilizados para os escaneamentos foram os mesmos para todos os animais, sendo feito com 50 kV, 180 µA, filtro de Al 0,5 mm, 100 ms de exposição e tamanho do pixel de 35 µm. Os escaneamentos duraram aproximadamente 8 minutos para cada animal. As reconstruções das imagens também foram feitas utilizando os mesmos parâmetros de correção de *smoothing*, *beam-hardening* e artefatos de anel.

Todas as análises foram feitas no software CT-Analyser da SkyScan, versão 1.11.4.2. A quantificação da atenuação de raios x por Unidades de Hounsfield (HU) foi feita através de uma calibração de densidade utilizando-se água como o padrão e seguindo o protocolo fornecido pelo equipamento.

### 3.3.4 Ensaios de biocompatibilidade – toxicidade aguda

Para acessar a toxicidade das nanopartículas magnéticas *in vivo*, alguns órgãos do camundongo foram avaliados quanto à presença de nanopartículas e quanto a alterações histológicas após injeção intratumoral de FMS e FM.

Os animais foram divididos em quatro grupos: camundongos portadores de melanoma e que foram injetados com [1] 40 µL de FMS (n = 12), [2] FM (n = 12) ou [3] PBS (n = 6), e [4] camundongos sem tumor (n = 6). Metade dos animais foi eutanasiada 24 h após a injeção das nanopartículas e a outra metade foi sacrificada 7

dias após a administração das amostras. Os órgãos (fígado, baço, rins, pulmão e cérebro) foram coletados, fixados e processados histologicamente conforme descrito no item 3.4. As lâminas foram analisadas juntamente com o patologista Marcos Célio de Almeida, do Departamento de Genética e Morfologia do Instituto de Biologia da UnB, e nas análises foi observado se havia presença de alterações histológicas, infamação, células tumorais (como resultado de uma possível metástase) e nanopartículas magnéticas nos tecidos. O padrão de distribuição das nanopartículas nos tumores também foi observado.

O sangue dos animais também foi coletado: uma parte do sangue foi coletada em tubos contendo EDTA para posterior análise hematológica e a outra parte foi coletada em tubos sem anticoagulante e posteriormente centrifugada a 3000 rpm por 10 min a 4°C para se obter o soro para as análises bioquímicas. As análises hematológicas foram realizadas no analisador hematológico veterinário automatizado pocH-100iV Diff (Sysmex) e os parâmetros analisados foram: eritrócitos, hemoglobina, hematócrito, volume corpuscular médio, hemoglobina corpuscular média, concentração de hemoglobina corpuscular média, largura de distribuição dos eritrócitos, leucócitos totais, linfócitos, neutrófilos e monócitos, eosinófilos, plaquetas, volume plaquetário médio, razão de macroplaquetas e largura de distribuição de plaquetas. As análises bioquímicas foram realizadas em parceria com o Laboratório Clínico Sabin e os parâmetros analisados foram: bilirrubina total, bilirrubina direta, bilirrubina indireta, aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), fosfatase alcalina, ureia, creatinina e ferro sérico.

### 3.3.5 Magnetohipertermia

Para o tratamento do melanoma com magnetohipertermia, animais com tumor foram divididos em quatro grupos: [1] animais que foram injetados com PBS e que não tiveram nenhum tratamento (n=6), [2] animais injetados com PBS e submetidos ao CMA (n=6), [3] animais injetados com FMS e submetidos ao CMA (n=12) e [4] animais injetados com FM e submetidos ao CMA (n=12). Todas as injeções de amostra foram aplicadas por via intratumoral. Os camundongos submetidos ao CMA foram anestesiados com 10 mg/kg de xilazina e 90 mg/kg de cetamina intraperitoneal e colocados no centro da bobina de 17 voltas do equipamento gerador de CMA por 30 minutos, na frequência de 330 kHz. Este regime de tratamento foi aplicado em 3 dias

consecutivos e todos os animais foram pesados e tiveram seu tumor medido nesses dias. Metade dos camundongos de cada grupo foi eutanaziada 1 dia após o término do ciclo de tratamento (1 ciclo = 3 dias de tratamento, sendo 30 minutos em cada dia) e a outra metade foi acompanhada por 7 dias e só então sacrificada para a coleta de amostras biológicas. O sangue foi coletado para as análises hematológicas e bioquímicas conforme descrito no item 3.3.4 e a análise estatística foi realizada somente na comparação entre grupos biologicamente relevantes entre si. O tumor foi coletado para análises por microTC e avaliação histopatológica. Para a histologia, os tumores foram fixados e processados conforme descrito no item 3.4. As lâminas foram analisadas e as áreas de necrose tumoral foram avaliadas através da porcentagem de área necrótica em relação à área total do tumor, utilizando o programa Image J versão 1,47t.

### **3.4 PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO**

As etapas do processamento histológico para órgãos e tumores foram feitas conforme descritas a seguir. Os tecidos foram fixados em fixador de Davidson (20% formaldeído, 10% glicerina, 30% etanol em água destilada) durante 20 horas à temperatura ambiente e mantidos em etanol 70% por pelo menos 24 horas. Após essa etapa, os tecidos foram colocados no equipamento Histotécnico DM-40 (Oma) para o processamento automático das etapas de desidratação, diafanização e banhos de parafina. A desidratação foi feita em soluções de concentrações crescentes de etanol (80, 90 e 100%) durante 1 hora em cada solução, sendo realizadas ao todo três incubações em etanol 100%. Em seguida, os tecidos foram incubados em solução 1:1 de etanol 100% : xilol por 1 hora. Prosseguiu-se com a diafanização, a qual foi realizada em dois banhos de xilol puro, com 45 minutos cada. Para a inclusão, os tecidos passaram por dois banhos de parafina de 1 h 30 min cada e depois o material foi montado manualmente em bloco de parafina (Vetec). Após a solidificação do bloco, foi utilizado o micrótomo Leica RM2125 RT (Leica Microsystems) para a obtenção de cortes de 5 µm de espessura. Os cortes foram montados em lâminas de microscopia e estas foram mantidas em estufa a 37°C por duas horas para uma melhor aderência do material à lâmina. As lâminas foram coradas com hematoxilina e eosina (HE) ou coloração de Perls e Vermelho Rápido Nuclear. Os processos de rehidratação e desidratação, comuns aos dois protocolos de coloração, e as etapas de coloração de cada

um estágio descritos na Tabela 3. Todas as etapas do processamento histológico foram realizadas à temperatura ambiente.

Após a coloração, as lâminas foram montadas em lamínulas de vidro utilizando-se Bálsamo do Canadá (Vetec) como meio de montagem. As lâminas foram analisadas e documentadas digitalmente no microscópio de luz Zeiss Axioskop 2 (Zeiss) com câmera AxioCam MRc (Zeiss).

**Tabela 3.** Processamento para coloração com hematoxilina e eosina (HE) ou coloração com reagente de Perls.

Rehidratação	Coloração				Desidratação
	HE		Perls		
Xilol 100% 60 s	Hematoxilina 60 s	Água 60 s	Água 60 s	Etanol 70% 60 s	
Xilol 100% 60 s	Água 60 s	Água 60 s	Água 60 s	Etanol 80% 60 s	
Xilol 100% 60 s	Eosina 60 s	Perls 20 min		Etanol 90% 60 s	
Etanol 100% 60 s	Água 60 s	Água 30 s		Etanol 100% 60 s	
Etanol 90% 60 s		Água 30 s		Xilol 100% 60 s	
Etanol 80% 60 s		Vermelho Rápido 5 min		Xilol 100% 60 s	
Etanol 70% 60 s		Água 60 s		Xilol 100% 60 s	
		Água 60 s			

### 3.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Todas as análises estatísticas foram realizadas no programa SPSS versão 17.0. 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, o pós-teste de Bonferroni foi

escolhido para as comparações múltiplas. Para os resultados significativos de Kruskal-Wallis, o teste de Mann-Whitney foi utilizado para verificar diferenças entre grupos (comparações 2 a 2).

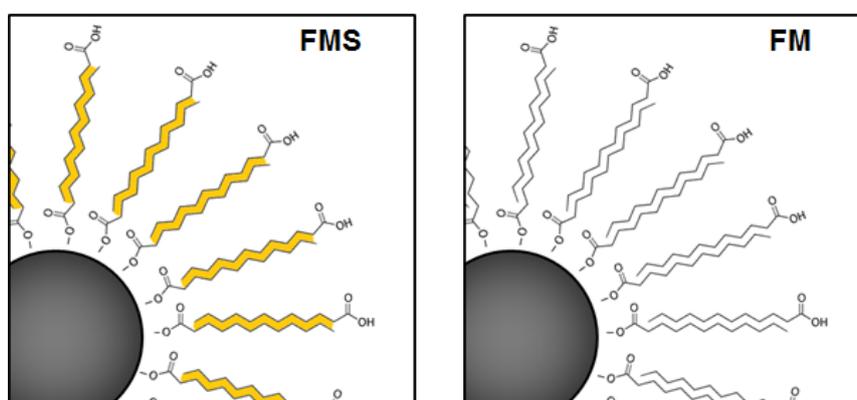
Nos resultados de estabilidade e distribuição do tamanho das nanopartículas ao longo do tempo (item 3.1.3), viabilidade celular por MTT (item 3.2.2) e quantificação dos fluidos ao longo do tempo por microTC (item 3.3.3), análises de variância (ANOVA) de medidas repetidas seguidas do teste de Bonferroni (para dados normalizados) ou teste de Friedman seguido pelo teste de Wilcoxon (para dados não normalizados) foram realizados para verificar diferenças no mesmo grupo ao longo do tempo.

Valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 CARACTERIZAÇÃO PRÉVIA DOS FLUIDOS MAGNÉTICOS

As amostras de fluido magnético FMS e FM foram preparadas e caracterizadas pelo grupo coordenado pela Profa. Dra. Emilia Lima, do Instituto de Química da Universidade Federal de Goiás. A amostra FM é constituída de nanopartículas de magnetita cobertas com bicamada de ácido láurico e a amostra FMS é a amostra FM acrescida de Selol, conforme esquematizado na Figura 20.



**Figura 20.** Esquema das nanopartículas de magnetita cobertas com bicamada de ácido láurico. FMS representa as nanopartículas contendo Selol e FM as nanopartículas sem a adição de Selol.

Ambos os fluidos magnéticos já foram entregues caracterizados quanto ao seu diâmetro físico e hidrodinâmico médio, potencial zeta e quantidade de ferro e selênio, como mostrado na Tabela 4.

**Tabela 4.** Caracterização dos fluidos magnéticos FMS e FM feita pelo grupo da Profa. Emilia Lima.

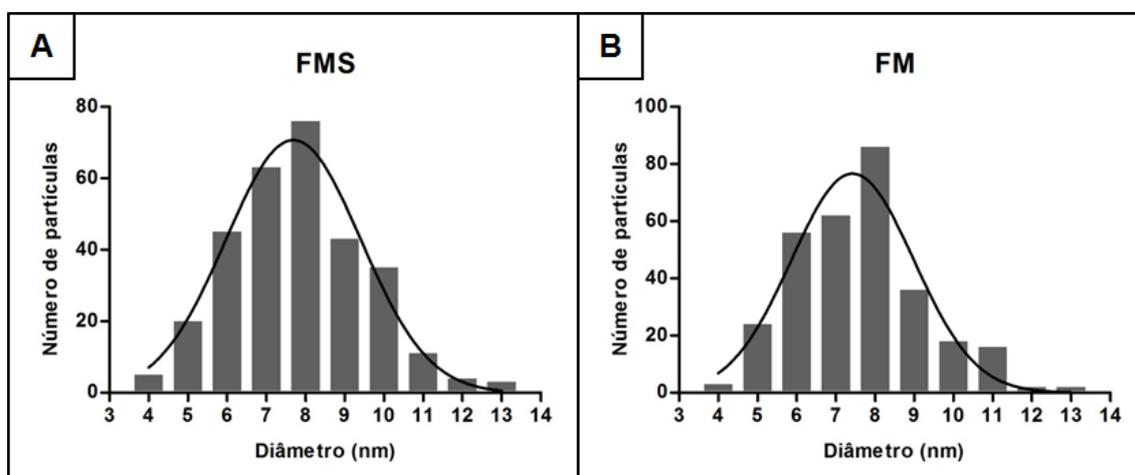
	FMS	FM
Diâmetro físico das NPM (nm) Técnica: Difração de raios x	7,64	7,64
Diâmetro hidrodinâmico médio (nm) Técnica: Espalhamento de luz dinâmico	91,7	84,3
Potencial zeta (mV) em pH 7.2 Técnica: Zetasizer	-46,1	-40,1
Concentração de ferro (mg/mL) Técnica: Absorção atômica	18,38	20,81
Concentração de selênio (mg/mL) Técnica: ICP-AES	0,289	---

A concentração de selênio determinada para a amostra FMS foi de 0,289 mg/mL, o que dá uma concentração nominal de Selol de 5,78 mg/mL, já que o Selol utilizado no preparo das amostras possui 5% de selênio.

## 4.2 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE FMS E FM

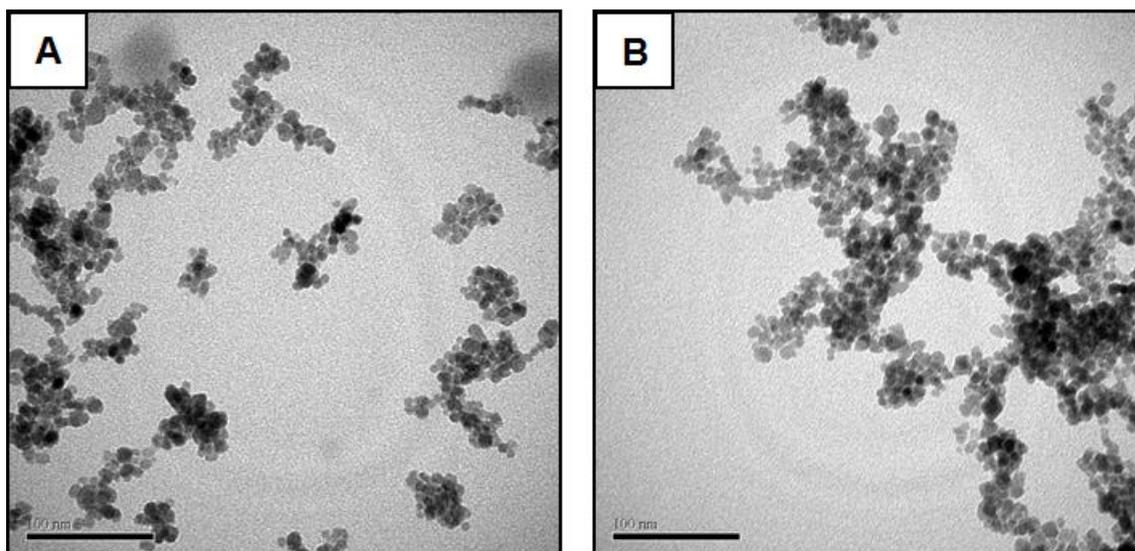
### 4.2.1 Diâmetro físico e forma das nanopartículas

Para confirmar a caracterização do tamanho físico das nanopartículas e também para visualizar a morfologia das mesmas, foi feita a microscopia eletrônica de transmissão (MET). A distribuição de tamanho das nanopartículas obedeceu a curva log normal e os gráficos mostraram que FMS e FM possuem uma distribuição de tamanho monomodal (Figura 21). O diâmetro médio encontrado para o fluido FMS e FM foi de 8,3 e 8,1 nm, respectivamente, sendo próximos dos resultados obtidos pelo grupo da Profa. Emilia Lima, pela técnica de difração de raios x (Tabela 4).



**Figura 21.** Caracterização do tamanho das nanopartículas feita por microscopia eletrônica de transmissão. (A) Distribuição do diâmetro físico das nanopartículas do fluido FMS e (B) do fluido FM.

As imagens de MET mostraram que ambos os fluidos possuem nanopartículas de forma esférica (Figura 22).



**Figura 22.** Fotomicrografias dos fluidos magnéticos FMS e FM por microscopia eletrônica de transmissão. Em (A), fluido FMS e em (B), fluido FM. Em ambos, nota-se a morfologia relativamente esférica das nanopartículas e pouca variabilidade em relação ao tamanho. As nanopartículas de FMS apresentaram-se menos agregadas em relação às nanopartículas de FM.

#### 4.2.2 Diâmetro hidrodinâmico e potencial zeta das nanopartículas

Para acessar o tamanho e a estabilidade das nanopartículas ao longo do tempo, dados sobre o diâmetro hidrodinâmico e potencial zeta foram coletados em 24, 36 e 48 meses após o preparo das amostras.

O diâmetro hidrodinâmico e o índice de polidispersividade (IPD) foram verificados pela técnica de espalhamento de luz dinâmico e as medidas foram feitas a 25 e 37°C (Tabela 5).

**Tabela 5.** Valores do diâmetro médio e IPD, determinados pela técnica de espalhamento de luz dinâmico, para as amostras FMS e FM ao longo do tempo e em diferentes temperaturas.

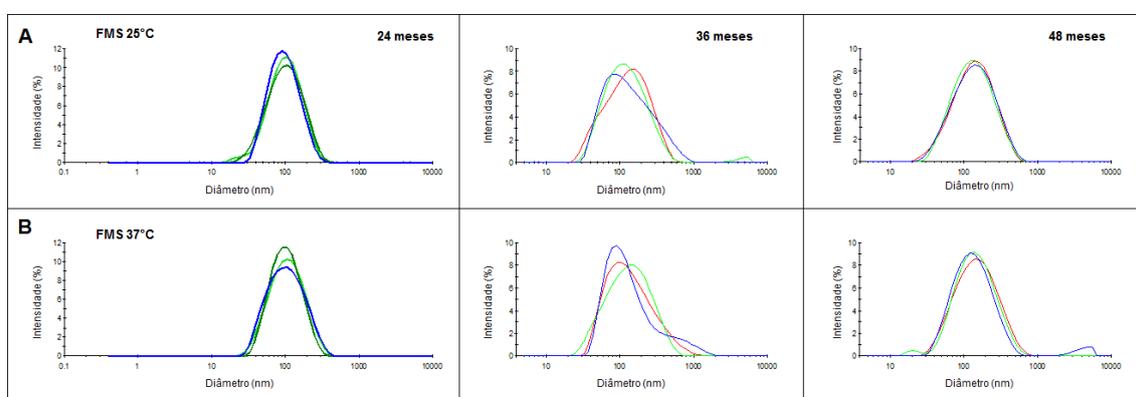
	24 meses		36 meses		48 meses	
	d (nm)	IPD	d (nm)	IPD	d (nm)	IPD
FMS 25°C	87,06 ± 0,36	0,20	103,60 ± 2,05	0,29	114,60 ± 1,49	0,25
FMS 37°C	91,05 ± 1,62	0,20	110,20 ± 1,65	0,27	121,10 ± 2,37	0,27
FM 25°C	85,81 ± 0,59	0,17	107,90 ± 1,01	0,31	130,20 ± 0,54	0,30
FM 37°C	90,26 ± 1,21	0,16	115,50 ± 1,82	0,30	139,10 ± 1,05	0,30

d = diâmetro hidrodinâmico; IPD = índice de polidispersividade.

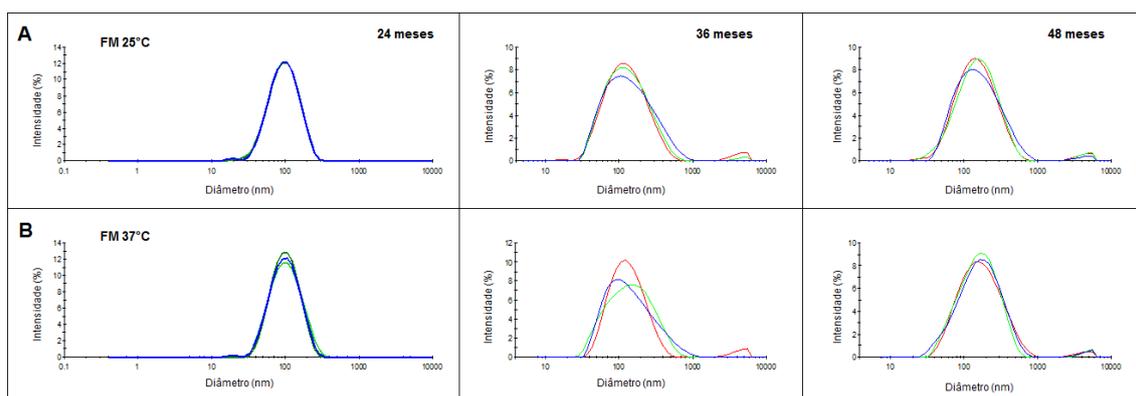
Os resultados mostraram uma tendência de aumento de tamanho para ambas as amostras ao longo do tempo. Apesar desse comportamento, o aumento não foi estatisticamente significativo para nenhum dos dois fluidos magnéticos ( $p=0,05$ ). Os

dados de IPD indicaram que as amostras possuem distribuição de tamanho homogênea, já que os valores obtidos foram menores que 0,30.

Verificou-se também que nas medidas realizadas a 37°C, o diâmetro das nanopartículas foi sempre maior quando comparado às medidas a 25°C, apesar desses resultados também não serem significativos ( $p=0,05$ ) (Figuras 23 e 24). Além disso, é possível observar que as nanopartículas do fluido FMS aumentaram menos de tamanho (acompanhado de IPD também menores) em tempos mais longos de análise, como em 36 e 48 meses após o preparo das amostras, embora nenhum desses dados tenha mostrado diferenças estatísticas.



**Figura 23.** Gráficos do diâmetro hidrodinâmico da amostra FMS obtidos pela técnica de espalhamento de luz dinâmico. (A) Resultado obtido à temperatura ambiente e ao longo do tempo. (B) Resultado obtido a 37°C e ao longo do tempo.



**Figura 24.** Gráficos do diâmetro hidrodinâmico da amostra FM obtidos pela técnica de espalhamento de luz dinâmico. (A) Resultado obtido à temperatura ambiente e ao longo do tempo. (B) Resultado obtido a 37°C e ao longo do tempo.

Para avaliar a estabilidade das suspensões coloidais de FMS e FM à temperatura ambiente e a 37°C, foram realizadas medidas do potencial zeta no equipamento Zetasizer. Os dados obtidos foram sintetizados na Tabela 6.

**Tabela 6.** Caracterização da estabilidade dos fluidos magnéticos FMS e FM, obtida através da medida do potencial zeta ao longo do tempo e em diferentes temperaturas.

	24 meses	36 meses	48 meses
<b>FMS 25°C</b>	-48,50 ± 1,16	-50,00 ± 1,36	-50,70 ± 2,12
<b>FMS 37°C</b>	-41,70 ± 0,66	-37,20 ± 0,95	-43,90 ± 0,81
<b>FM 25°C</b>	-39,70 ± 1,56	-43,40 ± 0,46	-42,10 ± 0,75
<b>FM 37°C</b>	-33,70 ± 0,58	-36,90 ± 0,17	-35,00 ± 0,38

Os resultados mostraram que não houve diferença estatística em relação ao potencial zeta de cada amostra em determinada temperatura ao longo do tempo. Nas medidas realizadas a 37°C o valor absoluto do potencial zeta de ambas as amostras foi menor quando comparado aos valores medidos à temperatura ambiente, indicando menor estabilidade em temperaturas mais elevadas. Para a amostra FM essa diferença foi significativa em 24 e 36 meses ( $p=0,046$ ), mas para outros tempos e na amostra FMS não foi demonstrada diferença estatística ( $p=0,05$ ).

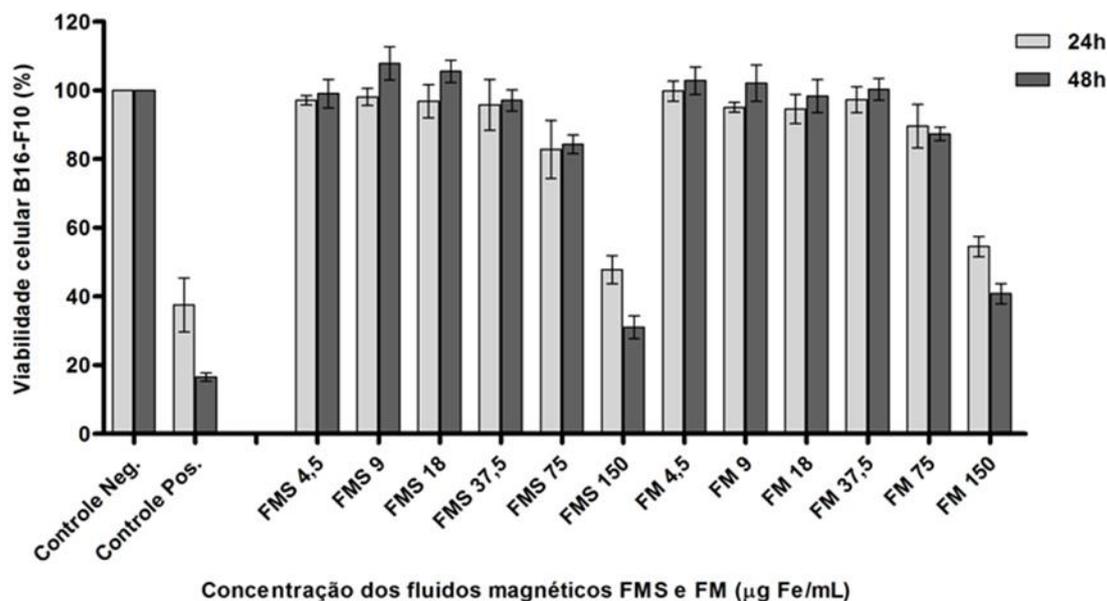
É notório o aumento do valor absoluto do potencial zeta para a amostra FMS em relação à FM em todos os tempos e temperaturas analisadas. A 25°C, esses resultados não se mostraram significativos ( $p=0,05$ ), mas a 37°C a amostra FMS mostrou-se mais estável que o fluido FM em 24 meses após o preparo das nanopartículas ( $p=0,046$ ). Esses dados sugerem que a adição de Selol às nanopartículas pode conferir maior estabilidade ao fluido magnético, pelo menos quando as amostras se encontram a 37°C.

### 4.3 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DOS FLUIDOS FMS E FM

Os fluidos magnéticos foram avaliados quanto à sua citotoxicidade. Células imortalizadas de melanoma da linhagem B16-F10 foram incubadas com FMS e FM em diferentes concentrações por 24 e 48 h e a viabilidade celular foi então medida.

As análises estatísticas dos resultados mostraram que os fluidos magnéticos não foram tóxicos nas concentrações testadas até 37  $\mu\text{g Fe/mL}$ , mantendo a viabilidade celular próxima de 100%. Na concentração de 75  $\mu\text{g Fe/mL}$ , a incubação com FMS manteve aproximadamente 84% das células viáveis e a incubação com FM manteve 88% de viabilidade, ambos os resultados considerando 24 e 48 h. Com as amostras na concentração de 150  $\mu\text{g Fe/mL}$ , entretanto, a viabilidade das células diminuiu para quase 50% em 24 h para ambos os fluidos e para 31% e 40,7% quando o tratamento foi feito por 48 h com FMS e FM, respectivamente (Figura 25).

Os resultados também indicaram que FMS e FM induzem o mesmo efeito citotóxico nas células tumorais de melanoma, pois não houve diferença entre a viabilidade das células tratadas com FMS e FM nas mesmas concentrações e no mesmo tempo ( $p>0,05$ ).

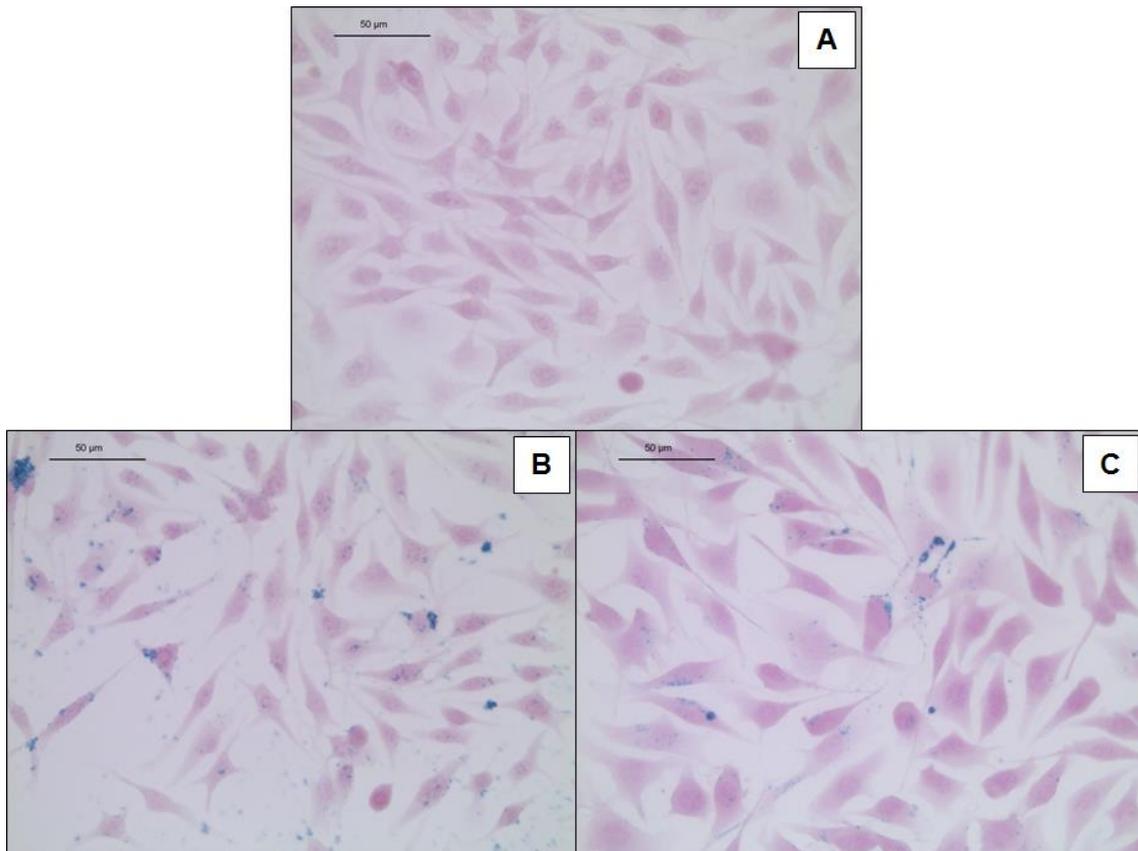


**Figura 25.** Análise da viabilidade das células de melanoma B16-F10 submetidas ao tratamento com FMS e FM em diferentes concentrações, por um período de 24 e 48 horas.

#### 4.4 INTERIORIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS

A magnetohipertermia pode ser mais efetiva se as células tumorais tiverem a habilidade de interiorizar as nanopartículas ou retê-las em sua superfície por um tempo prolongado. Para avaliar se as células de melanoma seriam capazes de interiorizar ou reter as nanopartículas magnéticas de FMS e FM, inicialmente foram feitos experimentos de coloração com Perls. A marcação com o corante de Perls resalta de azul a presença de ferro nas células ou tecido.

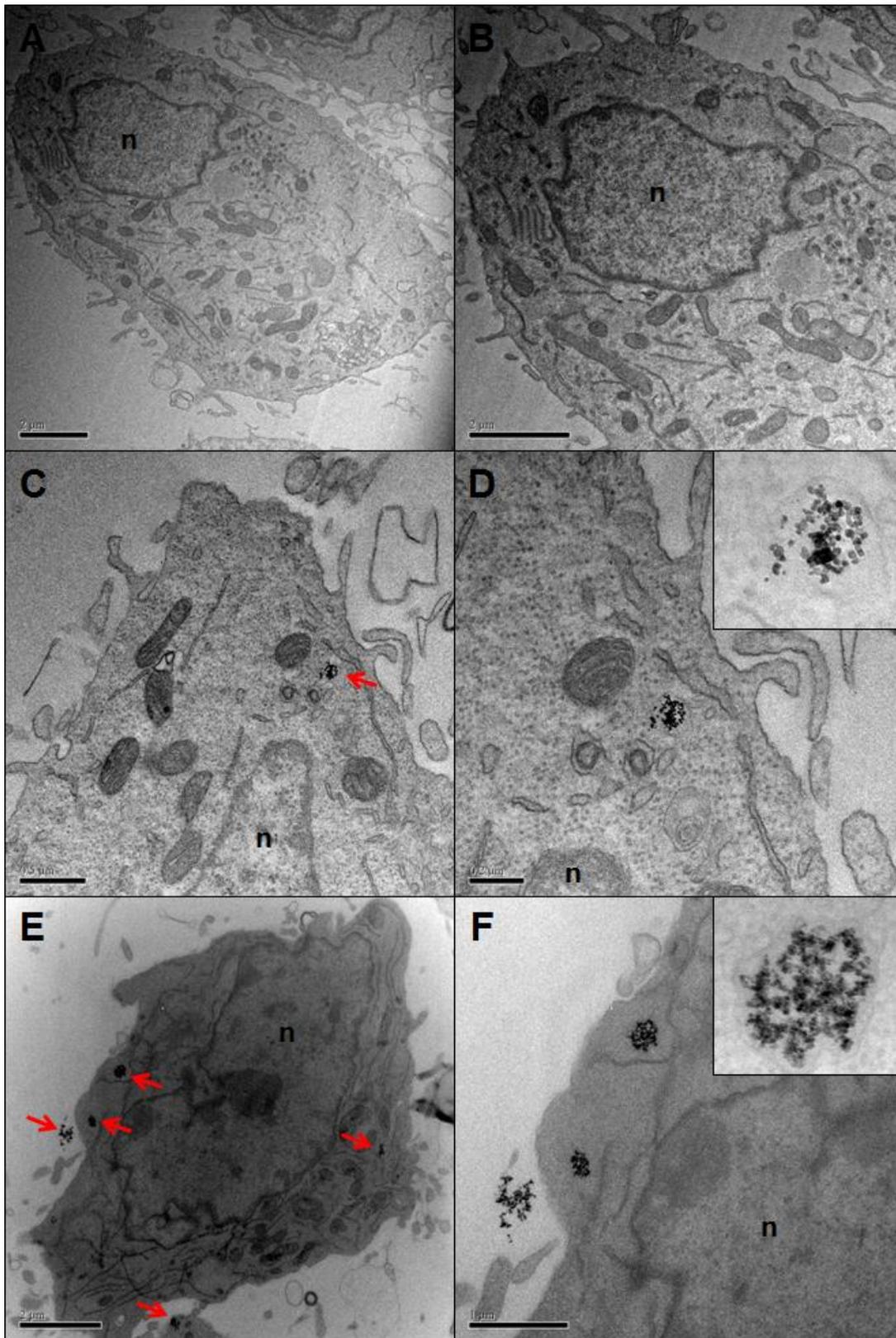
As células B16-F10 foram incubadas por 4, 8, 24 e 48 h com os fluidos magnéticos nas mesmas concentrações não tóxicas testadas anteriormente para o ensaio de MTT. Os resultados mostraram que as células de melanoma murino são capazes de reter em sua superfície e/ ou interiorizar as nanopartículas dos fluidos FMS e FM em todos os tempos analisados. Imagens representativas deste ensaio são mostradas na Figura 26.



**Figura 26.** Imagens de microscopia de luz das células B16-F10 marcadas com coloração de Perl's. (A) Células utilizadas como controle negativo de marcação que não foram tratadas com fluidos magnéticos. (B) Células incubadas com FMS ou (C) com FM por 8 h na concentração de 37,5 µg Fe/ mL.

Para verificar se as nanopartículas estavam apenas retidas na superfície ou realmente interiorizadas pelas células, foi realizada a MET. As células B16-F10 foram tratadas com os fluidos magnéticos por 24 h na concentração de 37,5 µg Fe/ mL.

As fotomicrografias mostraram as nanopartículas magnéticas de FMS e de FM no citoplasma das células e localizadas dentro de estruturas semelhantes a vesículas, o que indica que as nanopartículas foram interiorizadas provavelmente a partir de um processo de endocitose (Figura 27).

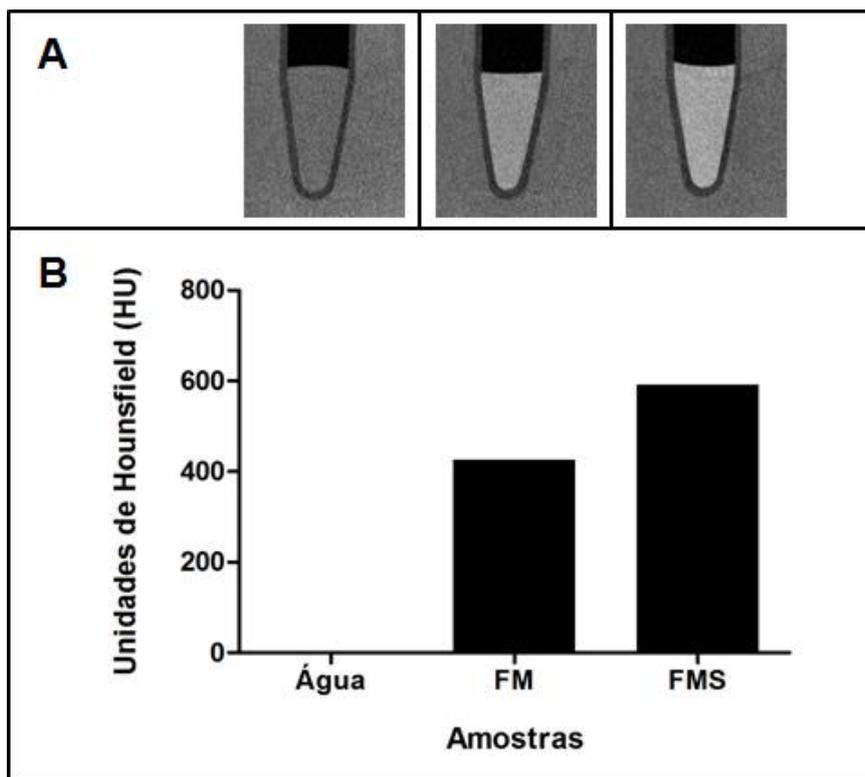


**Figura 27.** Fotomicrografia eletrônica de células de melanoma B16-F10 incubadas ou não com nanopartículas magnéticas. (A e B) Células controle, as quais não tiveram contato com nanopartículas. (C e D) Células incubadas com fluido FMS. (E e F) Células incubadas com fluido FM. Setas vermelhas indicam as nanopartículas magnéticas e (n) mostra o núcleo das células. O detalhe em D e F mostram as nanopartículas dentro de estruturas semelhantes a vesículas.

#### 4.5 NANOPARTÍCULAS COMO CONTRASTE PARA MICROTOMOGRAFIA COMPUTADORIZADA

Para que uma nanopartícula se torne multifuncional e possa ser utilizada não só na terapia das doenças, mas que também seja capaz de diagnosticar e realizar seu acompanhamento, moléculas podem ser adicionadas no interior ou na superfície da nanopartícula e com isso permitir sua visualização em diferentes modalidades de imagem. Imagens por ressonância magnética e tomografia computadorizada são muito utilizadas como diagnóstico e prognóstico do câncer. O uso das nanopartículas magnéticas em ressonância magnética é bem estabelecido na literatura, devido ao contraste promovido pelo núcleo magnético da nanopartícula. Neste trabalho, foi investigado se as nanopartículas magnéticas dos fluidos FMS e FM poderiam ser utilizadas como meio de contraste em microtomografia computadorizada (microTC). Esta técnica está disponível em nosso laboratório e é uma ferramenta versátil para a investigação *in vivo*, porque permite imagens com alta resolução.

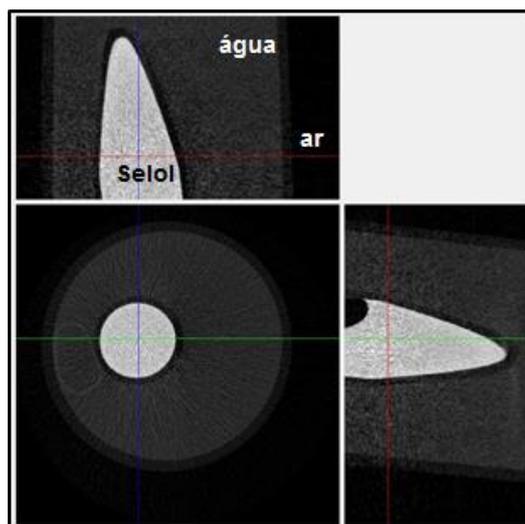
Para testar as amostras FMS e FM quanto à sua capacidade de ser um agente de contraste para exames de microTC, inicialmente foi feito um ensaio *in vitro*. Alíquotas dos fluidos magnéticos foram colocadas em microtubos e estes foram colocados dentro de tubos Falcon contendo água. Essa estratégia tinha o objetivo de simular o corpo de um camundongo, já que o tubo Falcon tem aproximadamente a mesma largura do animal. As amostras foram escaneadas e, após a reconstrução, as imagens foram quantificadas em unidades de Hounsfield (HU) (Figura 28).



**Figura 28.** Imagens de microtomografia e quantificação da densidade obtida com as amostras FMS e FM. (A) Imagens obtidas do escaneamento de água (controle negativo) e das amostras FMS e FM no microtomógrafo, onde alíquotas foram colocadas dentro de microtubos e estes inseridos em tubos Falcon contendo água. (B) Quantificação da densidade obtida com os fluidos magnéticos.

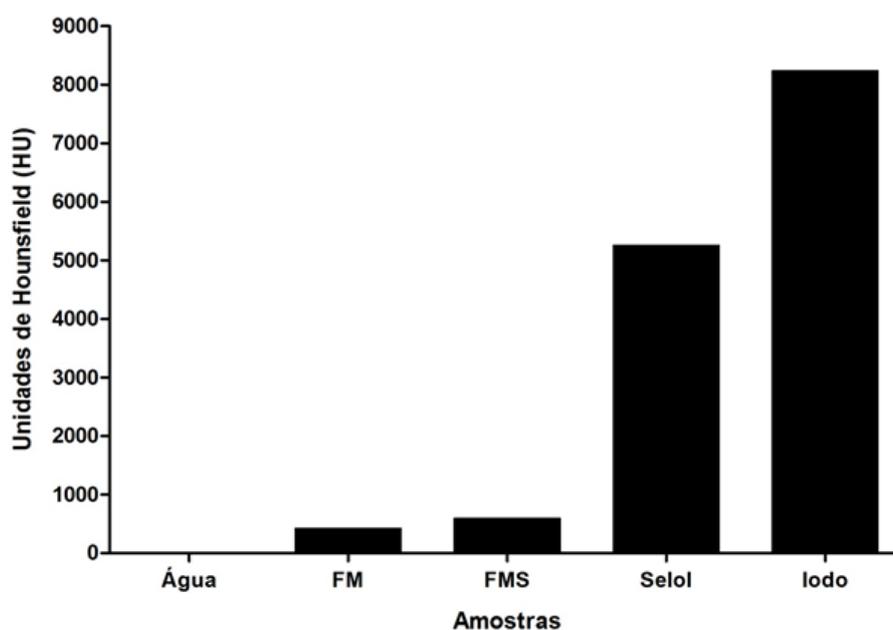
Pode-se perceber pelas imagens que as amostras FMS e FM possuem maior absorção de raios x em relação ao meio externo, que é a água, mostrando que os fluidos podem ser detectados em imagens de microTC (Figura 28A). Além disso, é possível observar que FMS possui maior densidade em relação a FM, o que pode ser demonstrado na quantificação exibida no gráfico da Figura 28.

Este ensaio também foi realizado utilizando-se água (como controle negativo), outros meios de contraste iodados de uso clínico (controle positivo) e Selol (Figura 29). Foi demonstrado que o Selol apresentou elevado poder de absorção de raios x, indicando que este composto também seria um bom meio de contraste para microTC (Figura 29).



**Figura 29.** Imagem de microtomografia do Selol puro. Uma alíquota do Selol foi colocada dentro de um tubo Falcon contendo água e este foi submetido ao escaneamento. As imagens mostram a elevada densidade proveniente do Selol.

Apesar dos fluidos FMS e FM demonstrarem boa atenuação de raios x nas imagens de microTC, quando as amostras eram comparadas com o contraste obtido por um agente iodado, FMS apresentava 14 vezes menos densidade do que o iodo, enquanto o fluido FM possuía um contraste quase 20 vezes menor (Figura 30). Ainda nesta comparação com o agente à base de iodo, o Selol continuou a mostrar um excelente potencial para visualização em microTC.



**Figura 30.** Quantificação da densidade obtida com os fluidos magnéticos, Selol puro e um agente à base de iodo em imagens de microTC. A água foi utilizada como controle negativo.

#### 4.6 AQUECIMENTO DAS AMOSTRAS NO CAMPO MAGNÉTICO DE FREQUÊNCIA ALTERNADA

Antes de se utilizar nanopartículas magnéticas para hipertermia, uma questão importante a ser investigada é a capacidade de aquecimento dessa amostra. Para isso, os fluidos FMS e FM foram testados quanto à sua capacidade de aquecer quando submetidos a um campo magnético de frequência alternada.

No equipamento de magnetohipertermia, foram avaliadas cinco frequências diferentes (Tabela 7) para escolher a melhor condição, aquela que seria utilizada nos experimentos *in vivo*. Os valores de voltagem e amperagem para cada frequência foram obtidos no equipamento após o ajuste desses parâmetros seguindo o manual do instrumento. Os valores de campo magnético foram calculados com base na tensão, corrente e frequência.

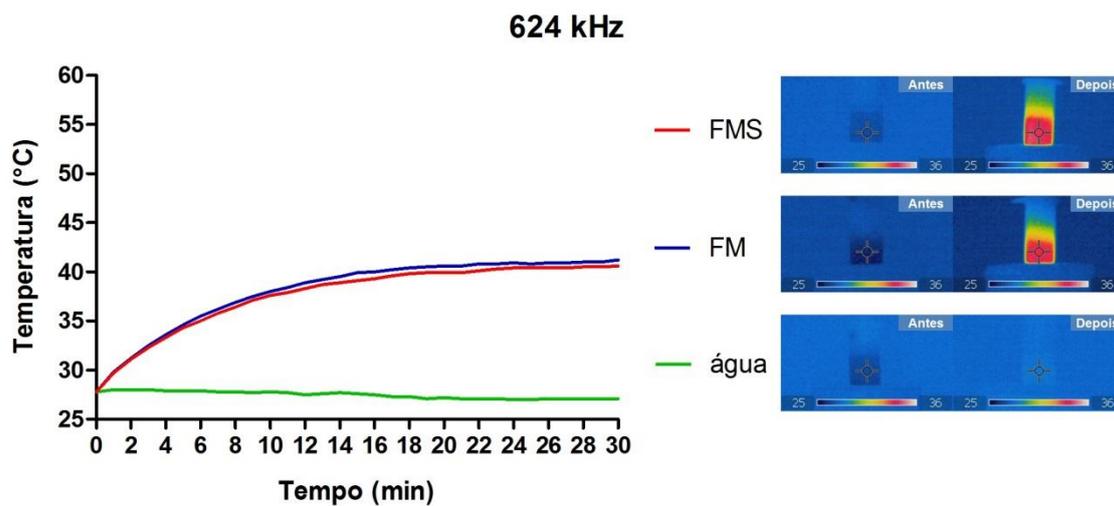
**Tabela 7.** Valores de tensão (voltagem), corrente (amperagem) e campo magnético obtidos durante os ensaios *in vitro* de aquecimento de fluidos magnéticos.

Frequência nominal (kHz)	Tensão (V)	Corrente (A)	Campo Magnético (mT)
110	27,1	8,3	18
165	24,1	6,7	14
330	26,9	5,2	12
467	25	3,7	10
624	20,1	1,9	7

kHz = quilohertz; V = volt; A = ampère; mT = militesla.

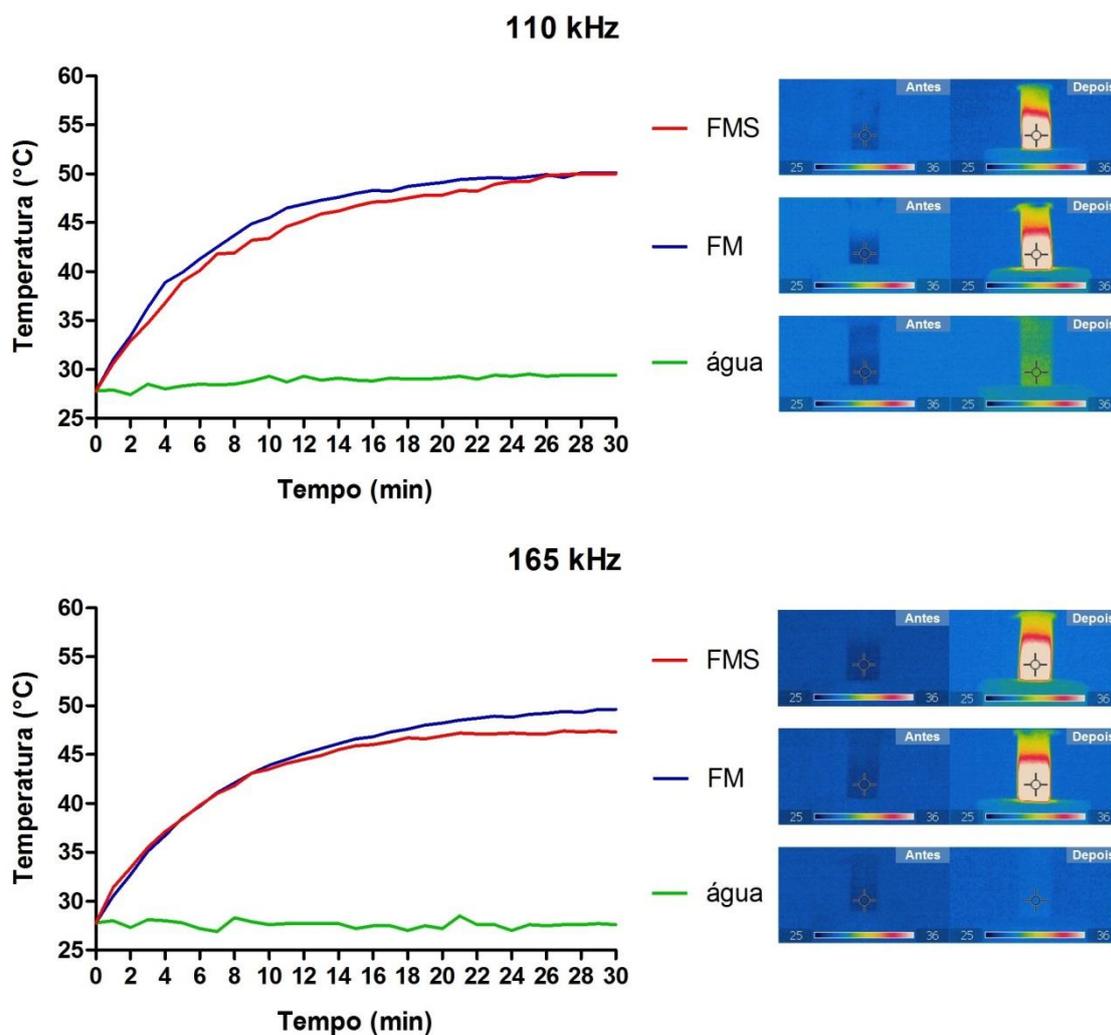
Alíquotas de FMS, FM e água foram colocadas no centro da bobina do equipamento gerador de campo magnético e a temperatura foi medida durante 30 minutos. As duas amostras de fluido magnético mostraram aumentos de temperatura similares nas mesmas condições testadas.

Os menores aumentos de temperatura foram encontrados quando o campo magnético alternado (CMA) estava a uma frequência de 624 kHz, no qual a temperatura máxima alcançada foi de 41,2°C em 30 minutos para o fluido FM, condições estas não adequadas para o tratamento de hipertermia (Figura 31).



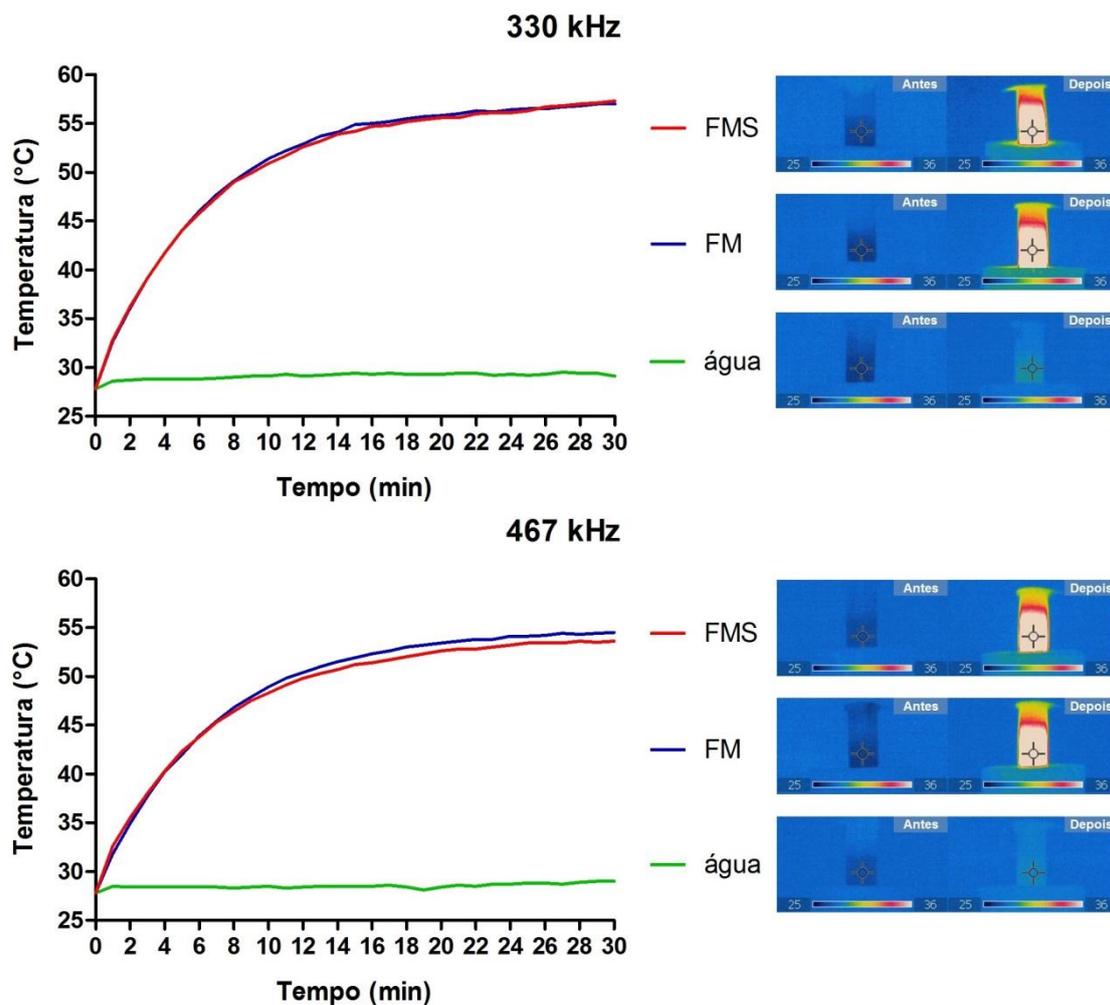
**Figura 31.** Curva de aquecimento e imagens termográficas para as amostras FMS, FM e água (controle) quando colocadas no equipamento gerador de CMA a uma frequência de 624 kHz.

Um aquecimento intermediário foi alcançado nas frequências de 110 e 165 kHz, com temperaturas máximas em torno de 50°C para ambos os fluidos no final do tempo (50°C para FMS e 50,1°C para FM a 110 kHz; 47,3°C para FMS e 49,6°C para FM a 165 kHz). No entanto, os aumentos de temperatura nessas condições não foram muito estáveis (Figura 32).



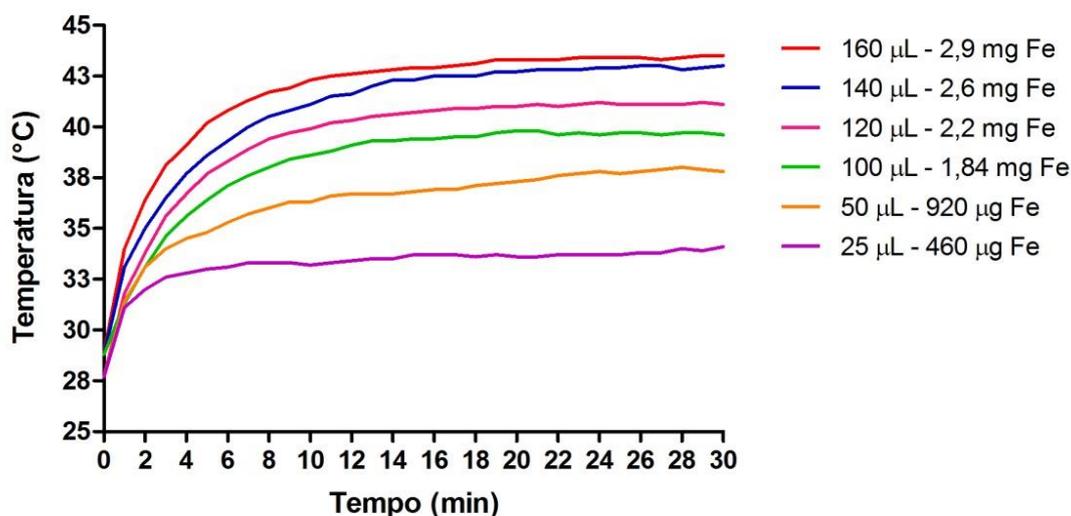
**Figura 32.** Curvas de aquecimento e imagens termográficas para as amostras FMS, FM e água (controle) quando colocadas no equipamento gerador de CMA nas frequências de 110 e 165 kHz.

Aumentos de temperatura maiores e mais estáveis foram obtidos a 330 e 467 kHz, com a temperatura máxima chegando a 57°C para FMS e FM a 330 kHz (Figura 33). Além disso, nessas condições, uma temperatura alta o suficiente para o tratamento com hipertermia (44°C) foi atingida em apenas 5 minutos após o início do CMA. Para as outras condições testadas essa mesma temperatura demorou o dobro de tempo para ser alcançada. Assim, a condição escolhida para realizar a magnetohipertermia nos animais foi de 330 kHz.



**Figura 33.** Curvas de aquecimento e imagens termográficas para as amostras FMS, FM e água (controle) quando colocadas no equipamento gerador de CMA nas frequências de 330 e 467 kHz.

Alíquotas contendo pequenos volumes da amostra FMS também foram testadas para o aquecimento na condição escolhida de 330 kHz (Figura 34). Os resultados mostraram que com volumes de 25, 50 e 100  $\mu\text{L}$  a amostra alcançou temperaturas máximas de 34, 38 e 40°C, respectivamente. A partir de 120  $\mu\text{L}$ , FMS foi capaz de aquecer a 41°C e com 140 e 160  $\mu\text{L}$ , o fluido magnético aqueceu até 43 e 43,5°C, respectivamente.



**Figura 34.** Curvas de aquecimento para pequenos volumes da amostra FMS quando colocados no equipamento gerador de CMA na frequência de 330 kHz. A legenda mostra o volume testado e a quantidade de ferro total contida naquele volume.

## 4.7 ENSAIOS *IN VIVO*

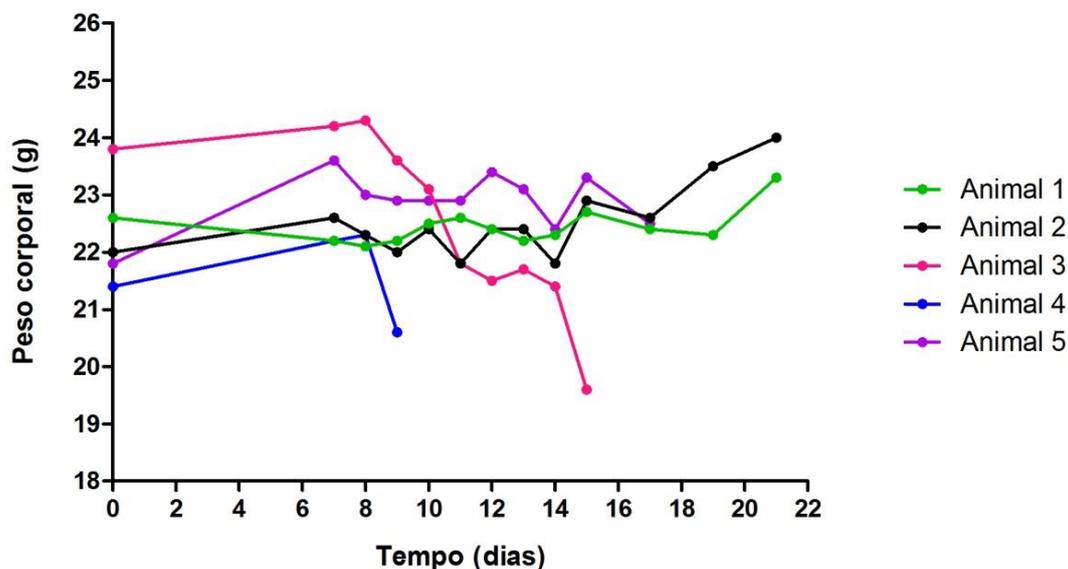
### 4.7.1 Estudo do modelo animal de melanoma

Experimentos *in vivo* também foram realizados para prosseguir com a caracterização da nova amostra de fluido magnético contendo Selol. Para esses ensaios, foi utilizado o modelo de melanoma em camundongos.

O estabelecimento da quantidade de células tumorais a ser injetada nos animais e as condições de injeção foram os primeiros passos para conhecer a característica de crescimento do modelo de melanoma murino.

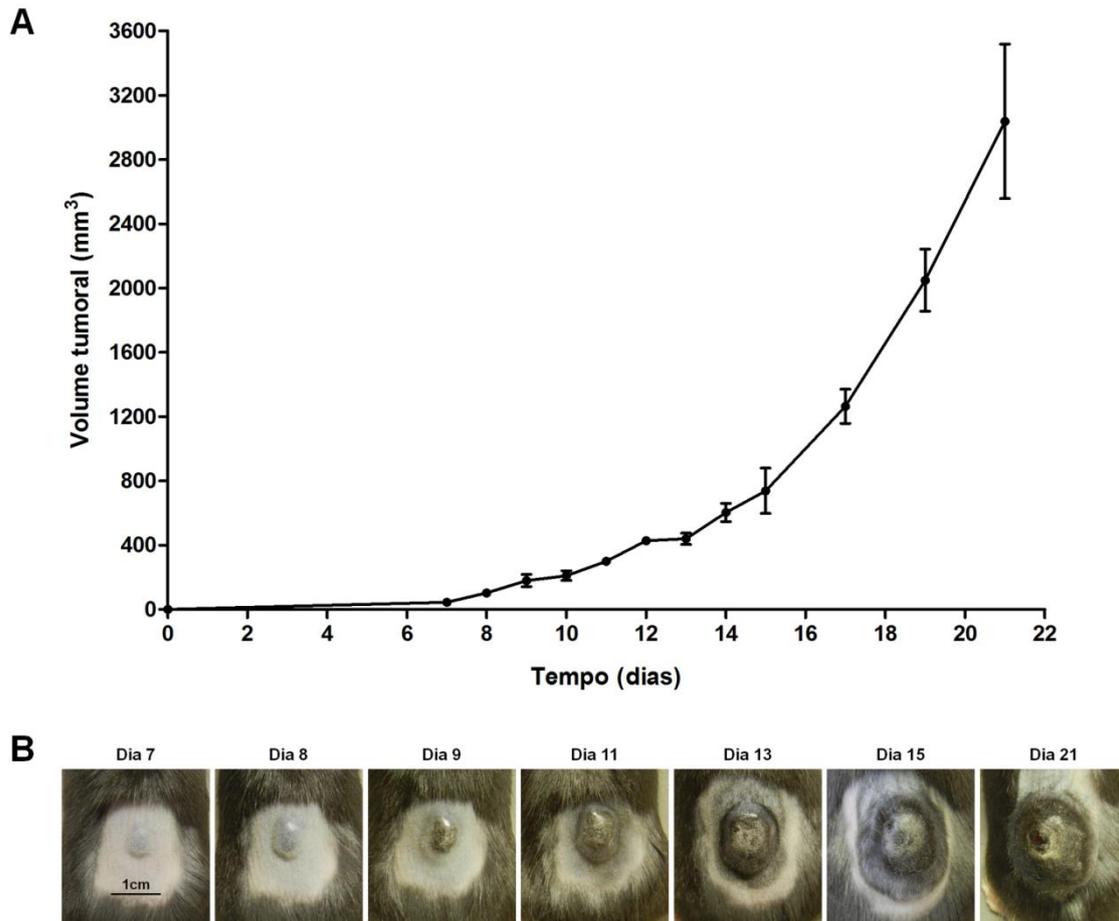
Os camundongos foram injetados subcutaneamente com células B16-F10 e foram acompanhados por 21 dias. O peso dos animais (Figura 35) e as dimensões do tumor (Figura 36) foram registrados a partir do aparecimento do nódulo tumoral, no sétimo dia. Como mostrado na Figura 35, não houve muita variação no peso dos animais ao longo do crescimento do tumor. Dentre os cinco animais utilizados para esse ensaio, três morreram espontaneamente antes de completar 21 dias com tumor. Os animais 4 e 3 morreram no 9º e 15º dias, respectivamente, e tiveram uma grande diminuição no peso antes de morrerem (20,6 g para o animal 4 e 19,6 g para o animal 3). Os dois animais que sobreviveram até o 21º dia (animais 1 e 2) tiveram um aumento

de peso no final do experimento, provavelmente provocado pela grande massa tumoral que carregavam.



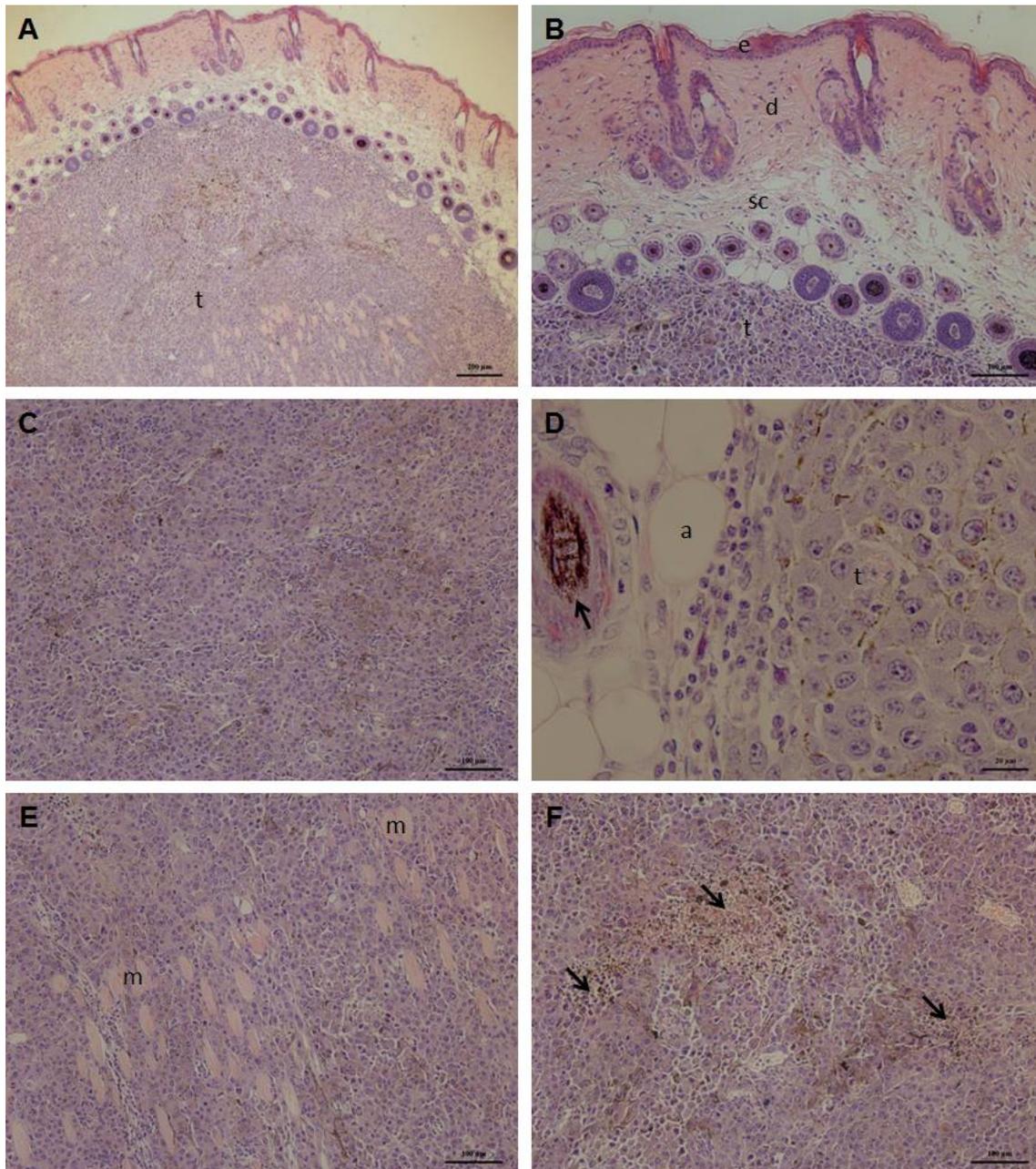
**Figura 35.** Peso corporal de camundongos (n=5) acompanhados durante o desenvolvimento do melanoma, após injeção subcutânea de células B16-F10.

Em relação ao tumor, observou-se que ele apresentou um crescimento muito rápido, dobrando seu volume em quase todos os dias (Figura 36). Além disso, ao analisar macroscopicamente os tumores, foi observado que quando o nódulo tumoral ficava muito grande havia uma espécie de rompimento da fina camada de pele que o cercava, formando um abcesso por onde se verificava o constante sangramento do tumor. Fotos do animal 1 foram registradas e esse fenômeno pode ser observado a partir do dia 13 (Figura 36B), porém mais nitidamente no dia 21.



**Figura 36.** Monitoração do desenvolvimento do melanoma nos animais durante 21 dias. **(A)** Curva de crescimento do tumor de camundongos (n=5) que foram subcutaneamente injetados com células B16-F10. **(B)** Fotografias dos tumores de um camundongo representativo nos dias 7, 8, 9, 11, 13, 15 e 21.

Os tumores também foram histopatologicamente avaliados após o sacrifício dos animais (Figura 37). As lâminas coradas com hematoxilina e eosina (HE) mostraram tumores com extensas áreas de acúmulo de melanina e típicas áreas de necrose coagulativa na região central do tumor. De modo geral, o estabelecimento do tumor não provocou reação inflamatória, sendo localizadas pequenas áreas isoladas de infiltrado inflamatório. Além disso, foram identificados, nas células tumorais, nucléolos bem evidentes, o que indica que a célula é bastante sintética e ativa. Mitoses anormais (tripolares) também foram identificadas no tumor. A presença de tecido muscular entre as células tumorais sugere que o tumor estava invadindo tecidos adjacentes (Figura 37E). Também foi possível observar a implantação subcutânea do nódulo tumoral, indicando sucesso no estabelecimento do modelo tumoral.



**Figura 37.** Análise histopatológica do melanoma murino corado com hematoxilina e eosina. **(A)** Visão geral do tumor (t), mostrando o estabelecimento do modelo tumoral subcutâneo. **(B)** Magnificação de (A), onde e = epiderme, d = derme, sc = região subcutânea, t = tumor. **(C)** Áreas marrons de acúmulo de melanina. **(D)** Detalhe mostrando a melanina (pigmento marrom) nas células tumorais (t) e no pelo do camundongo, indicado pela seta. A foto também mostra a localização do tumor, em meio aos adipócitos (a) da região subcutânea. **(E)** Tecido muscular (m) entre as células tumorais. **(F)** As setas indicam áreas necróticas no centro do tumor.

Juntos, os resultados dos pesos dos animais durante 21 dias, o registro de mortes espontâneas durante esse acompanhamento, o rápido aumento de volume tumoral e as análises histopatológicas com indicação de invasão tumoral demonstram a agressividade do modelo de melanoma murino induzido subcutaneamente com células B16-F10.

#### 4.7.2 Biocompatibilidade dos fluidos magnéticos

A biocompatibilidade de nanopartículas magnéticas implica em elas serem hemocompatíveis, biodegradáveis e não tóxicas ao organismo, de modo a permitir sua utilização como terapia.

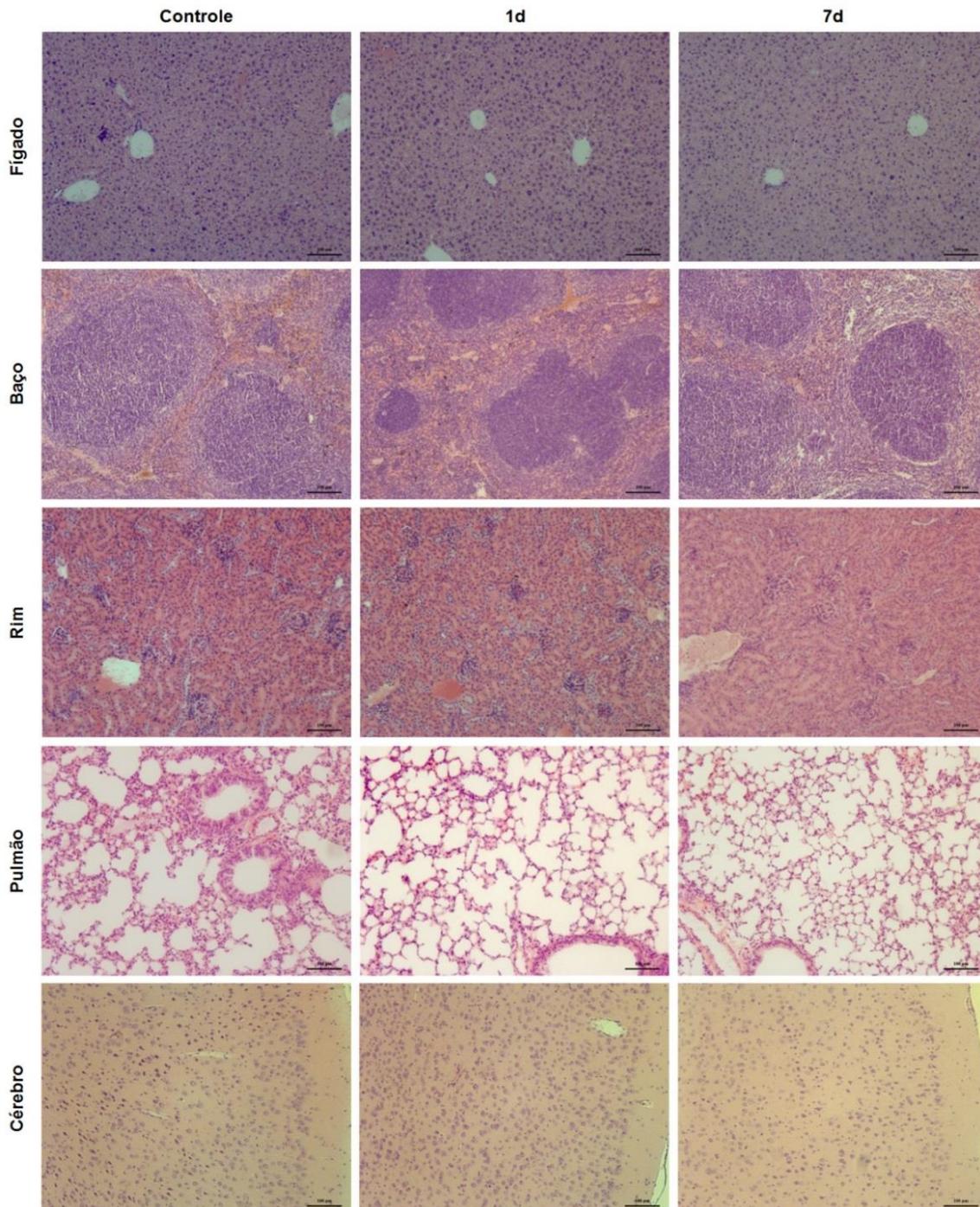
Para avaliar a toxicidade de FMS e FM em um regime de tratamento para câncer de pele, os camundongos tiveram o melanoma induzido e as amostras foram injetadas dentro do tumor. Após 1 e 7 dias dessa injeção, os animais foram sacrificados e o sangue e órgãos foram coletados para análises.

Para a análise histopatológica, foram coletados o fígado, baço, rins, pulmão e o cérebro. O objetivo era avaliar possíveis alterações morfológicas nos órgãos em função da injeção de nanopartículas no tumor, verificar a presença de aglomerados de nanopartículas magnéticas e a ocorrência de metástases.

Não foram encontradas alterações nos órgãos de nenhum animal avaliado, mesmo após 7 dias da injeção dos fluidos (Figura 38). O fígado apresentou parênquima preservado, hepatócitos de tamanho normal e cápsula de tecido conjuntivo íntegra. Foram observados nódulos inflamatórios isolados e escassos, estando presente também nos animais controle, os quais não foram injetados com os fluidos magnéticos.

No baço, as áreas de polpa branca e polpa vermelha eram bem delimitadas e as células parenquimais tinham aspecto normal. Em todos os animais, inclusive naqueles que não receberam fluidos magnéticos, foi observada a presença de aglomerados de cor marrom na coloração com HE e que eram corados de azul na coloração de Perls. A presença desses aglomerados nos grupos controle, tanto em 1 dia quanto em 7 dias de análise, sugere que essa marcação seja decorrente da presença de ferro endógeno. Não foi possível avaliar se animais que receberam nanopartículas magnéticas tinham maior quantidade de ferro no baço, pois a diferença entre os grupos não era clara o bastante e uma análise quantitativa do ferro não foi realizada.

A análise dos pulmões revelou bronquíolos e capilares com características normais e alvéolos com septos também normais. Nos rins avaliados, a camada cortical apresentou glomérulos e túbulos de morfologia padrão, e zona medular também compatível com a normalidade. O cérebro mostrou células gliais com núcleos bem definidos de acordo com o tipo celular, neurônios piramidais conforme o esperado e capilares bem preservados. No cerebelo observou-se córtex e medula bem definidos e células de Purkinje de morfologia padrão.

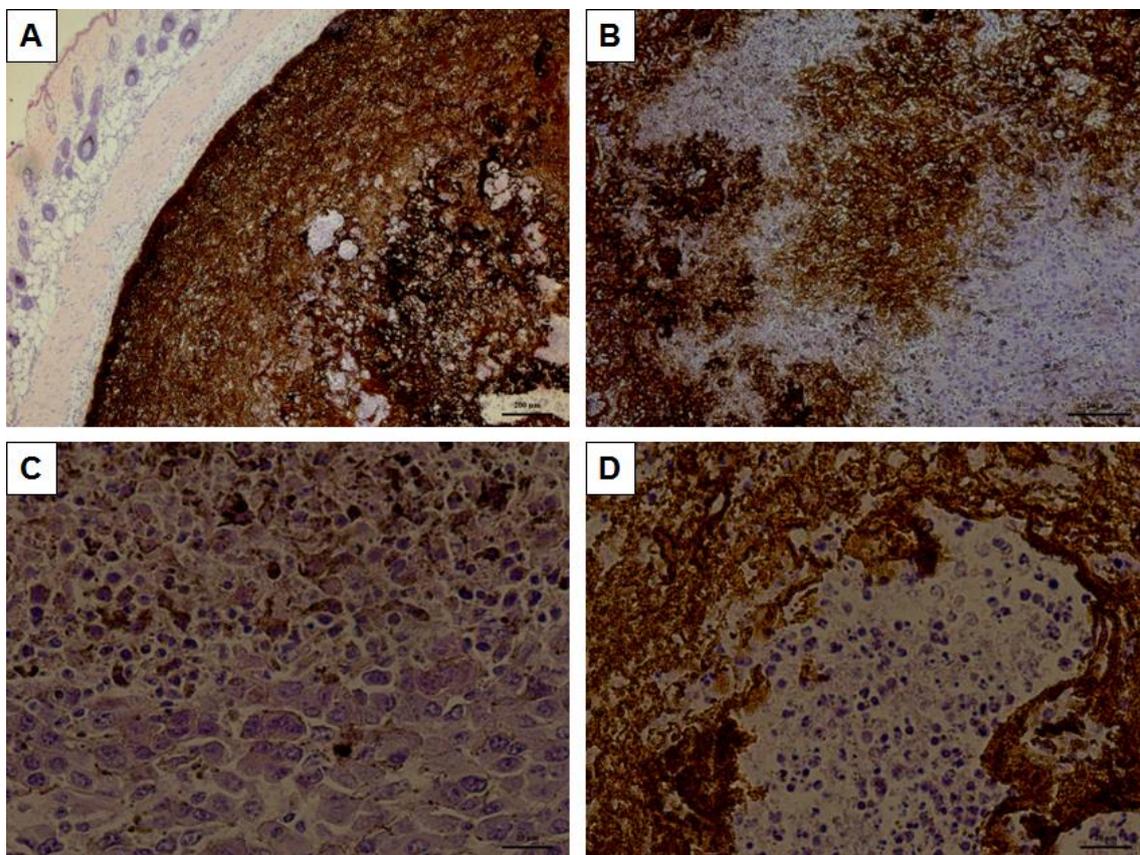


**Figura 38.** Seções histológicas coradas com hematoxilina e eosina dos órgãos dos camundongos (fígado, baço, rim, pulmão e cérebro) coletados no dia 1 e dia 7 após a injeção de FMS no tumor dos animais. Camundongos que tiveram PBS injetado no tumor serviram como controle. Não foram encontradas alterações histológicas nos tecidos analisados.

Durante as análises histológicas não foram detectadas células neoplásicas em nenhum órgão avaliado, indicando que não houve ocorrência de metástase nesse modelo de indução tumoral.

A marcação das lâminas com o corante de Perls revelou que não houve acúmulo de nanopartículas na maioria dos tecidos analisados, com exceção do baço, conforme explicado anteriormente, e dos pulmões e fígado de dois animais do grupo FM, conforme será explicado mais adiante. Esses resultados sugerem que os fluidos magnéticos FMS e FM permaneceram confinados no tumor quando foram lá injetados.

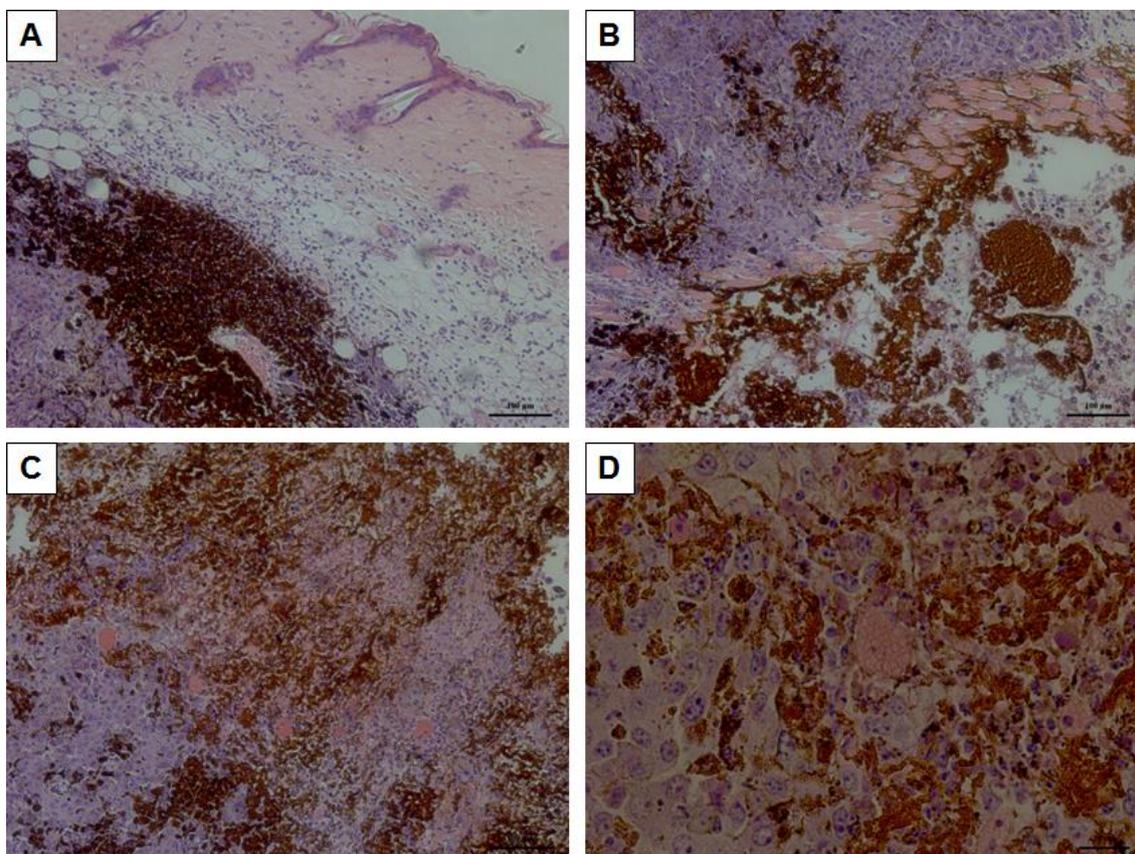
Os tumores dos animais também foram avaliados para detectar possíveis diferenças induzidas no tecido tumoral devido à aplicação dos diferentes fluidos magnéticos. As Figuras 39 e 40 mostram alguns achados para a amostra FMS e FM, respectivamente.



**Figura 39.** Fotomicrografias de melanoma murino 24 horas após a injeção da amostra FMS no tumor. **(A)** Nanopartículas magnéticas aglomeradas ocupando extensa área tumoral. **(B)** Nanopartículas espalhadas de maneira mais uniforme, mas sem ocupar todo o tumor. **(C)** Células tumorais atingidas pelo FMS (metade superior da figura) apresentando necrose e células livres do fluido (metade inferior da figura) ainda vivas. **(D)** Grande área de necrose provocada por FMS.

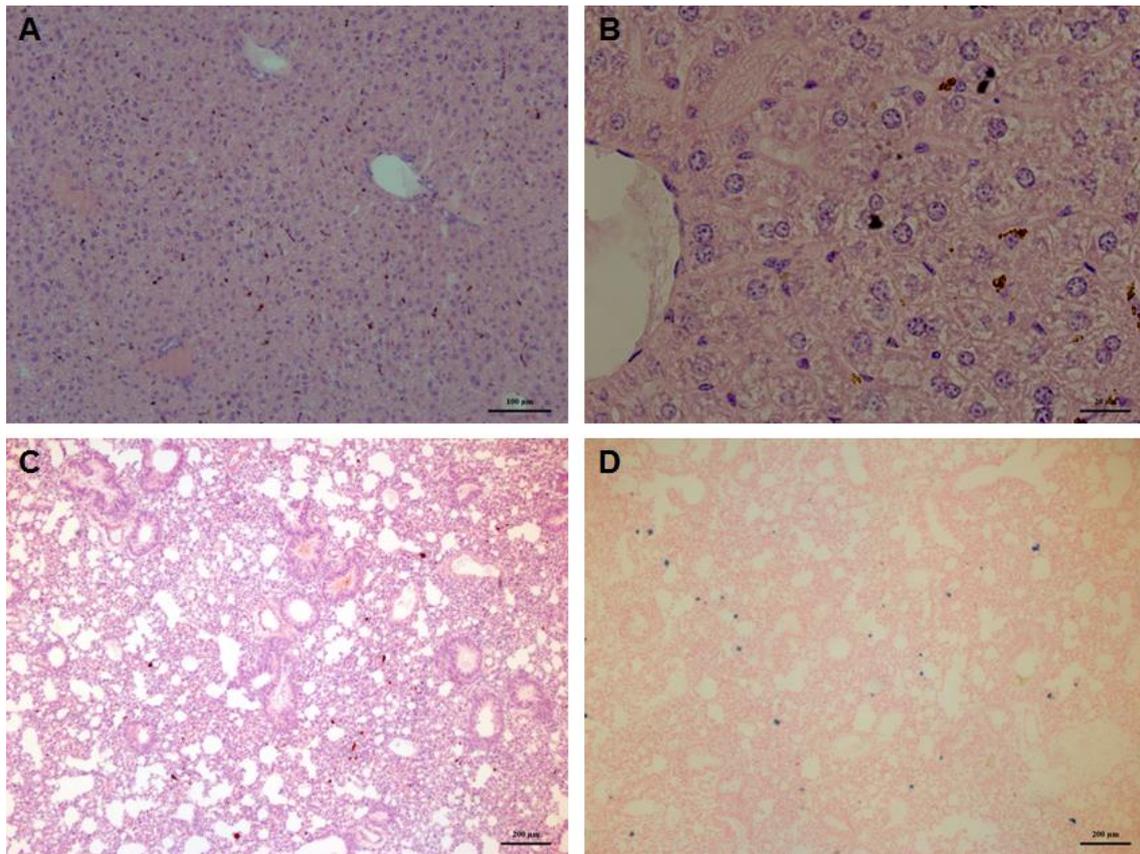
Foi observado que, para um determinado fluido, não houve um padrão de distribuição no tumor: ora o fluido ficava bem espalhado pelo tumor, como o FM na Figura 40C, ora o fluido permanecia em intensa aglomeração em apenas uma região,

como o FMS na Figura 39A. Uma característica marcante observada para ambos os fluidos foi a coincidência de áreas de necrose com as áreas de localização das nanopartículas magnéticas, sugerindo que a injeção dessas amostras causava necrose tumoral.



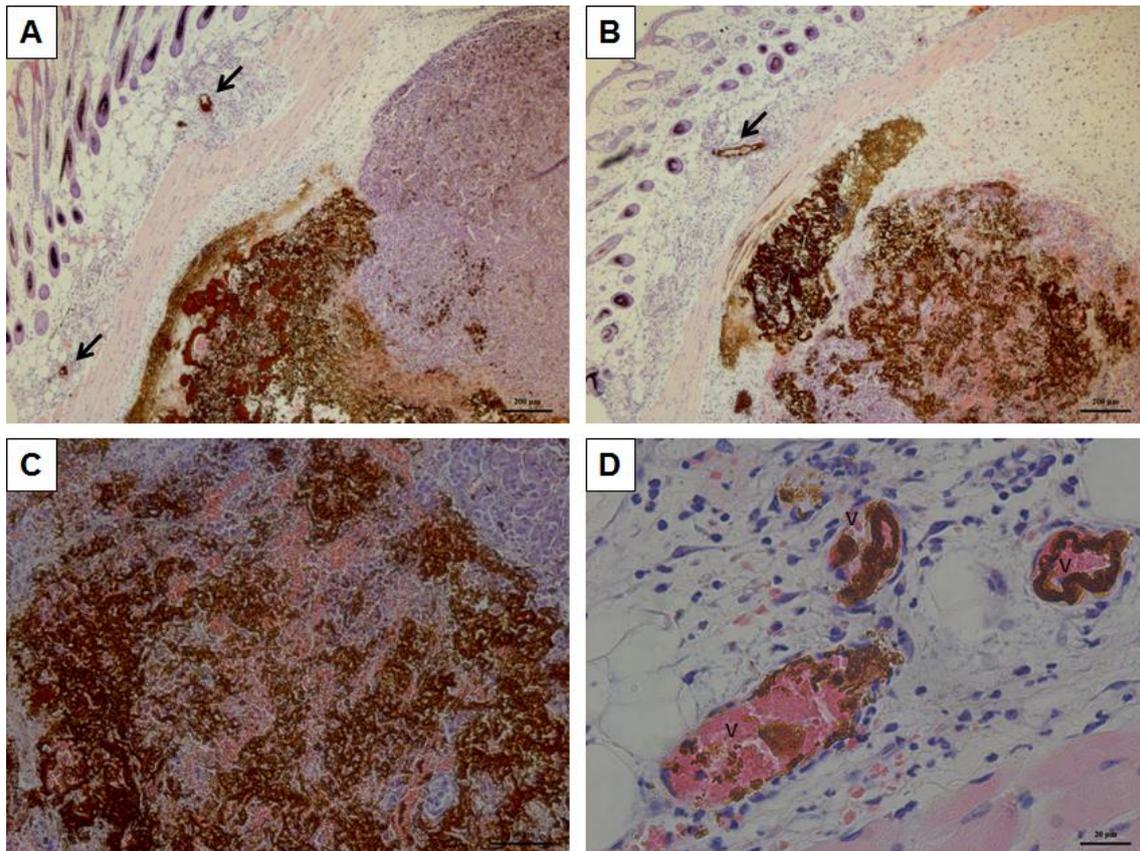
**Figura 40.** Fotomicrografias de melanoma murino 24 horas após a injeção da amostra FM no tumor. (A) A figura mostra uma área de intenso aglomerado de nanopartículas magnéticas. (B) Nanopartículas espalhadas de maneira mais uniforme, mas sem ocupar todo o tumor. (C) Nanopartículas atingindo grande parte do tumor, provocando necrose. (D) Magnificação de (C) mostrando algumas células em necrose provocada por FM.

Para dois animais do grupo injetado com o fluido FM, as nanopartículas magnéticas atingiram a circulação sanguínea e houve acúmulo das mesmas no fígado e no pulmão. A análise dos órgãos pela coloração de Perls confirmou que os aglomerados encontrados eram de nanopartículas magnéticas (Figura 41). No entanto, não houve acúmulo de amostra nos rins e no cérebro, o que indica que esta amostra não atravessa a barreira hemato-encefálica.



**Figura 41.** Seções histológicas de fígado e pulmão de um animal 24 h após a injeção de FM e que apresentou acúmulo de nanopartículas nestes órgãos. **(A)** Corte de fígado corado com hematoxilina e eosina, mostrando pequenos aglomerados marrons de nanopartículas magnéticas. **(B)** Magnificação do corte de fígado, evidenciando as partículas. **(C)** Corte de pulmão corado com hematoxilina e eosina, mostrando pequenos aglomerados marrons de nanopartículas magnéticas. **(D)** Corte de pulmão corado com coloração de Perls, evidenciando em azul o acúmulo de ferro das nanopartículas magnéticas de FM.

A análise histológica do tumor destes dois animais revelou vasos sanguíneos preenchidos com nanopartículas magnéticas (Figura 42), o que não aconteceu em nenhum outro camundongo. Como esses achados aconteceram em apenas 2 animais em um total de 24 do experimento todo, especula-se que no momento da injeção da amostra, a aplicação possa ter atingido um vaso e causado a distribuição das nanopartículas para o fígado e pulmão.



**Figura 42.** Seções histológicas do tumor de um animal 24 h após a injeção de FM e que apresentou nanopartículas em vasos sanguíneos. (A) e (B) Visão geral do melanoma, com parte dele estando ocupada pelas nanopartículas magnéticas. As setas indicam os vasos contendo nanopartículas. (C) Amostra bem difundida pelo tumor, o qual se apresenta hemorrágico e com muitos vasos. (D) Magnificação do tumor mostrando vasos sanguíneos (v) cheios de nanopartículas.

Para avaliar a toxicidade dos fluidos magnéticos, além dos órgãos, o sangue dos animais também foi coletado para análises hematológicas e bioquímicas. As tabelas 8, 9 e 10 reúnem os resultados obtidos no eritrograma, leucograma e plaquetograma, respectivamente.

Uma vez que todos os animais do experimento eram portadores de melanoma, camundongos sem tumor, do mesmo sexo e da mesma linhagem, foram utilizados como controle dos parâmetros hematológicos e bioquímicos.

Em relação aos dados obtidos no eritrograma (Tabela 8), os animais que foram injetados com o fluido FM e analisados após 7 dias apresentaram diminuição na quantidade de eritrócitos, hemoglobina e no hematócrito quando comparados aos animais sem tumor ou àqueles que receberam injeção de FM e foram sacrificados 24 h depois.

A maioria dos grupos de animais analisados, inclusive aqueles que não receberam fluido magnético, tiveram os valores diminuídos de hemoglobina corpuscular média (HCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) em relação aos animais sem tumor. A diminuição nesses parâmetros, portanto, provavelmente indica alteração devido à própria presença do tumor. Em relação aos animais acompanhados por 7 dias e que receberam FMS, eles voltaram a aumentar a quantidade de HCM em níveis compatíveis com os animais sem tumor, indicando um possível resgate desse parâmetro para os níveis normais (Tabela 8).

Outro dado interessante foi que os animais que receberam FM e foram analisados após 24 h da aplicação da amostra, foram os únicos que tiveram diminuição da largura de distribuição dos eritrócitos (RDW), mas observou-se que essa alteração foi temporária, uma vez que o índice voltou aos valores normais em 7 dias (Tabela 8).

**Tabela 8.** Eritrograma de camundongos com melanoma realizado após 1 dia ou 7 dias da injeção intratumoral de PBS (sem tratamento), FMS e FM. Camundongos sem tumor foram utilizados como controle.

Grupos	Eritrócitos (x 10 <sup>6</sup> /μL)	Hemoglobina (g/dL)	Hematócrito (%)	VCM (fL)	HCM (pg)	CHCM (g/dL)	RDW (%)
<b>Sem Tumor</b>	8,60 ± 0,46	12,88 ± 0,73	31,63 ± 1,61	36,82 ± 0,28	15,02 ± 0,42	40,73 ± 1,25	13,95 ± 0,99
<b>Tumor 1d</b>							
<b>Sem trat.</b>	8,75 ± 0,42	12,60 ± 0,57	32,70 ± 1,41	37,35 ± 0,21	14,40 ± 0,00 <sup>a</sup>	38,55 ± 0,07 <sup>a</sup>	13,20 ± 0,14
<b>FMS</b>	8,70 ± 0,36	12,53 ± 0,33	32,58 ± 1,22	37,43 ± 0,41	14,40 ± 0,33 <sup>a</sup>	38,47 ± 0,56 <sup>a</sup>	13,32 ± 0,42
<b>FM</b>	8,17 ± 0,58	11,95 ± 0,73	30,80 ± 1,90	37,75 ± 0,57	14,65 ± 0,29 <sup>a</sup>	38,80 ± 0,22	12,68 ± 0,73 <sup>a,c</sup>
<b>Tumor 7d</b>							
<b>Sem trat.</b>	7,39 ± 0,72	10,67 ± 1,06	27,97 ± 2,71	37,87 ± 0,38	14,40 ± 0,10 <sup>a</sup>	38,13 ± 0,21 <sup>a,d</sup>	14,13 ± 0,50 <sup>c,d</sup>
<b>FMS</b>	7,54 ± 1,11	11,07 ± 1,64	28,37 ± 4,35	37,60 ± 0,39	14,70 ± 0,21 <sup>b,e</sup>	39,05 ± 0,52 <sup>a,e</sup>	13,23 ± 0,53
<b>FM</b>	5,49 ± 2,51 <sup>a,b,c,d</sup>	8,00 ± 3,34 <sup>a,b,c,d</sup>	21,35 ± 8,49 <sup>a,b,c,d</sup>	39,90 ± 5,07	14,75 ± 0,68	37,30 ± 2,86 <sup>a</sup>	13,83 ± 1,01 <sup>d</sup>
<b>P-valores</b>	0,002	0,001	0,002	0,281	0,081	0,004	0,047

VCM = Volume Corpuscular Médio; HCM = Hemoglobina Corpuscular Média; CHCM = Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média; RDW = Largura de Distribuição dos Eritrócitos (indica a anisocitose).

P-valores de HCM, CHCM e RDW foram gerados pelo teste de Kruskal-Wallis, enquanto p-valores dos outros parâmetros foram gerados por ANOVA. As letras minúsculas indicam diferenças significativas detectadas pelo teste U de Mann-Whitney ou teste de Bonferroni em comparações 2 a 2, sendo a = significativo comparado com grupo Sem Tumor; b = significativo comparado com grupo Tumor 1d sem tratamento; c = significativo comparado com grupo Tumor 1d FMS; d = significativo comparado com grupo Tumor 1d FM; e = significativo comparado com grupo Tumor 7d sem tratamento; f = significativo comparado com grupo Tumor 7d FMS; g = significativo comparado com grupo Tumor 7d FM.

Em relação aos resultados do leucograma (Tabela 9), a única alteração biologicamente relevante aconteceu nos animais que receberam PBS e FMS e foram analisados após 7 dias, os quais tiveram aumentos significativos nas populações de neutrófilos e monócitos em relação aos valores de referência. Para o tratamento com FMS, essa alteração foi mais tardia, uma vez que diferem significativamente dos valores obtidos com análise de 1 dia.

**Tabela 9.** Leucograma de camundongos com melanoma realizado após 1 dia ou 7 dias da injeção intratumoral de PBS (sem tratamento), FMS e FM. Camundongos sem tumor foram utilizados como controle.

Grupos		Leucócitos (x 10 <sup>3</sup> /μL)	Linfócitos (x 10 <sup>3</sup> /μL)	Neutrófilos + Monócitos (x 10 <sup>3</sup> /μL)	Eosinófilos (x 10 <sup>3</sup> /μL)
<b>Sem Tumor</b>		5,03 ± 1,52	4,00 ± 1,31	1,02 ± 0,24	0,02 ± 0,04
<b>Tumor 1d</b>	<b>Sem trat.</b>	5,20 ± 2,40	4,00 ± 1,70	1,20 ± 0,71	0,00 ± 0,00
	<b>FMS</b>	5,43 ± 1,31	4,18 ± 1,04	1,25 ± 0,40	0,00 ± 0,00
	<b>FM</b>	3,85 ± 1,81	3,00 ± 1,38	0,83 ± 0,44	0,00 ± 0,00
<b>Tumor 7d</b>	<b>Sem trat.</b>	6,07 ± 0,80	3,77 ± 0,55	2,30 ± 0,35 <sup>a,c,d</sup>	0,00 ± 0,00
	<b>FMS</b>	5,35 ± 0,90	3,27 ± 1,15	2,07 ± 0,76 <sup>a,c,d</sup>	0,02 ± 0,04
	<b>FM</b>	5,25 ± 4,13	4,03 ± 3,16	1,23 ± 0,99	0,00 ± 0,00
	<b>P-valores</b>	0,738	0,838	0,012	0,751

P-valores de Leucócitos e Linfócitos foram gerados por ANOVA, enquanto p-valores dos outros parâmetros foram gerados pelo teste de Kruskal-Wallis. As letras minúsculas indicam diferenças significativas detectadas pelo teste U de Mann-Whitney ou teste de Bonferroni em comparações 2 a 2, sendo a = significativo comparado com grupo Sem Tumor; b = significativo comparado com grupo Tumor 1d sem tratamento; c = significativo comparado com grupo Tumor 1d FMS; d = significativo comparado com grupo Tumor 1d FM.

Nas análises da série de plaquetas (Tabela 10), foram observadas alterações no volume plaquetário médio (VPM) e na largura de distribuição das plaquetas (PDW) para o grupo de camundongos que recebeu FMS analisado em 1 dia, e alterações no VPM e na razão de macroplaquetas (P-LCR) para o grupo analisado em 7 dias, ambos comparados ao grupo sem tumor.

Nos animais que receberam FM, as diminuições no VPM, P-LCR e PDW foram transitórias, uma vez que os valores voltaram ao normal em 7 dias (Tabela 10).

**Tabela 10.** Plaquetograma de camundongos com melanoma realizado após 1 dia ou 7 dias da injeção intratumoral de PBS (sem tratamento), FMS e FM. Camundongos sem tumor foram utilizados como controle.

Grupos		PLT ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	VPM (fL)	P-LCR (%)	PDW (fL)
<b>Sem Tumor</b>		831,50 $\pm$ 209,38	7,78 $\pm$ 0,51	16,68 $\pm$ 4,50	7,74 $\pm$ 0,51
<b>Tumor 1d</b>	<b>Sem trat.</b>	951,00 $\pm$ 43,84	6,85 $\pm$ 0,21	9,75 $\pm$ 2,05	7,00 $\pm$ 0,14
	<b>FMS</b>	752,75 $\pm$ 206,21	7,08 $\pm$ 0,38 <sup>a</sup>	12,13 $\pm$ 2,96	7,10 $\pm$ 0,22 <sup>a</sup>
	<b>FM</b>	821,60 $\pm$ 80,05	6,80 $\pm$ 0,19 <sup>a</sup>	9,2 $\pm$ 1,56 <sup>a</sup>	7,16 $\pm$ 0,11 <sup>a</sup>
<b>Tumor 7d</b>	<b>Sem trat.</b>	683,67 $\pm$ 185,48	7,10 $\pm$ 0,30	9,6 $\pm$ 1,14	7,57 $\pm$ 0,50
	<b>FMS</b>	676,40 $\pm$ 177,61	6,85 $\pm$ 0,37 <sup>a</sup>	9,08 $\pm$ 2,88 <sup>a</sup>	7,28 $\pm$ 0,22
	<b>FM</b>	736,25 $\pm$ 188,07	7,25 $\pm$ 0,56	10,05 $\pm$ 3,99	7,48 $\pm$ 0,34
	<b>P-valores</b>	0,486	0,077	0,015	0,076

PLT = Plaquetas; VPM = Volume Plaquetário Médio; P-LCR = Razão de Macroplaquetas; PDW = Largura de Distribuição de Plaquetas. P-valores de PLT e P-LCR foram gerados por ANOVA, enquanto p-valores de VPM e PDW foram gerados pelo teste de Kruskal-Wallis. As letras minúsculas indicam diferenças significativas detectadas pelo teste U de Mann-Whitney ou teste de Bonferroni em comparações 2 a 2, sendo a = significativo comparado com grupo Sem Tumor.

Nos exames bioquímicos (Tabela 11), poucos parâmetros tiveram alterações biologicamente relevantes. Uma delas foi um grande aumento na quantidade de aspartato aminotransferase (AST) para o grupo que recebeu FM e ficou em acompanhamento por 7 dias em comparação ao grupo que teve o mesmo tratamento e foi analisado com 1 dia. Este mesmo grupo (FM 7d) também teve os níveis de fosfatase alcalina diminuídos em relação aos valores de referência e em relação ao grupo FM 1d.

Animais sem tratamento acompanhados por 7 dias aumentaram significativamente os níveis de alanina aminotransferase (ALT) em relação ao mesmo grupo acompanhado por apenas 1 dia. Esses animais também tiveram a quantidade de ferro sérica diminuída quando comparada com os valores de referência de animais sem tumor (Tabela 11).

**Tabela 11.** Análises bioquímicas de camundongos com melanoma realizadas após 1 dia ou 7 dias da injeção intratumoral de PBS (sem tratamento), FMS e FM. Camundongos sem tumor foram utilizados como controle.

Grupos	Bilirrubina Totais (mg/dL)	Bilirrubina Direta (mg/dL)	Bilirrubina Indireta (mg/dL)	AST (U/L)	ALT (U/L)	Fosfatase Alcalina (U/L)	Creatinina (mg/dL)	Ureia (mg/dL)	Ferro sérico (mcg/dL)
<b>Sem Tumor</b>	0,07 ± 0,02	0,05 ± 0,02	0,01 ± 0,01	150,00 ± 85,86	42,67 ± 7,94	125,83 ± 7,57	0,25 ± 0,06	72,33 ± 8,02	152,50 ± 8,46
<b>Tumor 1d</b>									
<b>Sem trat.</b>	0,05 ± 0,01	0,04 ± 0,01	0,02 ± 0,01	105,33 ± 34,50	31,67 ± 4,51	115,33 ± 11,93	0,29 ± 0,04	64,33 ± 13,58	144,67 ± 9,07
<b>FMS</b>	0,06 ± 0,01	0,05 ± 0,01	0,01 ± 0,00 <sup>b</sup>	107,33 ± 23,91	33,50 ± 4,32	119,83 ± 7,00	0,27 ± 0,04	67,83 ± 5,49	151,17 ± 20,53
<b>FM</b>	0,06 ± 0,01	0,06 ± 0,01	0,01 ± 0,00	92,80 ± 21,53	32,20 ± 5,45	124,40 ± 20,38	0,26 ± 0,04	72,00 ± 12,83	130,20 ± 18,57
<b>Tumor 7d</b>									
<b>Sem trat.</b>	0,06 ± 0,01	0,04 ± 0,01	0,03 ± 0,02 <sup>c</sup>	329,33 ± 137,31	69,00 ± 18,73 <sup>b,c,d</sup>	80,00 ± 30,79	0,22 ± 0,02	78,00 ± 0,00	86,33 ± 24,58 <sup>a,c</sup>
<b>FMS</b>	0,06 ± 0,01	0,04 ± 0,02	0,02 ± 0,01 <sup>c</sup>	245,20 ± 133,75	46,80 ± 15,16	90,20 ± 28,93	0,28 ± 0,10	72,40 ± 5,90	118,00 ± 35,11
<b>FM</b>	0,06 ± 0,04	0,03 ± 0,02	0,03 ± 0,03	318,17 ± 174,42 <sup>c,d</sup>	54,83 ± 20,54	83,00 ± 25,67 <sup>a,d</sup>	0,27 ± 0,07	82,17 ± 7,57	131,83 ± 41,07
<b>P-valores</b>	0,643	0,262	0,125	0,004	0,002	0,002	0,811	0,066	0,023

AST = aspartato aminotransferase; ALT = alanina aminotransferase. P-valores de Bilirrubina Total e suas frações foram gerados pelo teste de Kruskal-Wallis, enquanto p-valores para os outros parâmetros foram gerados por ANOVA. As letras minúsculas indicam diferenças significativas detectadas pelo teste U de Mann-Whitney ou teste de Bonferroni em comparações 2 a 2, sendo a = significativo comparado com grupo Sem Tumor; b = significativo comparado com grupo Tumor 1d sem tratamento.

Avaliação clínica foi realizada nos camundongos a fim de identificar possíveis sinais de letargia ou agitação dos animais, perda ou ganho de peso, perda de pelos ou ainda outros sintomas ou efeitos sentidos durante a injeção dos fluidos magnéticos no tumor e durante o tempo de acompanhamento dos animais.

Os pesos dos animais, os pesos do fígado, baço e rins foram anotados após o sacrifício dos mesmos (Tabela 12). Nenhuma perda significativa de peso corporal foi observada nos diferentes grupos. Também não foram encontradas alterações significativas no peso dos rins dos animais entre os grupos analisados. O fígado dos animais que foram injetados com FMS e sacrificados no dia seguinte apresentou diferença significativa em relação ao grupo de animais sem tumor, porém não diferiu de nenhum grupo dos animais com tumor. A alteração no peso do baço só aconteceu para o grupo de animais com tumor e sem tratamento analisados em 1 dia, os quais tiveram o peso diminuído em relação à maioria dos outros grupos (Tabela 12).

**Tabela 12.** Pesos corporal, do fígado, baço e rins de camundongos com melanoma que foram eutanaziados em 1 dia ou 7 dias após injeção intratumoral de PBS (sem tratamento), FMS e FM. Camundongos sem tumor foram utilizados como controle.

Grupos	Peso corpo (g)	Peso fígado (g)	Peso baço (g)	Peso rins (g)	
<b>Sem Tumor</b>	22,08 ± 0,67	1,25 ± 0,08	0,10 ± 0,01	0,25 ± 0,02	
<b>Tumor 1d</b>	<b>Sem trat.</b>	20,25 ± 1,63	1,09 ± 0,02	0,06 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,26 ± 0,04
	<b>FMS</b>	19,98 ± 0,84	1,01 ± 0,11 <sup>a</sup>	0,08 ± 0,01	0,26 ± 0,02
	<b>FM</b>	20,89 ± 0,86	1,08 ± 0,05	0,09 ± 0,01 <sup>b</sup>	0,27 ± 0,02
<b>Tumor 7d</b>	<b>Sem trat.</b>	22,47 ± 1,65	1,15 ± 0,09	0,10 ± 0,02 <sup>b</sup>	0,26 ± 0,03
	<b>FMS</b>	20,80 ± 2,05	1,10 ± 0,12	0,08 ± 0,01 <sup>b</sup>	0,24 ± 0,02
	<b>FM</b>	21,30 ± 1,22	1,09 ± 0,15	0,12 ± 0,07 <sup>b</sup>	0,25 ± 0,04
	<b>P-valores</b>	0,073	0,021	0,066	0,684

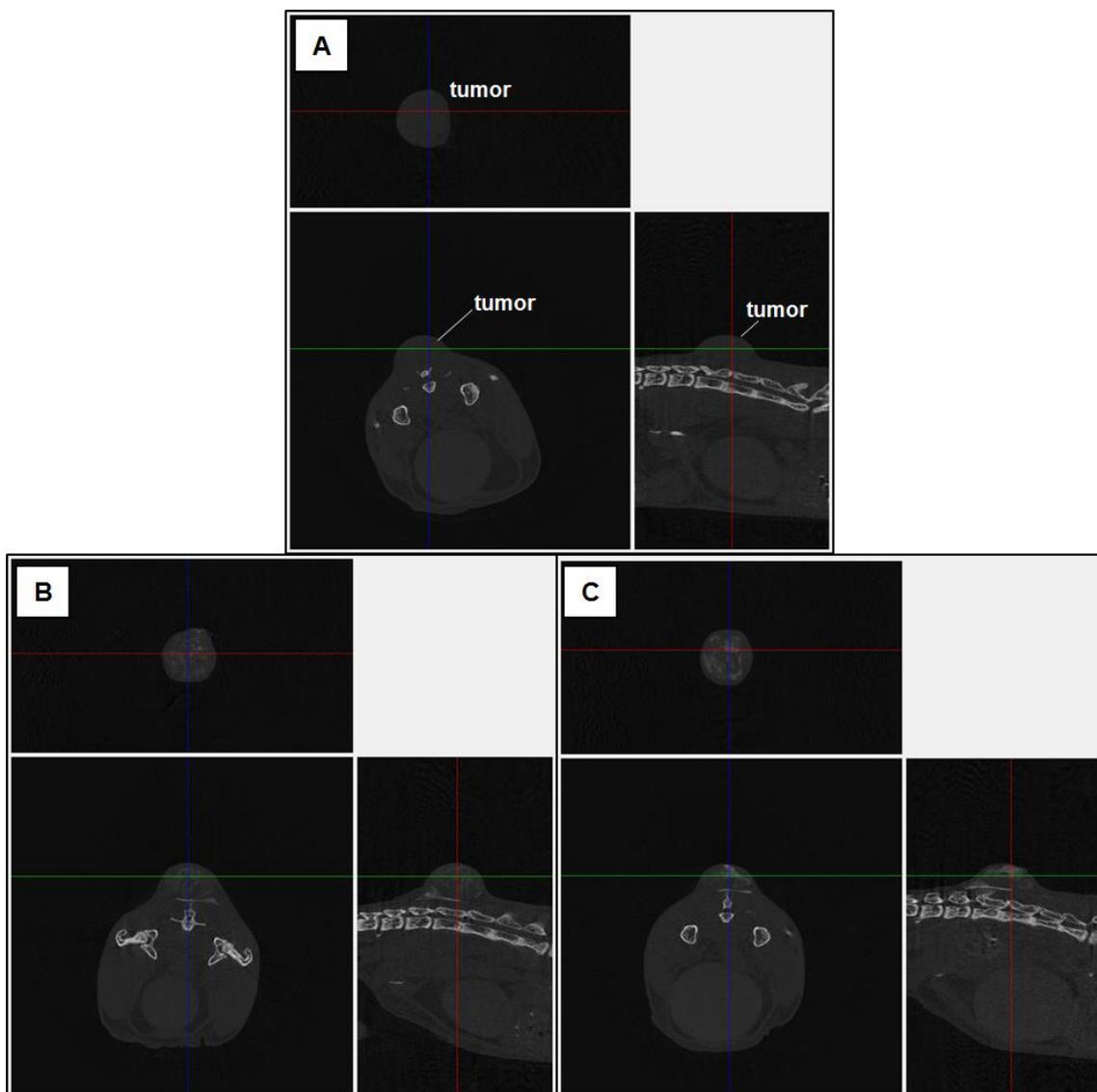
P-valores do Peso corporal e Peso fígado foram gerados por ANOVA, enquanto p-valores para o Peso baço e Peso rins foram gerados pelo teste de Kruskal-Wallis. As letras minúsculas indicam diferenças significativas detectadas pelo teste U de Mann-Whitney ou teste de Bonferroni em comparações 2 a 2, sendo a = significativo comparado com grupo Sem Tumor; b = significativo comparado com grupo Tumor 1d sem tratamento.

#### 4.7.3 Biodistribuição de FMS no tumor

Para confirmar que os fluidos magnéticos FMS e FM ficam confinados no tumor e, portanto, não são capazes de causar toxicidade aos demais tecidos, estudos adicionais

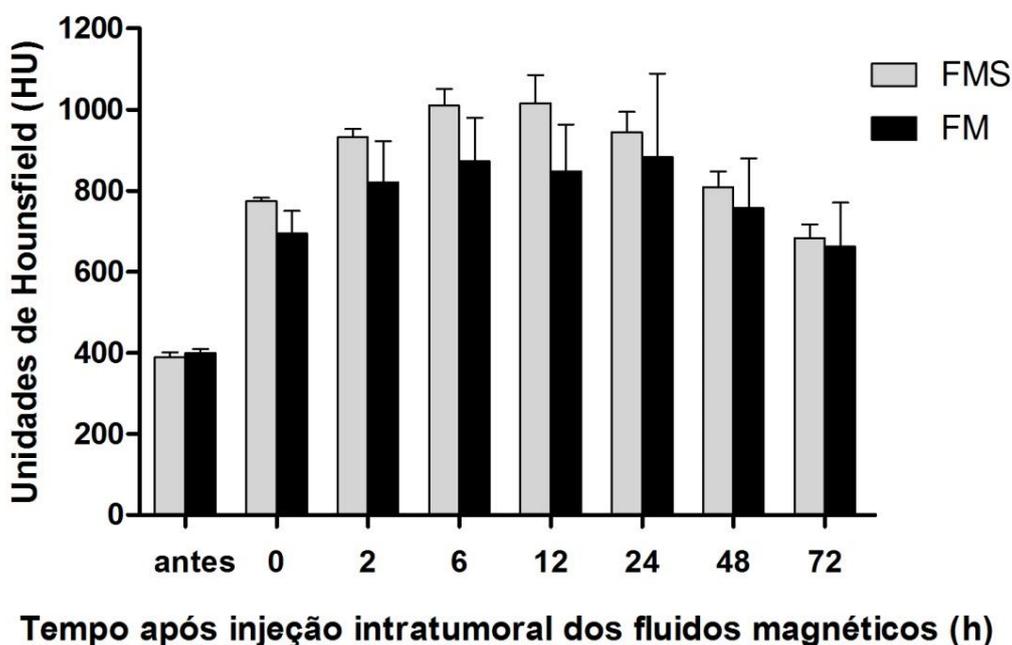
de microTC foram realizados. Uma vez que as amostras FMS e FM possuem potencial para serem detectadas em imagens de microTC, análises nos camundongos também foram feitas para demonstrar esse potencial *in vivo*.

Inicialmente, um experimento piloto foi realizado e injetou-se no tumor de um camundongo 30  $\mu$ L de FMS, o que corresponde a 550  $\mu$ g Fe total e 173  $\mu$ g de Selol. As imagens tomográficas mostram que, de modo semelhante aos testes *in vitro*, também é possível visualizar o fluido FMS no tumor dos animais mesmo após 72 horas após a aplicação da amostra (Figura 43).



**Figura 43.** Imagens de tomografia de um camundongo com melanoma em diferentes tempos da injeção do fluido magnético FMS. (A) Tomografia do camundongo antes da injeção da amostra FMS. (B) Tomografia do mesmo animal logo após a injeção intratumoral de FMS (550  $\mu$ g de Fe total). (C) Tomografia após 72 horas da injeção do fluido, mostrando que o mesmo permanece no local de injeção.

Para avaliar quanto tempo as nanopartículas permaneciam no melanoma e a fim de se quantificar essa amostra dentro do tumor, foi realizado um experimento de injeção intratumoral de FMS ou FM e acompanhamento dos camundongos ao longo do tempo. Sete dias após a indução do melanoma, os animais foram tomografados antes e após a injeção dos fluidos no tumor e acompanhados por até 72 horas. As imagens tomográficas foram reconstruídas e a região tumoral foi analisada e quantificada utilizando unidades de Hounsfield (HU) (Figura 44).

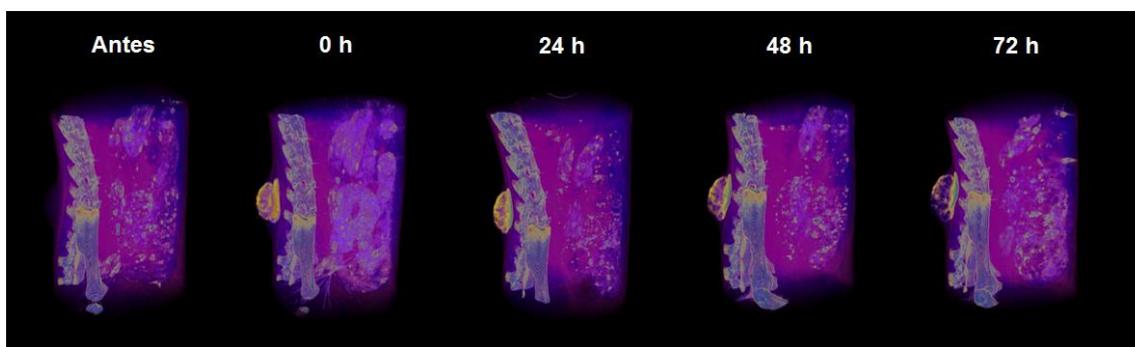


**Figura 44.** Quantificação ao longo do tempo para os fluidos FMS e FM injetados dentro do tumor de camundongos.

Os resultados mostraram que tanto FMS quanto FM possuem contraste *in vivo* em microTC, o que permite a quantificação dos fluidos magnéticos no tumor ao longo do tempo. Apesar dos resultados não serem estatisticamente significativos, o fluido FMS apresenta maior densidade em relação ao FM.

Para complementar as análises, foram realizadas reconstruções tridimensionais dos camundongos escaneados ao longo do tempo, para realçar algumas estruturas mais densas do corpo dos animais, incluindo os fluidos magnéticos. As imagens ilustram bem a elevada densidade gerada pelo fluido magnético quando este é injetado no tumor dos animais (Figura 45). As imagens também mostram que à medida que o melanoma cresce, o fluido magnético se torna mais espalhado dentro do tumor, fazendo com que o

contraste diminua, mas que ainda é possível sua visualização até 72 h após a injeção da amostra.

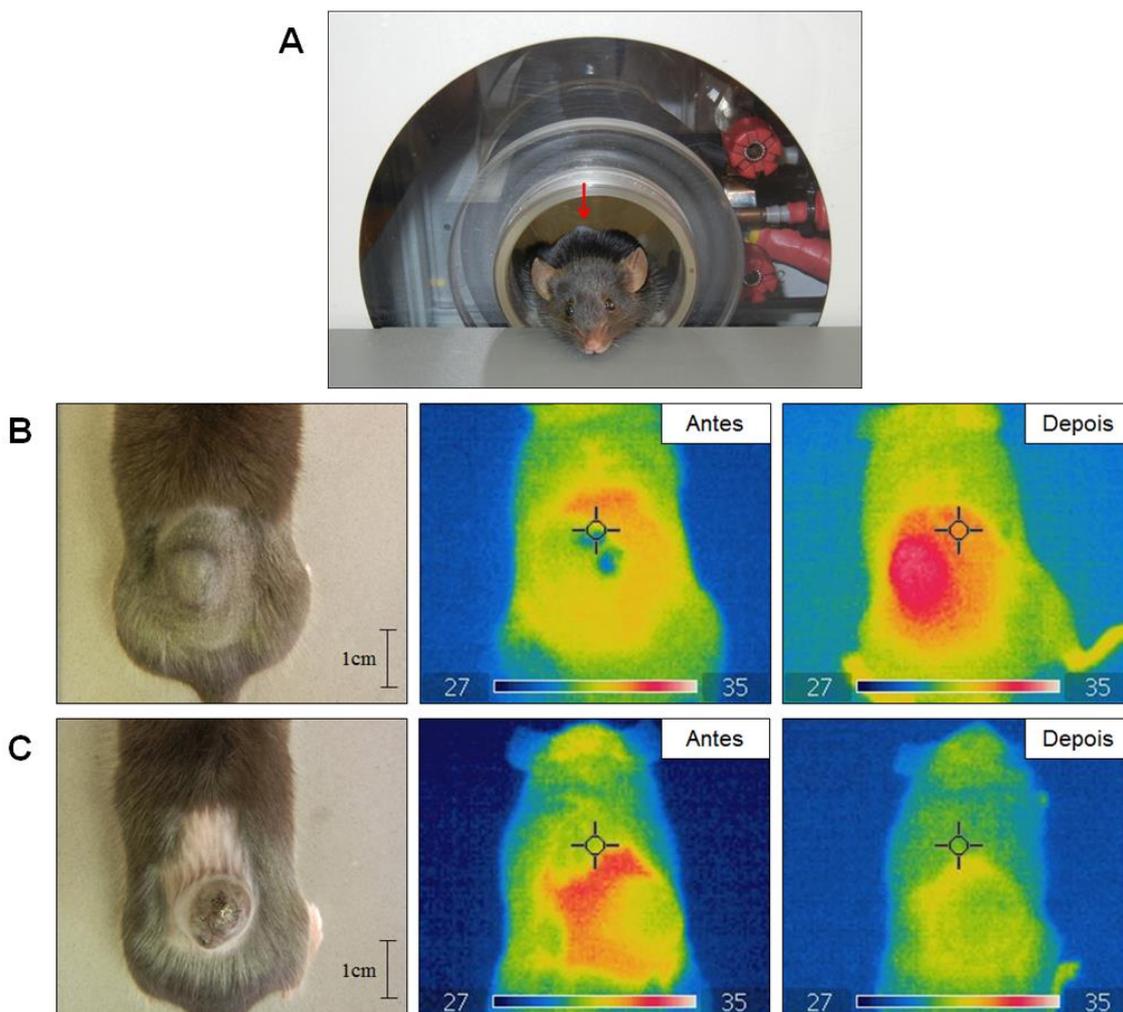


**Figura 45.** Imagens tomográficas tridimensionais de um camundongo que recebeu FMS dentro do tumor. Os modelos reconstruídos mostram que o fluido magnético permanece no tumor ao longo do tempo.

#### 4.7.4 Magnetohipertermia

Após a caracterização das amostras FMS e FM sob vários aspectos, o fluido magnético contendo Selol foi testado em relação à sua capacidade de aquecer sob indução de um campo magnético alternado após ser injetado dentro do tumor do animal. Para este ensaio, o camundongo foi anestesiado e colocado dentro do equipamento gerador de campo magnético alternado (CMA), de modo que o tumor ficasse localizado no centro da bobina (Figura 46A). Os camundongos receberam injeção intratumoral de FMS ou PBS (controle negativo) e foram deixados no equipamento por 30 minutos.

Para averiguar se houve aquecimento no tumor, análises qualitativas foram realizadas através de imagens por termografia. As imagens foram tiradas antes de o animal entrar no equipamento e imediatamente após a saída dos animais do campo magnético (Figura 46). Os resultados mostram que os animais que receberam FMS, ao contrário dos que receberam PBS, apresentaram aquecimento no tumor. É possível observar também que não houve aquecimento em outras áreas do corpo, sugerindo que o aquecimento era específico e induzido pela presença das nanopartículas magnéticas no tumor.



**Figura 46.** Magnetohipertermia utilizando o fluido magnético FMS. (A) Camundongo deitado dentro da bobina do equipamento gerador de CMA. A seta vermelha aponta para o tumor, localizado no centro da bobina. Camundongo que recebeu (B) FMS ou (C) PBS no tumor e suas imagens termográficas antes e depois da aplicação do CMA.

#### 4.7.5 Tratamento do melanoma

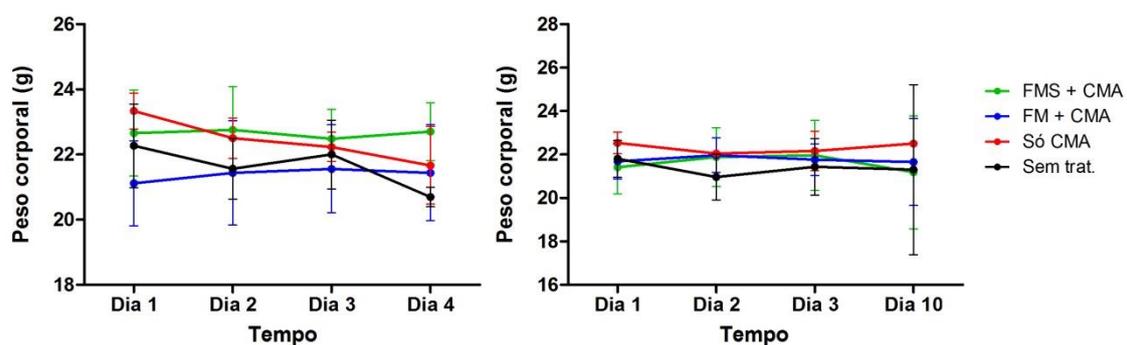
Tendo verificado que a amostra FMS é capaz de aquecer dentro do tumor do camundongo, o fluido magnético foi utilizado para o tratamento do melanoma dos animais utilizando magnetohipertermia.

O tratamento foi baseado em apenas uma aplicação da amostra e 3 exposições ao CMA em dias consecutivos. Foram utilizados quatro grupos de camundongos, incluindo tratamento e controle, estando assim distribuídos: [1] animais que não tiveram nenhum tratamento, [2] animais submetidos somente ao CMA, [3] animais tratados com FMS + CMA e [4] animais tratados com FM + CMA. Os animais de cada grupo foram

divididos e uma parte foi analisada 1 dia após o término do tratamento e a outra parte foi analisada uma semana após o término do tratamento.

O primeiro aspecto observado foi o estado da doença nos animais. Se por um lado não foram observadas alterações comportamentais e clínicas nos grupos analisados após 1 dia do tratamento, por outro, em todos os grupos analisados com 7 dias havia animais em estado mórbido, com a atividade motora diminuída, caracterizado por isolamento no canto da gaiola, sem reagir quando eram pegos para a imobilização. Nos animais que receberam tratamento de fluido magnético + CMA, observou-se que eles eram mais ativos e o estado de morbidade em geral era menor do que nos outros grupos. No grupo que só recebeu CMA e que foi deixado por 7 dias para a análise, houve morte de 2 dos 3 animais. Por esse motivo, esse grupo foi excluído de algumas análises estatísticas.

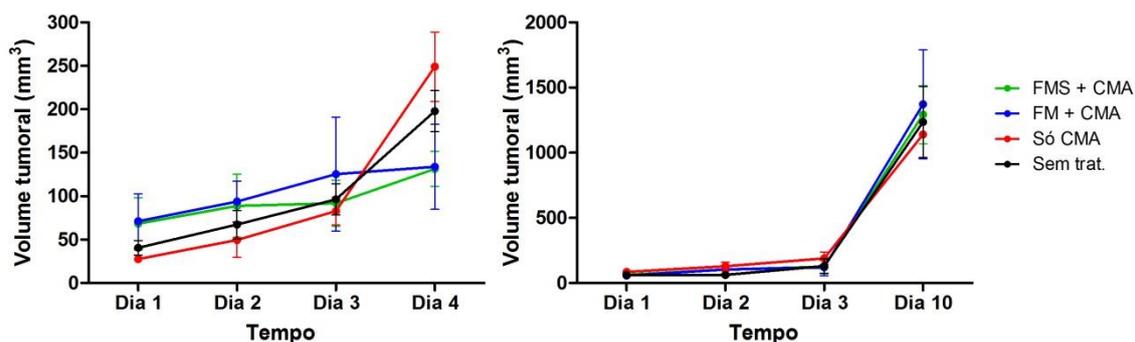
O peso dos animais foi monitorado durante o regime de tratamento e no dia em que foram sacrificados (Figura 47). O gráfico de peso após 24 h do fim do tratamento mostrou uma tendência dos animais tratados com fluido magnético + CMA manterem seu peso após o ciclo de tratamento quando comparados com os animais não tratados e com os animais submetidos apenas ao CMA, os quais tiveram perda de peso no dia seguinte ao término do tratamento. Apesar disso, os valores não foram estatisticamente significativos. No gráfico que mostra os pesos dos animais após 7 dias do fim do tratamento, também não houve diferença estatística entre os pesos analisados.



**Figura 47.** Peso corporal dos camundongos acompanhados por 1 dia (gráfico da esquerda) e 7 dias (gráfico da direita) após um ciclo (3 dias) de tratamento tumoral com magnetohipertermia.

O volume dos tumores dos animais também foi acompanhado durante os dias de tratamento e de acordo com o gráfico da Figura 48, parece haver uma tendência de manutenção do volume tumoral dos animais tratados enquanto que os animais não

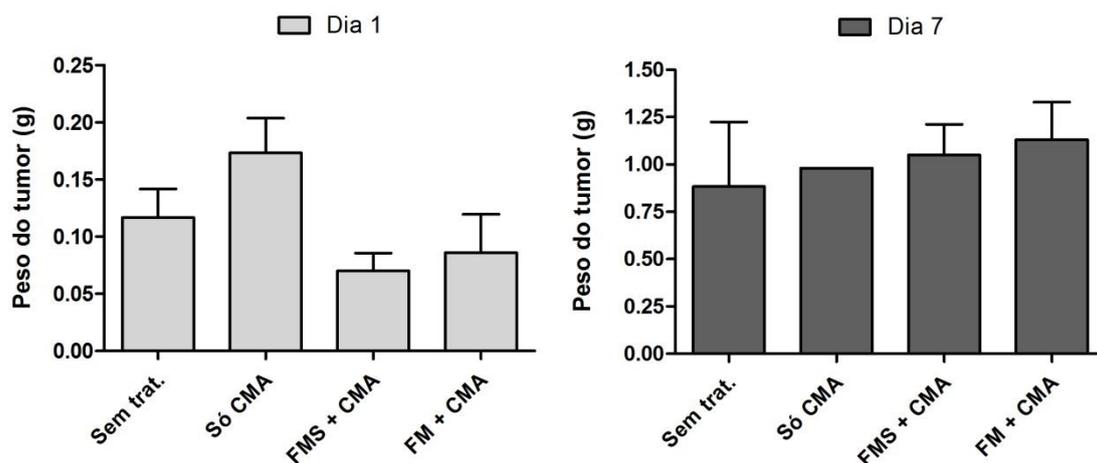
tratados tiveram um aumento de volume perceptível um dia após o ciclo de tratamento. No entanto, essa diferença entre os grupos não foi estatisticamente significativa. Já após 7 dias de acompanhamento, os dados mostram com clareza que os tumores não pararam de crescer após o tratamento e todos os nódulos tumorais encontram-se com um volume aproximado de 1300 mm<sup>3</sup> (Figura 48).



**Figura 48.** Volume tumoral dos camundongos acompanhados por 1 dia (gráfico da esquerda) e 7 dias (gráfico da direita) após um ciclo (3 dias) de tratamento do melanoma com magnetohipertermia.

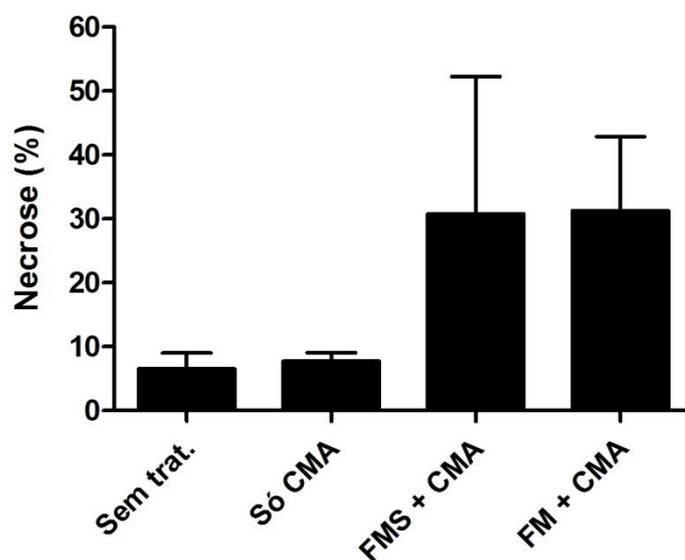
O peso do tumor também foi analisado após o sacrifício dos animais nos dias 1 e 7 após o tratamento (Figura 49). Em concordância com os dados de volume tumoral, esses resultados mostram que no dia seguinte ao término da magnetohipertermia, os pesos dos tumores dos camundongos dos grupos tratados com fluido magnético juntamente com CMA foram menores em relação aos tumores do grupo de animais que não receberam tratamento ou daqueles que foram submetidos apenas ao CMA. Apesar dessa diminuição, os resultados não foram estatisticamente significativos.

As medidas dos pesos dos tumores após 7 dias do término do tratamento dos animais mostraram tumores significativamente mais pesados em relação ao período de tratamento, evidenciando que os nódulos tumorais continuaram a crescer depois da terapia. Não houve diferença estatística entre os diferentes grupos analisados (Figura 49).



**Figura 49.** Peso dos tumores dos camundongos em diferentes grupos após 1 dia e 7 dias do tratamento tumoral com magnetohipertermia.

As áreas de necrose nos tumores dos animais foram quantificadas e os resultados mostraram que os camundongos dos grupos que receberam fluido magnético e CMA tiveram maior quantidade de necrose no tumor do que os animais que não receberam tratamento (Figura 50).



**Figura 50.** Porcentagem de necrose nos tumores dos camundongos em diferentes grupos após 1 dia do tratamento tumoral com magnetohipertermia.

Exames de hematologia (hemograma, leucograma e plaquetograma) e bioquímica também foram realizados para verificar possíveis alterações ou manutenções dos valores de normalidade para os animais tratados com fluidos magnéticos + CMA.

A Tabela 13 mostra o eritrograma completo dos animais. Animais tratados com fluido + CMA acompanhados por 7 dias tiveram níveis diminuídos de eritrócitos e de hemoglobina em relação a animais sadios. Estes mesmos grupos tiveram os valores de volume corpuscular médio (VCM) aumentados em relação aos valores de referência e em relação aos respectivos grupos analisados após 1 dia do tratamento. Ainda, o grupo FM + CMA 7d também apresentou aumento da porcentagem da largura de distribuição dos eritrócitos (RDW) em relação ao controle e em relação ao mesmo grupo com 1 dia de análise (Tabela 13).

**Tabela 13.** Eritrograma de camundongos com melanoma realizado após 1 dia ou 7 dias do tratamento com magnetohipertermia. Camundongos sem tumor, sem tratamento ou que foram submetidos somente ao CMA foram utilizados como controle.

Grupos	Eritrócitos ( $\times 10^6/\mu\text{L}$ )	Hemoglobina (g/dL)	Hematócrito (%)	VCM (fL)	HCM (pg)	CHCM (g/dL)	RDW (%)	
<b>Sem Tumor</b>	8,60 $\pm$ 0,46	12,88 $\pm$ 0,73	31,63 $\pm$ 1,61	36,82 $\pm$ 0,28	15,02 $\pm$ 0,42	40,73 $\pm$ 1,25	13,95 $\pm$ 0,99	
<b>Tumor 1d</b>	<b>Sem trat.</b>	8,18 $\pm$ 0,27	12,47 $\pm$ 0,72	30,13 $\pm$ 1,54	36,83 $\pm$ 0,68	41,37 $\pm$ 0,49	13,53 $\pm$ 0,55	
	<b>Só CMA</b>	7,60 $\pm$ 0,30	11,67 $\pm$ 0,21	27,87 $\pm$ 1,04	36,67 $\pm$ 0,06	41,90 $\pm$ 1,06	13,47 $\pm$ 0,40	
	<b>FMS + CMA</b>	7,92 $\pm$ 0,15	11,78 $\pm$ 0,19	29,04 $\pm$ 0,48	36,66 $\pm$ 0,43	14,88 $\pm$ 0,30	40,58 $\pm$ 0,39	13,64 $\pm$ 0,73
	<b>FM + CMA</b>	8,04 $\pm$ 0,17	11,94 $\pm$ 0,30	29,62 $\pm$ 0,64	36,86 $\pm$ 0,26 <sup>c</sup>	14,86 $\pm$ 0,15	40,30 $\pm$ 0,34	13,40 $\pm$ 0,25
<b>Tumor 7d</b>	<b>Sem trat.</b>	4,46 $\pm$ 3,73	6,75 $\pm$ 5,59	16,80 $\pm$ 13,29 <sup>a</sup>	38,85 $\pm$ 2,62	15,25 $\pm$ 0,21	39,30 $\pm$ 2,12	19,70 $\pm$ 9,19
	<b>FMS + CMA</b>	4,35 $\pm$ 2,14 <sup>a,d</sup>	6,82 $\pm$ 3,22 <sup>a</sup>	22,80 $\pm$ 3,54	44,18 $\pm$ 7,72 <sup>a,d</sup>	15,70 $\pm$ 1,06	36,18 $\pm$ 4,52	25,43 $\pm$ 10,76
	<b>FM + CMA</b>	4,61 $\pm$ 2,82 <sup>a</sup>	7,10 $\pm$ 4,47 <sup>a</sup>	21,43 $\pm$ 8,93	37,88 $\pm$ 0,40 <sup>a,e</sup>	15,28 $\pm$ 0,50	40,30 $\pm$ 1,08	16,20 $\pm$ 0,91 <sup>a,e</sup>
	<b>P-valores</b>	0,000	0,000	0,000	0,011	0,021	0,051	0,034

VCM = Volume Corpuscular Médio; HCM = Hemoglobina Corpuscular Média; CHCM = Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média; RDW = Largura de Distribuição dos Eritrócitos (indica a anisocitose).

P-valores de VCM, HCM e RDW foram gerados pelo teste de Kruskal-Wallis, enquanto p-valores dos outros parâmetros foram gerados por ANOVA. As letras minúsculas indicam diferenças significativas detectadas pelo teste U de Mann-Whitney ou teste de Bonferroni em comparações 2 a 2, sendo a = significativo comparado com grupo Sem Tumor; b = significativo comparado com grupo Tumor 1d sem tratamento; c = significativo comparado com grupo Tumor 1d Só CMA; d = significativo comparado com grupo Tumor 1d FMS + CMA; e = significativo comparado com grupo Tumor 1d FM + CMA.

Os dados obtidos no leucograma (Tabela 14) não indicam alterações relevantes no número de leucócitos totais, neutrófilos + monócitos e eosinófilos para nenhum dos grupos analisados. No entanto, algumas variações foram encontradas na quantidade de linfócitos, como a diminuição nos níveis dessas células nos animais que receberam somente CMA e naqueles que receberam FMS + CMA em relação aos animais sem tratamento, todos analisados após 1 dia. Porém, a única diferença do número de linfócitos em relação aos animais saudáveis (controle de referência) aconteceu no grupo FM + CMA 7d, os quais tiveram quantidades significativamente mais baixas em relação ao controle (Tabela 14).

**Tabela 14.** Leucograma de camundongos com melanoma realizado após 1 dia ou 7 dias do tratamento com magnetohipertermia. Camundongos sem tumor, sem tratamento ou que foram submetidos somente ao CMA foram utilizados como controle.

Grupos		Leucócitos (x 10 <sup>3</sup> /μL)	Linfócitos (x 10 <sup>3</sup> /μL)	Neutrófilos + Monócitos (x 10 <sup>3</sup> /μL)	Eosinófilos (x 10 <sup>3</sup> /μL)
<b>Sem Tumor</b>		5,03 ± 1,52	4,00 ± 1,31	1,02 ± 0,24	0,02 ± 0,04
<b>Tumor 1d</b>	<b>Sem trat.</b>	7,20 ± 2,66	6,00 ± 2,35	1,20 ± 0,35	0,00 ± 0,00
	<b>Só CMA</b>	3,40 ± 0,46	2,70 ± 0,40 <sup>b</sup>	0,70 ± 0,10	0,00 ± 0,00
	<b>FMS + CMA</b>	3,42 ± 0,55	2,78 ± 0,51 <sup>b</sup>	0,60 ± 0,07	0,04 ± 0,05
	<b>FM + CMA</b>	5,68 ± 0,63	4,50 ± 0,45 <sup>c,d</sup>	1,18 ± 0,33	0,00 ± 0,00
<b>Tumor 7d</b>	<b>Sem trat.</b>	4,95 ± 3,75	3,45 ± 2,76	1,50 ± 0,99	0,00 ± 0,00
	<b>FMS + CMA</b>	5,03 ± 2,19	4,00 ± 2,15	1,03 ± 0,78	0,00 ± 0,00
	<b>FM + CMA</b>	3,73 ± 2,59	2,13 ± 0,92 <sup>a,e</sup>	1,58 ± 1,76	0,03 ± 0,05
	<b>P-valores</b>	0,130	0,055	0,119	0,608

P-valores de Linfócitos e Eosinófilos foram gerados pelo teste de Kruskal-Wallis, enquanto p-valores dos outros parâmetros foram gerados por ANOVA. As letras minúsculas indicam diferenças significativas detectadas pelo teste U de Mann-Whitney ou teste de Bonferroni em comparações 2 a 2, sendo a = significativo comparado com grupo Sem Tumor; b = significativo comparado com grupo Tumor 1d sem tratamento; c = significativo comparado com grupo Tumor 1d Só CMA; d = significativo comparado com grupo Tumor 1d FMS + CMA; e = significativo comparado com grupo Tumor 1d FM + CMA.

As análises das plaquetas e seus parâmetros associados (Tabela 15) revelaram que os camundongos do grupo FMS + CMA 7d tiveram o número de plaquetas diminuídas em relação ao grupo FMS + CMA 1d, o que por sua vez teve um volume plaquetário médio (VPM) menor quando comparado aos animais sem tumor.

De modo contrário, animais do grupo FM + CMA 7d tiveram um aumento do VPM em relação ao seu respectivo grupo analisado após 1 dia do término do tratamento (Tabela 15).

**Tabela 15.** Plaquetograma de camundongos com melanoma realizado após 1 dia ou 7 dias do tratamento com magnetohipertermia. Camundongos sem tumor, sem tratamento ou que foram submetidos somente ao CMA foram utilizados como controle.

Grupos	PLT ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	VPM (fL)	P-LCR (%)	PDW (fL)	
<b>Sem Tumor</b>	831,50 $\pm$ 209,38	7,78 $\pm$ 0,51	16,68 $\pm$ 4,50	7,74 $\pm$ 0,51	
<b>Tumor 1d</b>	<b>Sem trat.</b>	1003,00 $\pm$ 16,97	7,05 $\pm$ 0,07	10,75 $\pm$ 1,06	7,45 $\pm$ 0,21
	<b>Só CMA</b>	936,33 $\pm$ 82,08	7,17 $\pm$ 0,15	11,77 $\pm$ 1,89	7,20 $\pm$ 0,00
	<b>FMS + CMA</b>	999,20 $\pm$ 61,85	7,12 $\pm$ 0,30 <sup>a</sup>	10,98 $\pm$ 1,61	7,40 $\pm$ 0,22
	<b>FM + CMA</b>	902,20 $\pm$ 31,23	7,12 $\pm$ 0,11	10,88 $\pm$ 1,45	7,24 $\pm$ 0,15
<b>Tumor 7d</b>	<b>Sem trat.</b>	649,00 $\pm$ 199,40	7,60 $\pm$ 0,00	9,85 $\pm$ 2,62	7,75 $\pm$ 0,35
	<b>FMS + CMA</b>	526,33 $\pm$ 198,66 <sup>d</sup>	7,98 $\pm$ 0,96	15,57 $\pm$ 9,62	8,22 $\pm$ 1,13
	<b>FM + CMA</b>	639,33 $\pm$ 213,85	7,70 $\pm$ 0,36 <sup>e</sup>	13,60 $\pm$ 5,76	7,70 $\pm$ 0,36
	<b>P-valores</b>	0,001	0,15	0,441	0,215

PLT = Plaquetas; VPM = Volume Plaquetário Médio; P-LCR = Razão de Macroplaquetas; PDW = Largura de Distribuição de Plaquetas. P-valor de VPM foi gerado pelo teste de Kruskal-Wallis, enquanto p-valores dos outros parâmetros foram gerados por ANOVA. As letras minúsculas indicam diferenças significativas detectadas pelo teste U de Mann-Whitney ou teste de Bonferroni em comparações 2 a 2, sendo a = significativo comparado com grupo Sem Tumor; b = significativo comparado com grupo Tumor 1d sem tratamento; c = significativo comparado com grupo Tumor 1d Só CMA; d = significativo comparado com grupo Tumor 1d FMS + CMA; e = significativo comparado com grupo Tumor 1d FM + CMA.

A dosagem sérica de parâmetros bioquímicos (Tabela 16) demonstrou várias alterações entre os diversos grupos. A mais expressiva delas parece ser a diminuição drástica da fosfatase alcalina em todos os grupos acompanhados por 7 dias após o tratamento. Os valores de fosfatase alcalina desses grupos diferiram tanto em relação aos valores de referência quanto em relação aos respectivos grupos analisados em 1 dia.

Outras alterações bioquímicas ocorridas incluem o grande aumento de níveis de aspartato aminotransferase (AST) no grupo FM + CMA 7d quando comparados com o controle e também com o respectivo grupo de 1d, diminuição do ferro sérico no grupo FM + CMA 1d em relação a animais sem tumor, e algumas mudanças nos valores de bilirrubina e suas frações para os grupos que foram tratados com fluido e CMA (Tabela 16).

**Tabela 16.** Análises bioquímicas de camundongos com melanoma realizado após 1 dia ou 7 dias do tratamento com magnetohipertermia. Camundongos sem tumor, sem tratamento ou que foram submetidos somente ao CMA foram utilizados como controle.

Grupos		Bilirrubina Totais (mg/dL)	Bilirrubina Direta (mg/dL)	Bilirrubina Indireta (mg/dL)	AST (U/L)	ALT (U/L)	Fosfatase Alcalina (U/L)	Creatinina (mg/dL)	Ureia (mg/dL)	Ferro sérico (mcg/dL)
<b>Sem Tumor</b>		0,07 ± 0,02	0,05 ± 0,02	0,01 ± 0,01	150,00 ± 85,86	42,67 ± 7,94	125,83 ± 7,57	0,25 ± 0,06	72,33 ± 8,02	152,50 ± 8,46
<b>Tumor 1d</b>	<b>Sem trat.</b>	0,11 ± 0,04	0,11 ± 0,04	0,03 ± 0,02	109,67 ± 3,51	46,00 ± 3,46	111,33 ± 5,13	0,27 ± 0,04	64,33 ± 6,51	147,67 ± 20,98
	<b>Só CMA</b>	0,08 ± 0,03	0,06 ± 0,02	0,03 ± 0,01 <sup>a</sup>	102,67 ± 29,84	35,33 ± 3,21	105,33 ± 2,52	0,21 ± 0,02 <sup>b</sup>	64,00 ± 2,00	159,67 ± 36,90
	<b>FMS + CMA</b>	0,05 ± 0,01 <sup>b</sup>	0,03 ± 0,01 <sup>a,b</sup>	0,02 ± 0,00 <sup>a</sup>	72,40 ± 4,56	35,40 ± 2,88	109,00 ± 7,18	0,22 ± 0,03	71,80 ± 10,57	142,80 ± 14,86
	<b>FM + CMA</b>	0,06 ± 0,01 <sup>b</sup>	0,05 ± 0,01 <sup>d</sup>	0,01 ± 0,00 <sup>c,d</sup>	97,20 ± 12,52	40,00 ± 4,53	116,20 ± 16,07	0,27 ± 0,03 <sup>d</sup>	63,20 ± 6,57	128,20 ± 13,22 <sup>a</sup>
<b>Tumor 7d</b>	<b>Sem trat.</b>	0,10 ± 0,00	0,09 ± 0,01	0,02 ± 0,01	279,00 ± 25,46	54,00 ± 4,24	50,00 ± 8,49 <sup>a,b</sup>	0,22 ± 0,01	81,00 ± 21,21	180,50 ± 160,51
	<b>FMS + CMA</b>	0,12 ± 0,01 <sup>a,d</sup>	0,10 ± 0,01 <sup>a,d</sup>	0,02 ± 0,01	343,50 ± 174,25	53,67 ± 14,12	41,17 ± 16,40 <sup>a,d</sup>	0,19 ± 0,05	72,50 ± 28,88	98,83 ± 77,74
	<b>FM + CMA</b>	0,11 ± 0,01 <sup>a,e</sup>	0,09 ± 0,01 <sup>a,e</sup>	0,02 ± 0,01	426,20 ± 124,29 <sup>a,e</sup>	71,60 ± 25,26	44,00 ± 11,02 <sup>a,e</sup>	0,25 ± 0,08	82,60 ± 28,82	152,40 ± 60,57
	<b>P-valores</b>	0,000	0,000	0,137	0,000	0,395	0,000	0,285	0,769	0,282

AST = aspartato aminotransferase; ALT = alanina aminotransferase. P-valores de Bilirrubina Direta, Bilirrubina Indireta, Creatinina e Ferro sérico foram gerados pelo teste de Kruskal-Wallis, enquanto p-valores para os outros parâmetros foram gerados por ANOVA. As letras minúsculas indicam diferenças significativas detectadas pelo teste U de Mann-Whitney ou teste de Bonferroni em comparações 2 a 2, sendo a = significativo comparado com grupo Sem Tumor; b = significativo comparado com grupo Tumor 1d sem tratamento; c = significativo comparado com grupo Tumor 1d Só CMA; d = significativo comparado com grupo Tumor 1d FMS + CMA; e = significativo comparado com grupo Tumor 1d FM + CMA.

## 5 DISCUSSÃO

Nesta pesquisa foram feitos testes para avaliar a potencialidade de nova amostra de fluido magnético no tratamento do melanoma por magnetohipertermia e como meio de contraste em exames de microtomografia computadorizada (microTC). Diversas nanoestruturas estão sendo atualmente testadas como agentes terapêuticos, diagnósticos e prognósticos (CAMPOS DA PAZ, 2012; CHENG et al., 2012; ESTEVANATO, 2012; HALLOUARD et al., 2013; JAIN, 2010; PORTILHO, 2011; SAHOO; PARVEEN; PANDA, 2007). Neste contexto, as nanopartículas magnéticas, as quais constituem os fluidos magnéticos, possuem grande visibilidade porque representam amostras biocompatíveis, versáteis e multifuncionais, cujas principais vantagens sobre os outros sistemas são o direcionamento magnético ao alvo, uso como meios de contraste em exames de imagem e a realização da técnica de magnetohipertermia para o tratamento do câncer.

O fluido magnético contendo Selol (FMS) representa uma nova amostra preparada a partir de uma amostra já previamente utilizada e caracterizada pelo grupo da Profa. Emilia Lima (DE SOUZA et al., 2011; DOS SANTOS, 2012), esta constituída de nanopartículas de magnetita cobertas com bicamada de ácido láurico (amostra FM). A utilização de um composto simples com capacidade de ligar drogas sem uma química complexa, como o ácido láurico, pode apresentar vantagens sobre moléculas ligantes sofisticadas, principalmente em relação à influência na estrutura molecular, liberação, biodisponibilidade e eficácia da droga aplicada, assim como na toxicidade do sistema como um todo (TIETZE et al., 2013). Alguns estudos já mostraram que nanopartículas de magnetita funcionalizadas com bicamada de ácido láurico são nanopartículas adequadas para a associação de moléculas com baixa solubilidade em meio aquoso (DE SOUZA et al., 2011; DOS SANTOS, 2012; SALDANHA, 2012; TIETZE et al., 2013) e o Selol, por ser uma substância lipofílica (SUCHOCKI; JAKONIUK; FITAK, 2003), também foi associado a essas nanopartículas, produzindo o fluido magnético FMS.

Neste trabalho, foi realizada a caracterização dessa nova amostra FMS e também da amostra utilizada como controle, a FM, em diversos aspectos como tamanho, estabilidade, toxicidade, interiorização e densidade em microTC.

A média do diâmetro físico obtido para as nanopartículas dos fluidos FMS e FM, utilizando MET, foi de 8,3 e 8,1 nm, respectivamente. Esses resultados corroboram os

resultados de caracterização previamente obtidos para as mesmas amostras pelo grupo da profa. Emilia, que utilizaram a técnica de difração de raios x (DRX) para analisar o tamanho dessas nanopartículas, tendo obtido o diâmetro de 7,64 para ambas as amostras. A pequena diferença observada nos resultados é devido ao emprego de diferentes metodologias, o que está de acordo com os resultados prévios (LACAVA et al., 2001) e os obtidos por Mamani e colaboradores (2013), os quais também obtiveram um tamanho menor da nanopartícula de magnetita por DRX (8,4 nm) do que pela técnica de MET (9,4 nm). Portanto, levando-se em consideração as limitações de cada método, como o fato do diâmetro das nanopartículas serem medidas manualmente nas análises por MET, por exemplo, essas pequenas diferenças não foram consideradas na avaliação da amostra. De qualquer modo, os diâmetros obtidos para as nanopartículas são pequenos, em consonância com os obtidos por outros autores que utilizando o mesmo tipo de nanopartículas (magnetita coberta com bicamada de ácido láurico) e o mesmo método de preparo (co-precipitação) relatam nos resultados fornecidos por MET amostras variando de 7,4 a 10,0 nm de diâmetro (AVDEEV et al., 2010; MAMANI et al., 2013; PRADHAN et al., 2007). Para aplicações biomédicas, o método de preparo de nanopartículas de óxido de ferro mais utilizado é a co-precipitação de íons de ferro em meio alcalino (MAMANI et al., 2013) e os resultados similares obtidos quanto ao tamanho nas nanopartículas demonstram a boa reprodutibilidade da metodologia.

Além do diâmetro pequeno, as fotomicrografias de MET revelaram a forma esférica das nanopartículas, característica também em acordo com os dados da literatura que utilizaram NPM cobertas com bicamada de ácido láurico (AVDEEV et al., 2010; MAMANI et al., 2013; PRADHAN et al., 2007a). Não é possível fazer inferências sobre o grau de agregação das nanopartículas pela técnica de MET, uma vez que para serem observadas por esta técnica, as amostras devem ser desidratadas. De qualquer forma, outras técnicas permitem concluir que as amostras não formam aglomerações entre si, como a medida do índice de polidispersividade (IPD) e do potencial zeta, discutidas abaixo. Observações feitas em microscopia de luz, no momento em que as células eram tratadas com os fluidos magnéticos, mostraram que não havia qualquer grau de agregação macroscópica das nanopartículas em meio de cultura contendo soro. No entanto, essa aglomeração começou a ser notada, aproximadamente, três anos após o preparo das amostras.

O diâmetro hidrodinâmico e o IPD das nanopartículas foram obtidos logo após seu preparo pelo grupo da profa. Emilia Lima e também foram medidos ao longo do tempo (em 24, 36 e 48 meses após a síntese) para acompanhar possíveis mudanças que pudessem indicar aglomeração ou desestabilização da dispersão de nanopartículas. Verificou-se que a adição de Selol às nanopartículas não alterou expressivamente o diâmetro das mesmas (de 84,3 nm na amostra FM para 91,7 nm na FMS), sendo compatível com a presença de outra substância e que esse tamanho foi mantido ao longo do tempo. Apesar dos resultados mostrarem tendência de aumento do diâmetro hidrodinâmico em ambas as amostras, analisadas em diferentes temperaturas e ao longo do tempo, esse aumento não foi estatisticamente significativo, sugerindo que as nanopartículas não possuem tendência à aglomeração e precipitação. No entanto, as nanopartículas de FMS quando foram analisadas a 37°C e após 48 meses do seu preparo parecem formar, de acordo com os gráficos da Figura 23B, uma segunda subpopulação de agregados de partículas de tamanho maior, em torno de 4.000 nm (4µm). Do mesmo modo, as nanopartículas do fluido FM também mostraram o aparecimento dessa subpopulação após 36 meses do seu preparo (Figura 24), evidenciando maior estabilidade de FMS do que de FM. Apesar de essa subpopulação de maior tamanho ser insignificante quando comparada com a grande população de nanopartículas de distribuição monomodal em torno de 100 nm, ela confirma a agregação de nanopartículas que foi observada em microscopia de luz para as amostras após longo tempo do seu preparo. Outro dado importante obtido dessas análises de diâmetro hidrodinâmico foi que os tamanhos dos agregados de nanopartículas medidos a 37°C não foram estatisticamente significativos em relação aos tamanhos obtidos à temperatura ambiente, o que sugere a possibilidade de aplicação dos fluidos em temperaturas fisiológicas corporais sem as desvantagens em relação à aglomeração das nanopartículas, muito comum em vários tipos de amostras nanoestruturadas (IOCCA, 2013; LI; KANER, 2006).

Vale ressaltar que os diâmetros hidrodinâmicos médios encontrados na literatura para nanopartículas de óxido de ferro cobertos com bicamada de ácido láurico variam de 61 a 165 nm (IOCCA, 2013; PRADHAN et al., 2007a; TIETZE et al., 2013), concordando com os resultados aqui obtidos.

Em relação às análises do índice de polidispersividade (IPD), ambos os fluidos apresentaram valores baixos para este parâmetro. O IPD é uma medida que indica a

variabilidade de tamanho das nanopartículas, sendo um IPD abaixo de 0,3 fundamental para evitar embolia e para aumentar a taxa de aquecimento no caso da magnetohipertermia (KHANDHAR; FERGUSON; KRISHNAN, 2011; KHANDHAR et al., 2012a, 2012b). Portanto, os IPD encontrados neste trabalho, principalmente para FMS, preenchem esse requisito, indicando uma distribuição de tamanho monomodal para as nanopartículas dos fluidos magnéticos ou, em outras palavras, baixa polidispersividade.

A avaliação dos valores de potencial zeta mostrou que as NPM, contendo ou não Selol, apresentaram cargas negativas. Nanopartículas funcionalizadas com bicamadas de ácido láurico possuem cargas negativas devido à presença de grupos carboxilato em sua superfície (DOS SANTOS, 2012). O Selol possui carga positiva (SUCHOCKI et al., 2007), mas as nanopartículas do fluido FMS mantiveram a carga negativa após seu preparo. O fato da carga negativa do ácido láurico ter superado a carga positiva do Selol na amostra FMS pode ser um indicativo de que o Selol não está cobrindo toda a superfície das nanopartículas, mas sim que está entremeado na bicamada de ácido láurico, ou ainda que exista pequena quantidade de Selol funcionalizado na nanopartícula.

Os resultados de potencial zeta evidenciaram valores absolutos elevados, o que coloca essas nanopartículas como sistemas bastante estáveis. Valores absolutos de potencial zeta maiores que 30 mV são considerados atributos que conferem boa estabilidade da suspensão coloidal (SHAW, 1975), uma vez que a repulsão eletrostática contribui significativamente para esta estabilidade, não sendo, no entanto, a única característica que confere estabilidade às nanopartículas.

O potencial zeta das amostras foi analisado em duas temperaturas diferentes (25 e 37°C) e nas medidas realizadas a 37°C o valor absoluto do potencial zeta de ambas as amostras foi menor quando comparado aos valores medidos à temperatura ambiente, indicando menor estabilidade em temperaturas mais elevadas. De modo semelhante aos resultados obtidos para o tamanho das nanopartículas e para os IPD, os valores de potencial zeta também não variaram quando as amostras foram analisadas por até 48 meses após seu preparo. Iocca (2013) analisou a estabilidade de nanopartículas de maghemita cobertas com bicamada de ácido láurico ao longo do tempo, por até 240 dias, para amostras que foram mantidas a 4°C e à temperatura ambiente. No estudo em questão, foi demonstrado que os parâmetros de diâmetro hidrodinâmico, IPD e potencial

zeta não apresentaram variação significativa ao longo do tempo. Inclusive, foi demonstrada a manutenção da estabilidade das nanopartículas mesmo após passarem por processo de esterilização por autoclave (IOCCA, 2013). Esses resultados corroboram com os achados no presente estudo e definem as nanopartículas de óxido de ferro cobertas com bicamada de ácido láurico como nanopartículas extremamente estáveis. Já foi mostrado, por MET, que na funcionalização de NPM com ácido láurico, o surfactante atua de modo bem sucedido para prevenir aglomerações (TIETZE et al., 2013) e isso explica porque os fluidos magnéticos usados neste trabalho foram altamente estáveis.

O ácido láurico ou ácido dodecanóico é um ácido graxo de cadeia média, com 12 átomos de carbono em sua estrutura, que ocorre naturalmente na natureza e cujo uso é aprovado na área farmacêutica e indústria alimentícia (PRADHAN et al., 2007a; SHAHZADI; ALI; BEGUM, 2007). A utilização do ácido láurico em NPM produz uma suspensão coloidal estável em água (MAMANI et al., 2013) e elas se apresentam biocompatíveis quando utilizadas em baixas concentrações para aplicações *in vitro* (PRADHAN et al., 2007b). Poucos trabalhos foram encontrados na literatura que utilizam nanopartículas de óxido de ferro cobertas com bicamada de ácido láurico, mas os trabalhos existentes mostram dados bem estabelecidos quanto ao tamanho e potencial zeta das nanopartículas, citotoxicidade e biocompatibilidade (AVDEEV et al., 2010; DOS SANTOS, 2012; IOCCA, 2013; MAMANI et al., 2013; PRADHAN et al., 2007a; TIETZE et al., 2013). Nossos resultados corroboraram esses já existentes e mostram ainda que o fluido FMS possui menor grau de aglomeração, é mais estável e com menos variação de tamanho do que a amostra FM, apontando para o fato de o Selol conferir ainda mais estabilidade ao fluido magnético que o ácido láurico.

O efeito da citotoxicidade do fluido magnético contendo Selol foi avaliado pelo teste de viabilidade celular segundo o método do MTT. Apesar de existirem relatos na literatura quanto a algumas complicações para a realização do MTT (SOENEN; DE CUYPER, 2009; CAMPOS DA PAZ, 2012), como a interação entre os nanomateriais e os reagentes ou produtos do ensaio, este tem sido o método mais utilizado para acessar a nanotoxicidade *in vitro* (MARQUIS et al., 2009). Até o momento não foi relatada nenhuma interação de nanopartículas de magnetita com reagentes ou produtos do ensaio de MTT que pudessem inviabilizar sua utilização com esse material. Além disso, não foi observada a aderência das nanopartículas dos fluidos FMS e FM nas placas de

cultura utilizadas, o que poderia interferir com a leitura no espectrofotômetro para a quantificação do formazan.

Os resultados encontrados no ensaio de MTT mostraram que os fluidos magnéticos não provocaram diminuição de viabilidade para as células de melanoma nas concentrações testadas até 37,5  $\mu\text{g Fe/mL}$ . Para a concentração de 75  $\mu\text{g Fe/mL}$ , viabilidade celular em torno de 85% foi observada tanto em 24 quanto em 48 h. Apesar da diminuição da viabilidade celular, esses resultados não são considerados como tóxicos para as células B16-F10 de melanoma. Entretanto, a toxicidade foi observada nos resultados dos testes com a concentração de 150  $\mu\text{g Fe/mL}$ , nos quais as células apresentaram viabilidade em torno de 50%. Todos os resultados encontrados estão de acordo com os dados da literatura sobre a concentração tóxica de nanopartículas de magnetita ou maghemita funcionalizadas com bicamada de ácido láurico, mesmo utilizando diferentes linhagens celulares e diferentes metodologias para acessar a toxicidade (AVDEEV et al., 2010; CHAVES, 2008; IOCCA, 2013; PRADHAN et al., 2007a; PRADHAN et al., 2007b). Apesar deste estudo não ter testado a toxicidade dos fluidos magnéticos em células normais, outros trabalhos que utilizaram nanopartículas de óxido de ferro com bicamada de ácido láurico já mostraram que células normais como fibroblastos humanos, fibroblastos murinos e células renais de humanos e de porco obtiveram viabilidade celular semelhante à viabilidade obtida aqui em células tumorais de melanoma utilizando concentrações próximas (CHAVES, 2008; IOCCA, 2013). Assim, a estratégia do presente estudo foi escolher uma concentração que fosse biocompatível com as células normais e que, após a aplicação do campo magnético de frequência alternada, a toxicidade aumentasse e fosse específica para as células tumorais, devido à sua maior sensibilidade a elevadas temperaturas (BALIVADA et al., 2010; MATSUMINE et al., 2011).

Pelos ensaios de MTT, verificou-se também que os fluidos FMS e FM induzem o mesmo efeito na linhagem de melanoma murino B16-F10, pois não houve diferença entre a viabilidade das células tratadas com FMS e FM nas mesmas concentrações e no mesmo tempo. Estes dados sugerem que o Selol adsorvido na camada de ácido láurico das nanopartículas não exerceu efeitos aditivos de toxicidade nas células, conforme a ação esperada para o Selol (ESTEVANATO, 2012; FALQUEIRO et al., 2012; SUCHOCKI et al., 2007). Acredita-se que a ação antitumoral do Selol não tenha sido observada nesses experimentos devido à baixa concentração de Selol adsorvido nas

nanopartículas magnéticas e consequente baixa concentração de Selol contida nas concentrações utilizadas dos fluidos magnéticos. As concentrações escolhidas para serem utilizadas na avaliação da citotoxicidade pelo método de MTT foram baseadas nas doses de Selol utilizadas por Suchocki e colaboradores (2007), que demonstraram que o IC50 de células leucêmicas humanas, após 72 h de exposição ao Selol, era de aproximadamente 500 µg Selol/mL. No entanto, para se obter uma concentração mínima de Selol que causasse efeito nas células tumorais conforme demonstrado por Suchocki, teria que ter sido utilizada uma dose 4 vezes maior do que a maior concentração utilizada neste trabalho (150 µg Fe/mL). Considerando que a máxima concentração utilizada já causou morte de 50% das células, devido ao efeito tóxico do ferro, aplicar uma grande quantidade de Selol tornou-se, portanto, inviável. Por esse motivo, acredita-se que não tenha sido observado o efeito antitumoral esperado do Selol nas nanopartículas do fluido FMS em relação ao fluido FM. De fato, os estudos realizados por Estevanato (2012) e Falqueiro (2012), utilizando as concentrações correspondentes a este trabalho, também não evidenciaram diferenças na viabilidade celular entre as amostras com Selol e as amostras sem Selol, mas uma maior concentração de Selol foi capaz de promover os efeitos sinérgicos da toxicidade do ferro e do Selol sobre a viabilidade de células tumorais.

Em relação à interiorização das nanopartículas dos fluidos FMS e FM pelas células de melanoma, foi verificada a presença de ambas no interior das células da linhagem B16-F10 e que elas estavam dentro de estruturas semelhantes a vesículas, sugerindo que essas nanopartículas foram interiorizadas mediante processo de endocitose. Estudos mostram que a cobertura e o tamanho das nanopartículas possuem efeito sobre sua interiorização (ROOHI et al., 2012) e relatos na literatura mostram que nanopartículas com bicamada de ácido láurico estão presentes tanto na superfície celular quanto no citoplasma das células e, quando no interior celular, elas também estão localizadas dentro de estruturas semelhantes a vesículas (PRADHAN et al., 2007b). A MET foi realizada com intuito qualitativo e, portanto, não foi possível realizar inferências sobre a quantidade de nanopartículas interiorizadas do fluido FMS e do fluido FM, se havia maior quantidade de uma ou de outra, mas pode-se concluir que, ao mesmo tempo em que o Selol não foi um obstáculo para a interiorização dessas nanopartículas, ele também não promoveu vantagens em relação às nanopartículas sem Selol neste processo.

Para avaliar a toxicidade das NPM *in vivo*, o modelo escolhido para a indução do melanoma foi o transplante singênico de células B16-F10 em camundongos da linhagem C57BL/6. Neste modelo, até onde se sabe, pouco foi descrito sobre metástases espontâneas para outros sítios anatômicos (ITO et al., 2003b), o que difere bastante do melanoma humano, o qual possui altas taxas de disseminação tumoral. No entanto, é um modelo extremamente bem aceito na literatura e poucos trabalhos são publicados utilizando outros modelos de melanoma, como os tumores quimicamente induzidos ou animais geneticamente modificados (MCKINNEY; HOLMEN, 2011).

Os estudos *in vivo* permitem analisar os efeitos das nanopartículas a longo prazo, sua biodistribuição, sua retenção tumoral ou excreção do organismo (MARQUIS et al., 2009), além de avaliar seu efeito nanotóxico. A maioria dos estudos de nanotoxicidade e biodistribuição tem utilizado injeção endovenosa das nanopartículas (FABIAN et al., 2008). No entanto, a circulação sistêmica implica no transporte das nanopartículas pelo sistema retículoendotelial do fígado e do baço, ocasionando a retenção de partículas opsonizadas pelos macrófagos residentes nestes órgãos (ERNSTING et al., 2013). Uma das medidas para contornar essa situação é utilizar as nanopartículas furtivas (do inglês, *stealth nanoparticles*), que são nanopartículas que sofrem modificações de superfície estratégicas para reduzir sua remoção prematura da circulação, o que pode ser obtido, por exemplo, por meio de polietilenoglicol (PEG) (AMOOZGAR; YEO, 2012). Outra medida que tem sido adotada é realizar a administração intra-arterial das nanopartículas próxima ao tumor, evitando, assim, que elas sejam capturadas e removidas antes de atingirem a massa tumoral (TIETZE et al., 2013; TIAN et al., 2013).

Neste estudo, foi escolhida a administração intratumoral das amostras. Uma vez que o câncer de pele oferece a facilidade de aplicação intratumoral ou até mesmo tópica da medicação, este método foi escolhido para tentar potencializar a entrega das nanopartículas ao tumor, já que a presença de grande quantidade de nanopartículas magnéticas no tumor é imprescindível para a realização da magnetohipertermia para tratamento do melanoma.

Para avaliar a nanotoxicidade *in vivo* podem ser utilizadas diferentes técnicas. Neste trabalho foram investigadas as mudanças sanguíneas em relação à bioquímica do soro e às populações de células, mudanças na morfologia do tecido, examinadas por histologia. Além disto, foi também avaliada a biodistribuição das nanopartículas que,

quando realizada por estudos morfológicos proporciona, simultaneamente, dados nanotoxicológicos (MARQUIS et al., 2009).

A injeção intratumoral dos fluidos magnéticos não provocou nenhuma alteração nos órgãos avaliados (fígado, baço, rim, pulmão e cérebro) e a coloração dos cortes histológicos por Perls revelou que não houve acúmulo de nanopartículas nestes tecidos e que as nanopartículas ficaram retidas no tumor. Xie e colaboradores (2012) também mostraram que a aplicação intratumoral de nanopartículas de ouro marcadas com cobre radioativo reduziu significativamente o acúmulo dessas partículas em outros tecidos e aumentou sua retenção no tumor. Em dois animais pertencentes ao grupo que recebeu injeção de FM, foi verificado acúmulo de NPM no fígado e pulmão 24 horas depois da aplicação, porém sem apresentar alterações histopatológicas nesses órgãos. A análise histológica dos tumores desses animais revelou a presença de nanopartículas dentro de vasos sanguíneos no tumor, levantando duas hipóteses. A primeira foi de que a aplicação tenha atingido algum vaso sanguíneo no tumor, hipótese sustentada pelo fato de que os vasos sanguíneos dos tumores são dilatados, densos e caoticamente organizados e, por isso, estão perfeitamente sujeitos a esse acontecimento. A segunda é de que as nanopartículas do fluido FM foram capazes de deixar o tumor, devido, justamente, à alta permeabilidade tumoral. Considerando que algumas características das nanopartículas (como a sua composição, tamanho, cobertura e carga) possuem impacto nas taxas de biodistribuição e excreção das mesmas (ALEXIS et al, 2008), considerando a semelhança entre o fluido FM e o fluido FMS nessas características, e que o acúmulo de nanopartículas magnéticas no fígado e pulmão só ocorreu em dois camundongos em um total de 12 animais do grupo FM, a segunda hipótese foi descartada e acredita-se que a injeção intratumoral da amostra tenha, portanto, ocasionalmente atingido a circulação sanguínea.

Nosso grupo de pesquisa tem investigado a biodistribuição e toxicidade de diversas nanopartículas de óxido de ferro e já foi demonstrado que a cobertura dessas nanopartículas tem grande influência nesses parâmetros (LACAVA et al., 2002; GARCIA, 2002; SADEGHIANI, 2004; BARBOSA, 2004; PORTILHO, 2007; ESTEVANATO et al., 2012a; MONGES-FUENTES, 2009). O achado, neste trabalho, do acúmulo de nanopartículas apenas no fígado e no pulmão, e não em outros órgãos, está de acordo com os dados encontrados por Pradhan e colaboradores (2007). Estes autores avaliaram a biodistribuição e toxicidade de nanopartículas de magnetita cobertas

com bicamada de ácido láurico, porém injetadas endovenosamente, e verificaram acúmulo das nanopartículas no fígado, pulmão e baço. Outro trabalho utilizando nanopartículas de maghemita com cobertura de ácido láurico em bicamada (CHAVES, 2008) também demonstrou a presença dessas partículas no pulmão, em tempos mais curtos de análise (24 h), e no fígado e baço, em períodos de tempo maiores. O trabalho realizado por Tietze (2013) também evidenciou acúmulo no fígado, baço e pulmão quando utilizou nanopartículas de óxido de ferro cobertas com ácido láurico e funcionalizadas com um agente quimioterápico. Vale ressaltar que no presente trabalho também foi detectada a presença de partículas de ferro no baço, evidenciadas pela coloração de Perls. Porém, não é possível dizer se esse acúmulo trata-se das NPM ou de ferro endógeno, uma vez que as células da polpa vermelha do baço estão envolvidas na destruição de células sanguíneas e na reabsorção do ferro (LACAVA et al., 2004). Animais com tumor, mas que não receberam fluido magnético, assim como os animais saudáveis, também apresentaram intensa marcação azul de Perls no baço, e não foi possível distinguir se havia maior quantidade de ferro no baço dos animais tratados em relação aos controles, impossibilitando, portanto, concluir que o ferro encontrado no baço dos animais provinha de acúmulo de NPM. Fato semelhante foi relatado por Khandhar e colaboradores (2013).

Não foram evidenciados aumentos no peso do fígado, do baço e dos rins e também não foram encontradas alterações histológicas nos órgãos analisados, como necrose e inflamação. Estes resultados estão de acordo com os achados de Pradhan e colaboradores (2007), que utilizaram o mesmo tipo de nanopartícula e com a mesma cobertura que a usada na amostra FM neste estudo. Estes pesquisadores mostraram que a arquitetura tecidual permaneceu inalterada e não houve mudanças inflamatórias ou patológicas quando as nanopartículas foram aplicadas endovenosamente na concentração de até 400 mg/ kg corpo do camundongo (PRADHAN et al., 2007a).

Além da análise morfológica dos tecidos, também foram avaliados os parâmetros bioquímicos e hematológicos dos animais que foram injetados com fluidos magnéticos. Algumas alterações verificadas nos exames de hematologia foram decorrentes da presença do melanoma em si, já que a mudança ocorreu não só nos grupos tratados com os fluidos magnéticos, mas também nos grupos de animais não tratados, somente portadores de tumor. Duas mudanças relacionadas ao tumor (ou seja, aquelas que foram significativamente diferentes entre os animais sem tumor e animais

com tumor e sem fluido magnético) foram a diminuição da quantidade de hemoglobina corpuscular média (HCM) e da concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), sugerindo um quadro de anemia hipocrômica para os animais portadores de melanoma, apesar de não ter sido evidenciada nenhuma alteração no volume médio dos eritrócitos, que geralmente acompanha as anemias microcíticas hipocrômicas (PORTILHO, 2011; SÉRGIO FRANCO, 2013).

Camundongos que receberam FMS tiveram uma melhora nos níveis de HCM e CHCM em 7 dias após a aplicação do fluido em relação aos animais não tratados no mesmo período, com os valores de HCM voltando, inclusive, a níveis compatíveis com os animais saudáveis. Também foi possível verificar um aumento significativo nas populações de neutrófilos e monócitos em relação aos valores de referência e em relação aos valores obtidos com análise de 1 dia, o que sugere que os animais poderiam estar desencadeando reações inflamatórias na tentativa de combater o tumor. Estes animais também tiveram diminuição significativa do volume plaquetário médio (VPM) e na razão de macroplaquetas (P-LCR) quando comparados ao grupo sem tumor. Alterações transitórias para estes animais foram observadas na largura de distribuição de plaquetas (PDW), no qual a análise com 7 dias revelou resgate deste parâmetro para os valores normais.

Para os animais que receberam a amostra FM, algumas alterações foram evidenciadas somente após 7 dias da aplicação da amostra, como a diminuição na quantidade de eritrócitos, hemoglobina e no hematócrito; grande aumento na quantidade de alanina aminotransferase (ALT); e diminuição nos níveis de fosfatase alcalina. Estes resultados indicam anemia e também disfunção hepática, já que níveis séricos de fosfatase alcalina, ALT e AST (aspartato aminotransferase) estão relacionados com a função do fígado (DIAL, 1995; PORTILHO, 2011). Animais que receberam FM também tiveram alterações transitórias, ou seja, os parâmetros estavam alterados após 24 h da aplicação da amostra, mas voltaram aos valores normais após 7 dias. Exemplos das mudanças temporárias foram diminuições na largura de distribuição dos eritrócitos (RDW), VPM, P-LCR e PDW.

Animais que não foram tratados com fluido magnético tiveram a quantidade de ferro sérica diminuída quando comparada com os valores de referência (animais sem tumor), indicando que a presença do tumor por longos períodos pode causar deficiência

de ferro, que é suprida quando os animais são administrados com nanopartículas de magnetita.

Em resumo, foi observado nos experimentos não ter havido nenhuma alteração hematológica ou bioquímica em 24 horas após os animais terem recebido os fluidos magnéticos com aplicação intratumoral. Provavelmente, se as amostras tivessem sido administradas de maneira endovenosa, também não teria havido toxicidade nesse período, como mostram os resultados de Pradhan e colaboradores (2007).

No presente trabalho foi demonstrado que as nanopartículas dos fluidos magnéticos FMS e FM possuem elevada densidade em imagens de microTC, sugerindo sua utilização neste tipo de exame. Este fato é relevante, pois a literatura é escassa em estudos que usam nanopartículas de óxido de ferro em imagens por tomografia computadorizada (TC). A maior parte dos trabalhos em imagem por TC mostram o uso de nanopartículas de ouro como contraste, mas já foi demonstrado também o uso de outros sistemas, como nanopartículas de óxido de tântalo (elemento de elevado número atômico, 73) (BONITATIBUS et al., 2010; XIAO et al., 2012), nanocompostos contendo iodo (número atômico 53) (GALPERIN et al., 2007; KONG et al., 2007; HALLOUARD et al., 2013) e ainda, nanopartículas híbridas de magnetita e ouro (NARAYANAN et al., 2012), as quais permitem imagem tanto por RM quanto por TC.

A elevada densidade dos fluidos magnéticos em microTC se deve principalmente ao elevado conteúdo de ferro das nanopartículas. Apesar de o ferro possuir um número atômico consideravelmente menor do que o iodo, a presença de altas concentrações desse elemento químico, como no caso de FMS e FM, seria suficiente para promover a atenuação de raios x nas imagens de microTC. No entanto, ao se confrontar a densidade das nanopartículas de ferro com a densidade de compostos iodados, cujo uso é bem estabelecido na prática clínica, é possível observar que o contraste das NPM fica comparativamente menor (Figura 30). Ao mesmo tempo, foi demonstrado que o Selol puro apresenta alta densidade nas imagens avaliadas, o que poderia justificar o maior contraste de FMS em relação à FM, apesar da amostra FM possuir maior conteúdo de ferro. Como o Selol apresentou uma excelente densidade nos resultados de microTC, especula-se que NPM com elevada concentração de ferro e funcionalizadas com maior quantidade de Selol do que a quantidade presente nas nanopartículas aqui utilizadas se tornariam um melhor meio de contraste e com

benefícios sobre os meios de contraste iodados comumente utilizados, uma vez que estes apresentam alta toxicidade para o organismo (HALLOUARD et al., 2013).

Esta pesquisa também mostra que os fluidos magnéticos FMS e FM, quando administrados no tumor dos camundongos, apresentam elevada densidade nas análises tomográficas. Até onde se sabe, este é um dos poucos trabalhos a demonstrar o uso de nanopartículas de magnetita em imagens de microTC *in vivo*, sem necessitar de adição de moléculas ou compostos de contraste.

Artigos que relatam o uso de nanopartículas férricas em imagem de TC relatam basicamente modelos *ex vivo* de visualização, no qual órgãos e tumores foram visualizados em parafina, como, por exemplo, o trabalho de Torrente e colaboradores (2006), que mostrou a utilização da microTC para caracterizar a distribuição de células tronco, marcadas com nanopartículas magnéticas, após entrega intra-arterial em camundongos. Amostras de músculo destes animais foram escaneadas em alta resolução e as diferenças nas taxas de absorção de raios x permitiram identificar e quantificar concentrações maiores que 50.000 células marcadas com nanopartículas (TORRENTE et al., 2006). Outro estudo mostrou que nanopartículas de magnetita puderam ser visualizadas em segmentos de artéria bovina *ex vivo* após aderência das nanopartículas causadas pela aplicação de um campo magnético externo (TIETZE et al., 2011). Em ambos os casos, a técnica de microTC possibilitou a detecção de nanopartículas de óxido de ferro em alta definição e resolução, e permitiu responder à questão de como elas estavam espacialmente arrançadas dentro dos tecidos analisados. Ainda de modo mais interessante para o campo da magnetohipertermia, Brunke e colaboradores (2005) mostraram a utilização da microTC como ferramenta para análises tridimensionais da distribuição de nanopartículas magnéticas em tumores.

No presente estudo também foi possível utilizar a microTC para avaliar a biodistribuição das NPM quando estas foram injetadas diretamente no tumor. Os animais foram injetados com as amostras e foram acompanhados por até 72 h, em escaneamentos periódicos ao longo deste tempo. Foi possível concluir que as amostras permaneceram no tumor por até 72 h após a aplicação dos fluidos magnéticos. Essa biodistribuição intratumoral foi quantificada em unidades de TC, ou seja, HU (Unidades de Hounsfield), e a quantificação confirmou a retenção das nanopartículas dentro do tumor. Quando as nanopartículas foram injetadas no nódulo do melanoma, o tumor passou a apresentar em média 800 HU, comparado com 400 HU do tecido tumoral sem

a presença de fluido magnético. A densidade obtida pelo uso das NPM de FMS e FM dentro do tumor foi semelhante à produzida por lipossomos iodinados entregues ao tumor via injeção endovenosa, os quais mostraram  $861 \pm 180$  HU na vasculatura tumoral e  $535 \pm 113$  HU no músculo (SAMEI et al., 2009). Os autores também viram que este aumento de contraste persistiu até o tempo final de análise, que foi de 4 h após a injeção. Outro trabalho que realizou a quantificação da densidade promovida por agentes nanoparticulados em tumores mostrou que dendrímeros acetilados com nanopartículas de ouro produziram densidade de 400 HU na primeira hora após a injeção intratumoral dos dendrímeros, mas essa quantificação caiu pela metade após 6 h da aplicação (WANG et al., 2011). Confrontando estes resultados com os dados obtidos no presente estudo, fica evidenciada a potencialidade do fluido magnético FMS em absorver raios x e sua utilização como meio de contraste na técnica de microTC. Além disso, é possível concluir também que as nanopartículas de FMS e FM possuem maior retenção tumoral do que a relatada na literatura (SAMEI et al., 2009; WANG et al., 2011). Essa retenção tumoral, que foi confirmada por análises histológicas, é extremamente importante para a padronização da magnetohipertermia e permite que uma única dose das amostras magnéticas seja aplicada nos tumores a serem tratados, evitando, assim, injúrias teciduais e desconforto para os pacientes, aumentando, portanto, a eficácia da magnetohipertermia.

Terapias de aquecimento como a hipertermia e a termoablação são abordagens promissoras para o tratamento do câncer (MAIER-HAUFF et al., 2007). A terapia de hipertermia utilizando fluido magnético alcança bons resultados porque aquece o tumor de forma mais uniforme que a hipertermia atingida com mecanismos tradicionais (CHATTERJEE; DIAGARADJANE; KRISHNAN, 2011) e é capaz de atingir aqueles nódulos tumorais situados mais profundamente no organismo. A hipertermia intersticial seguida de injeção direta das nanopartículas no tumor também tem demonstrado sucesso em modelos animais (DU et al., 2009).

Neste trabalho foi utilizada a injeção intratumoral de NPM seguida de aplicação de campo magnético alternado (CMA) para tratar o melanoma. A injeção intratumoral foi escolhida porque, além de permitir um aumento de temperatura mais localizado sem danificar tecidos sadios adjacentes, os tumores de pele oferecem a facilidade de tratamentos intratumoral e tópico sem maiores dificuldades. No entanto, para tumores

mais profundos, essa metodologia intratumoral também pode ser empregada com o auxílio de técnicas de injeção guiada (TC, ultrassom, endoscopia).

O tratamento do melanoma com magnetohipertermia mostrou resultados promissores quando os dados foram analisados no dia seguinte ao término da terapia. Para os animais tratados com nanopartículas e CMA, foi utilizado 1 ciclo de tratamento, que corresponde a uma aplicação da amostra magnética e 3 exposições ao CMA por 30 minutos cada em dias consecutivos. Verificou-se, após 1 dia do final do ciclo de tratamento, que os animais dos grupos tratados com FMS e FM estavam ativos e agitados (comportamento característico de camundongos da linhagem C57BL/6), e mantiveram seu peso corporal durante o tratamento. Por outro lado, os animais que não receberam tratamento apresentavam-se apáticos e com atividade motora diminuída, e apresentaram queda de peso após o tratamento, apesar da diferença entre os pesos dos animais não terem sido significativas.

O volume e peso dos tumores dos animais tratados também foram menores em relação aos animais não tratados. Embora esses resultados também não tenham sido significativos, eles sugerem que o tratamento com magnetohipertermia utilizando NPM com Selol pode ser promissor, se alguns parâmetros puderem ser melhorados e melhor adequados à situação. Um exemplo de melhora que poderia ser efetuada é associar um quimioterápico às nanopartículas, de forma a potencializar o efeito antitumoral. Já foi demonstrado que o Selol possui ação sensibilizadora de células leucêmicas resistentes, tornando-as sensíveis ao tratamento quimioterápico convencional (SUCHOCKI et al, 2007). Além disso, Estevanato (2012) mostrou uma redução de aproximadamente 70% no volume tumoral e 55% no peso do tumor dos animais tratados com uma combinação de nanocápsulas magnéticas contendo Selol, Paclitaxel e CMA.

A porcentagem de necrose encontrada nos tumores dos animais tratados com as amostras de fluidos magnéticos + CMA foi cerca de 5 vezes maior em relação aos animais não tratados e aqueles submetidos apenas ao CMA. Estes resultados estão de acordo com outros estudos que também mostraram que o CMA sozinho não foi capaz de promover a morte das células, mas que a associação de nanopartículas magnéticas com a exposição ao CMA elevou o percentual de necrose em tumores sólidos (ESTEVANATO, 2012; PORTILHO, 2011). Portilho (2011) verificou 76 a 100% de necrose em tumores sólidos de Ehrlich de animais tratados com polímeros de albumina magnéticos e CMA duas vezes ao dia durante três dias consecutivos. Estevanato (2012),

apesar de não ter quantificado o percentual de necrose, observou maior ocorrência de necrose tecidual quando o tratamento de adenocarcinoma mamário murino foi feito com nanocápsulas magnéticas de Selol juntamente com o quimioterápico Paclitaxel. Sabe-se que a eficiência da MHT está relacionada a alguns fatores como o tamanho, distribuição de tamanho e forma das nanopartículas, assim como a frequência e força do campo magnético utilizado (ARMIJO et al., 2012; KHANDHAR et al., 2012b). As diferenças observadas entre os estudos citados acima e o presente trabalho podem ser explicadas pelos parâmetros inerentes às nanopartículas (tamanho, forma, quantidade de ferro), que foram bem diferentes das nanopartículas utilizadas neste trabalho, pelos tipos de tumores tratados, os quais respondem de forma diferente às terapias, e também pelo instrumento gerador de campo magnético de frequência alternada utilizado, que foi um equipamento gerador de campo eletromagnético que opera a 1 mHz e 40 Oe de campo magnético (ESTEVANATO, 2012; FALQUEIRO et al., 2012; PORTILHO, 2011). No presente estudo foi utilizado o equipamento gerador de campo magnético de frequência alternada MagneTherm (NanoTherics) e até onde se sabe, este é o primeiro trabalho a utilizar este equipamento para experimentos utilizando animais. Este equipamento tem seu uso bem estabelecido *in vitro* (ARMIJO et al., 2012; KHANDHAR; FERGUSON; KRISHNAN, 2011; KHANDHAR et al., 2012a, 2012b) e permite testar diferentes frequências e intensidades do campo magnético para adequar os melhores resultados de aquecimento às características das nanopartículas utilizadas, conforme os testes realizados neste estudo e mostrado nas Figuras 31, 32 e 33. Sendo a perda de histerese o principal fator de aquecimento de uma amostra nanomagnética, a potência de aquecimento seria proporcional à frequência aplicada do campo magnético (ARMIJO et al., 2012). A Tabela 5 mostra as diferentes condições testadas para os fluidos FMS e FM e os resultados mostraram que a potência de aquecimento não aumentou de maneira proporcional ao aumento de frequência. Estes resultados podem ser explicados pelo fato de que nas diferentes condições testadas, não ocorreu mudança somente na frequência do campo magnético, mas também na amplitude do campo, que também é um fator importante para o aquecimento das amostras. À medida que a frequência aumentava, a intensidade do campo magnético diminuía e isto pode explicar, portanto, porque o aquecimento dos fluidos magnéticos não foi proporcional ao aumento da frequência. A importância desses dois parâmetros para o aquecimento das amostras justifica a

obtenção de melhores resultados nas condições intermediárias testadas (frequência de 330 kHz e campo magnético de 12 mT).

Se por um lado a análise realizada após 1 dia do término do tratamento mostrou resultados promissores em relação ao volume, peso e necrose tumoral, por outro lado a análise de 7 dias mostrou que os tumores dos animais que receberam magnetohipertermia voltaram a crescer descontroladamente, assim como os tumores de animais não tratados.

Em relação aos exames hematológicos e bioquímicos dos animais nesse experimento, pode-se dizer que a alteração mais pronunciada e que foi apresentada em todos os grupos acompanhados por 7 dias após o tratamento com magnetohipertermia foi a mudança de valores da fosfatase alcalina. Os níveis dessa enzima nesses grupos diminuíram muito em relação aos valores de referência e em relação aos respectivos grupos analisados após 1 dia do tratamento, indicando grande disfunção hepática nos animais após o período de acompanhamento após terapia.

Os animais tratados com FMS + CMA, apresentaram níveis diminuídos de eritrócitos, de hemoglobina e de plaquetas, e níveis aumentados de volume corpuscular médio (VCM) após 7 dias do final do tratamento. Ocorreram diminuições transitórias na quantidade de linfócitos e volume plaquetário médio (VPM) nesses animais.

Alterações semelhantes, analisadas após 7 dias do final do tratamento, foram obtidas nos animais que receberam FM e foram submetidos ao CMA: diminuição de eritrócitos e hemoglobina; aumento da porcentagem de largura de distribuição dos eritrócitos (RDW) (anisocitose) e volume corpuscular médio (VCM); diminuição do número de linfócitos; aumento do volume plaquetário médio (VPM); grande aumento de níveis de AST (aspartato aminotransferase). A única alteração transitória evidenciada quando os animais foram tratados com FM + CMA foi a diminuição do ferro sérico.

Foi detectada diminuição na quantidade de linfócitos nos animais que receberam somente CMA, podendo atribuir à presença do campo magnético esta alteração, a qual também esteve presente nos outros grupos que receberam CMA, mas que os animais tratados com FMS conseguiram superar essa alteração, fazendo com que a mudança na quantidade dessas células tenha sido transitória.

Especula-se que um dos motivos pelo qual o tratamento não tenha obtido sucesso tenha sido a quantidade de amostra aplicada no tumor dos camundongos. Este trabalho foi inicialmente baseado nos estudos de Balivada e colaboradores (2010), os

quais também utilizaram o modelo de melanoma murino e o trataram com magnetohipertermia intratumoral injetando-se uma quantidade total de 360  $\mu\text{g}$  de ferro em tumores pequenos, menores do que 50  $\text{mm}^3$ . Nos experimentos aqui conduzidos, foi utilizado o máximo de volume de amostra capaz de ser injetado no tumor, cujo volume médio era de 45  $\text{mm}^3$ . O volume de 40  $\mu\text{L}$  injetado corresponde a 735  $\mu\text{g}$  de ferro para a amostra FMS e 832  $\mu\text{g}$  de ferro para a amostra FM, indicando o dobro da quantidade de ferro utilizada por Balivada e colaboradores (2010). No entanto, a maioria dos artigos publicados relatando sucesso com o tratamento de hipertermia magnética utiliza de 2 a 3 mg de ferro, em volumes de aplicação que variam de 100 a 400  $\mu\text{L}$  (ITO et al., 2003b; YANASE et al., 1998a, 1998b; SILVA et al., 2011). Para alcançar essas quantidades de ferro e permitir aplicações de grandes volumes de fluido magnético, os autores desses trabalhos citados utilizavam tumores que tinham de 10 a 18 mm de diâmetro em seu maior comprimento no momento do tratamento. O melanoma é um tumor extremamente agressivo e com elevadas taxas de mortalidade, como mostrado na curva de crescimento tumoral neste trabalho e no artigo de Ito e colaboradores (2003b). De acordo com nosso estudo, para que o melanoma chegasse a um tamanho equivalente ao utilizado nos trabalhos citados anteriormente, os animais teriam que iniciar o tratamento por volta do 15º dia. Só que neste tempo de análise, a taxa de mortalidade dos animais seria alta, de aproximadamente 40% segundo os dados mostrados no experimento de acompanhamento do desenvolvimento tumoral, onde foi verificada a morte espontânea de 3 animais, tendo estes morrido no 9º, 15º e 17º dia. De fato, trabalhos que utilizam o melanoma como modelo para tratamento de magnetohipertermia, utilizam tumores com tamanhos entre 5 e 6 mm de diâmetro (BALIVADA et al., 2010; ITO et al., 2003b; SUZUKI et al., 2003), como foi no caso desta pesquisa. Trabalhos que mostram efetividade no tratamento com magnetohipertermia utilizando tumores pequenos, mas com volumes de injeção de amostra de até 400  $\mu\text{L}$ , relatam a utilização de bombas de infusão, com fluxo lento e contínuo (SUZUKI et al., 2003; ITO et al., 2003a, 2003b). No entanto, tal dispositivo de grande precisão não está disponível em nosso laboratório, não tendo sido possível testar se esse método de aplicação permitiria injetar uma grande quantidade dos fluidos magnéticos.

Em relação aos resultados qualitativos obtidos por imagens termográficas que mostram o aquecimento do fluido FMS dentro do tumor de animais que foram submetidos ao CMA, esse teste foi feito injetando-se uma quantidade maior de amostra

(220  $\mu\text{L}$ ) em um tumor de volume também maior (aproximadamente 500  $\text{mm}^3$ ), o que explica o alcance de aquecimento tumoral nesses animais, de acordo com os resultados mostrados na Figura 46.

Outro motivo pelo qual a MHT não foi eficiente pode estar relacionado ao número amostral de camundongos em cada grupo. Uma vez que o melanoma murino apresenta elevada taxa de mortalidade, alguns camundongos foram perdidos durante a fase experimental, diminuindo, portanto, o número amostral. Acredita-se que, aumentando a quantidade de animais em cada grupo, os resultados de redução de volume e peso tumoral, assim como os resultados de aumento de necrose tecidual, passariam a ser significativos. Um exemplo da variação de resultados intragrupo e que resultou em grande desvio padrão da média foi o percentual de necrose no grupo tratado com FMS + CMA. Com apenas 5 animais no grupo, a média de necrose obtida foi de 30%. No entanto, um animal apresentou necrose de 63%, aumentando o desvio padrão dos resultados e tornando-os, provavelmente, não significativos em relação aos demais grupos.

Outra hipótese formulada para tentar explicar a eficácia parcial da MHT foi o regime aplicado para esta terapia. O regime escolhido foi de 1 ciclo de tratamento, que implica em uma administração do fluido magnético e 3 exposições ao CMA por 30 minutos cada. Os regimes de tratamento mais utilizados na literatura relatam uma, duas ou três exposições ao CMA por 30 minutos com intervalos de 24 h entre eles (DU et al., 2009; ITO et al., 2003a, 2003b; KIKUMORI et al., 2009; PORTILHO, 2011; RACHAKATLA et al., 2010; REN et al., 2012; SUZUKI et al., 2003; WANG et al., 2009; YANASE et al., 1998a; ZHAO et al., 2012). No entanto, alguns trabalhos também utilizam a hipertermia magnética por até 6 vezes de 20 ou 30 minutos cada (HOU et al., 2009; ITO et al., 2003c). No caso deste trabalho, como os resultados mostraram-se promissores após 1 ciclo de tratamento, acredita-se que a aplicação de novos ciclos com intervalos adequados possa causar efeitos mais pronunciados de redução tumoral.

## 6 CONCLUSÕES

Neste trabalho, uma nova amostra de fluido magnético, denominada FMS, composta de nanopartículas de magnetita cobertas com bicamada de ácido láurico e contendo Selol foi caracterizada e testada quanto ao seu potencial para visualização em imagens de microTC e para tratamento do melanoma murino com magnetohipertermia (MHT). Com base nos resultados obtidos, pode-se concluir que:

- 1) Através de microscopia eletrônica de transmissão (MET), foi visto que FMS é composto de nanopartículas magnéticas (NPM) de forma esférica e com diâmetro físico médio de 8,3 nm;
- 2) Pela técnica de espalhamento de luz dinâmico, demonstrou-se que o diâmetro hidrodinâmico médio de FMS não variou significativamente ao longo de 48 meses de análises e que as NPM possuem distribuição homogênea de tamanho;
- 3) Medidas do potencial zeta evidenciaram NPM carregadas negativamente e sem variação significativa de seu valor ao longo de 48 meses após o preparo de FMS, o que sugere boa estabilidade da amostra;
- 4) Verificou-se, pelo ensaio de MTT, que FMS não foi tóxico para células de melanoma da linhagem B16-F10 em concentrações até 75 µg Fe/mL em 24 e 48 h de incubação;
- 5) Imagens de MET mostraram que as nanopartículas de FMS foram interiorizadas pelas células de melanoma, sendo encontradas no citoplasma das células tumorais dentro de estruturas semelhantes a vesículas, e que essa interiorização foi observada a partir de 4 h de incubação das NPM com as células;
- 6) Alíquotas de FMS, assim como alíquotas de Selol puro, apresentaram densidade adequada nos testes de microTC, permitindo a visualização dessas amostras nesse tipo de imagem;

- 7) Pela técnica de microTC, mostrou-se que FMS injetado no melanoma dos animais permaneceu no sítio tumoral por até 72 h e essa retenção tumoral foi confirmada por análises histológicas;
- 8) A microTC mostrou-se uma abordagem mais simples e mais rápida comparada às técnicas histológicas para visualização da distribuição de FMS pelo tumor;
- 9) Avaliações histopatológicas, hematológicas e bioquímicas revelaram que a injeção intratumoral de FMS não foi tóxica para os órgãos analisados (fígado, baço, rins, pulmões e cérebro) e nem mostrou acúmulo de partículas nesses tecidos, sendo considerada, portanto, biocompatível;
- 10) Alíquotas de FMS apresentaram aquecimento compatível com a realização de MHT quando foram submetidas a diferentes condições no equipamento gerador de campo magnético de frequência alternada;
- 11) FMS foi utilizado no tratamento do melanoma murino utilizando MHT e a eficácia desse tratamento foi evidenciada pelas melhores condições clínicas, manutenção do peso corporal, diminuição do volume e peso dos tumores, e maior percentual de necrose nos tumores dos animais tratados em relação aos não tratados.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGÊNCIA BRASIL. **Governo vai investir R\$ 440 milhões em nanotecnologia.** Brasília, 20 ago. 2013. Disponível em <<http://agenciabrasil.ebc.com.br/noticia/2013-08-20/governo-vai-investir-r-440-milhoes-em-nanotecnologia>>. Acesso em: ago. 2013.

ALEXIOU, C.; JURGONS, R.; SELIGER, C.; BRUNKE, O.; IRO, H.; ODENBACH, S. Delivery of superparamagnetic nanoparticles for local chemotherapy after intraarterial infusion and magnetic drug targeting. **Anticancer Res**, v. 27, n. 4A, p. 2019-22, Jul-Ago 2007.

ALEXIS, F.; PRIDGEN, E.; MOLNAR, L. K.; FAROKHZAD, O. C. Factors affecting the clearance and biodistribution of polymeric nanoparticles. **Mol Pharm**, v. 5, n. 4, p. 505-15, Jul-Ago 2008.

ALSTON, D.; BREWER, J. D. Immunotherapy in the management of melanoma: current status. **Immuno Targets and Therapy**, v. 2, p. 1-10, Fev 2013.

AMERICAN CANCER SOCIETY. **What is melanoma skin cancer?** Disponível em: <<http://www.cancer.org/cancer/skincancer-melanoma/detailedguide/melanoma-skin-cancer-what-is-melanoma>>. Acesso em: out. 2013.

AMERICAN JOINT COMMITTEE ON CANCER. **Cancer Staging Manual**. 6. ed. Chicago: Springer, 2002.

AMERICAN JOINT COMMITTEE ON CANCER. **Cancer Staging Manual**. 7. ed. Chicago: Springer, 2009.

AMOOZGAR, Z.; YEO, Y. Recent advances in stealth coating of nanoparticle drug delivery systems. **Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol**, v. 4, n. 2, p. 219-33, Mar-Abr 2012.

ARMIJO, L. M.; BRANDT, Y. I.; MATHEW, D.; YADAV, S.; MAESTAS, S.; RIVERA, A. C.; COOK, N. C.; WITHERS, N. J.; SMOLYAKOV, G. A.; ADOLPHI, N. L.; MONSON, T. C.; HUBER, D. L.; SMYTH, H. D. C.; OSIŃSKI, M. Iron Oxide Nanocrystals for Magnetic Hyperthermia Applications. **Nanomaterials**, v. 2, p. 134-146, 2012.

ASGARI, M. M.; MARUTI, S. S.; KUSHI, L. H.; WHITE, E. Antioxidant supplementation and risk of incident melanomas: results of a large prospective cohort study. **Arch Dermatol**, v. 145, n. 8, p. 879-82, Ago 2009.

AVDEEV, M. V.; MUCHA, B.; LAMSZUS, K.; VEKAS, L.; GARAMUS, V. M.; FEOKTYSTOV, A. V.; MARINICA, O.; TURCU, R.; WILLUMEIT, R. Structure and in vitro biological testing of water-based ferrofluids stabilized by monocarboxylic acids. **Langmuir**, v. 26, n. 11, p. 8503-9, Jun 2010.

BALIVADA, S.; RACHAKATLA, R. S.; WANG, H.; SAMARAKOON, T. N.; DANI, R. K.; PYLE, M.; KROH, F. O.; WALKER, B.; LEAYM, X.; KOPER, O. B.; TAMURA, M.; CHIKAN, V.; BOSSMANN, S. H.; TROYER, D. L. A/C magnetic

hyperthermia of melanoma mediated by iron(0)/iron oxide core/shell magnetic nanoparticles: a mouse study. **BMC Cancer**, v. 10, p. 119, Mar 2010.

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

BARONZIO, G.; GRAMAGLIA, A.; FIORENTINI, G. Review. Current role and future perspectives of hyperthermia for prostate cancer treatment. **In Vivo**, v. 23, n. 1, p. 143-6, Jan-Fev 2009.

BARREFELT, A. A.; BRISMAR, T. B.; EGRI, G.; ASPELIN, P.; OLSSON, A.; ODDO, L.; MARGHERITELLI, S.; CAIDAH, K.; PARADOSSI, G.; DAHNE, L.; AXELSSON, R.; HASSAN, M. Multimodality imaging using SPECT/CT and MRI and ligand functionalized <sup>99m</sup>Tc-labeled magnetic microbubbles. **EJNMMI Res**, v. 3, n. 1, p. 12, 2013.

BI, X.; STERLING, J. A.; MERKEL, A. R.; PERRIEN, D. S.; NYMAN, J. S.; MAHADEVAN-JANSEN, A. Prostate cancer metastases alter bone mineral and matrix composition independent of effects on bone architecture in mice--a quantitative study using microCT and Raman spectroscopy. **Bone**, v. 56, n. 2, p. 454-60, Out 2013.

BIS, S.; TSAO, H. Melanoma genetics: the other side. **Clin Dermatol**, v. 31, n. 2, p. 148-55, Mar-Abr 2013.

BISCHOFF, J.; LINDNER, L. H.; ISSELS, R. D.; COSTA, S. Clinical impact of locoregional hyperthermia in gynecological oncology. **Zentralbl Gynakol**, v. 128, n. 5, p. 255-60, Out 2006.

BISHT, S.; MAITRA, A. Dextran-doxorubicin/chitosan nanoparticles for solid tumor therapy. **Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol**, v. 1, n. 4, p. 415-25, Jul-Ago 2009.

BONFÁ, R.; BONAMIGO, R. R.; DURO, K. M.; FURIAN, R. D.; ZELMANOWICZ, A. M. Early diagnosis of cutaneous melanoma: an observation in southern Brazil. **An Bras Dermatol**, v. 86, n. 2, p. 215-21, Mar-Abr 2011.

BONITATIBUS, P. J., JR.; TORRES, A. S.; GODDARD, G. D.; FITZGERALD, P. F.; KULKARNI, A. M. Synthesis, characterization, and computed tomography imaging of a tantalum oxide nanoparticle imaging agent. **Chem Commun (Camb)**, v. 46, n. 47, p. 8956-8, Dez 2010.

BRUKER. **Bruker microCT**. SkyScan 2011 x-ray nanotomograph. Disponível em: <<http://www.skyscan.be/products/2011.htm>>. Acesso em: nov. 2013.

BRUNKE, O.; ODENBACH, S.; FRITSCH, C.; HILGER, I.; KAISER, W. A. Determination of magnetic particle distribution in biomedical applications by X-ray microtomography. **J Magn Magn Mater**, v. 289, p. 428-430, 2005.

BUCHAN, B. W.; GINOCCHIO, C. C.; MANII, R.; CAVAGNOLO, R.; PANCHOLI, P.; SWYERS, L.; THOMSON, R. B., JR.; ANDERSON, C.; KAUL, K.; LEDEBOER, N. A. Multiplex identification of gram-positive bacteria and resistance determinants directly from positive blood culture broths: evaluation of an automated microarray-based nucleic acid test. **PLoS Med**, v. 10, n. 7, p. e1001478, Jul 2013.

CAMPOS DA PAZ, M. **Conjugação de anticorpo anti-antígeno carcinoembrionário a nanopartículas magnéticas: avaliação do potencial para detecção e tratamento de câncer**. 2012. 135p. Tese (Doutorado em Patologia Molecular) – Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília, Brasília, 2012.

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

CARNEIRO, M. L.; PEIXOTO, R. C.; JOANITTI, G. A.; OLIVEIRA, R. G.; TELLES, L. A.; MIRANDA-VILELA, A. L.; BOCCA, A. L.; VIANNA, L. M.; DA SILVA, I. C.; DE SOUZA, A. R.; LACAVA, Z. G.; BAO, S. N. Antitumor effect and toxicity of free rhodium (II) citrate and rhodium (II) citrate-loaded maghemite nanoparticles in mice bearing breast cancer. **J Nanobiotechnology**, v. 11, p. 4, Fev 2013.

CHATTERJEE, D. K.; DIAGARADJANE, P.; KRISHNAN, S. Nanoparticle-mediated hyperthermia in cancer therapy. **Ther Deliv**, v. 2, n. 8, p. 1001-1014, Ago 2011.

CHAVES, S.B. **Efeitos biológicos de nanopartículas magnéticas recobertas por bicamada de ácido láurico: estudos *in vitro* e *in vivo***. 2008. 112 p. Tese (Doutorado em Biologia Animal) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Brasília, 2008.

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

CHENG, L.; YANG, K.; LI, Y.; ZENG, X.; SHAO, M.; LEE, S. T.; LIU, Z. Multifunctional nanoparticles for upconversion luminescence/MR multimodal imaging and magnetically targeted photothermal therapy. **Biomaterials**, v. 33, n. 7, p. 2215-22, Mar 2012.

CHO, E. C.; GLAUS, C.; CHEN, J.; WELCH, M. J.; XIA, Y. Inorganic nanoparticle-based contrast agents for molecular imaging. **Trends Mol Med**, v. 16, n. 12, p. 561-73, Dez 2010.

CHUDNOVSKY, Y.; KHAVARI, P. A.; ADAMS, A. E. Melanoma genetics and the development of rational therapeutics. **J Clin Invest**, v. 115, n. 4, p. 813-24, Abr 2005.

CINTRA E SILVA, D. DE O.; ESTEVANATO, L. L.; SIMIONI, A. R.; RODRIGUES, M. M.; LACAVA, B. M.; LACAVA, Z. G.; TEDESCO, A. C.; MORAIS, P. C.; BÁO,

S. N. Successful strategy for targeting the central nervous system using magnetic albumin nanospheres. **J Biomed Nanotechnol**, v. 8, n. 1, p. 182-9, Fev 2012.

CLARK, W. H., JR.; ELDER, D. E.; GUERRY, D. th; EPSTEIN, M. N.; GREENE, M. H.; VAN HORN, M. A study of tumor progression: the precursor lesions of superficial spreading and nodular melanoma. **Hum Pathol**, v. 15, n. 12, p. 1147-65, Dez 1984.

COLE, A. J.; YANG, V. C.; DAVID, A. E. Cancer theranostics: the rise of targeted magnetic nanoparticles. **Trends Biotechnol**, v. 29, n. 7, p. 323-32, Jul 2011.

CORCHERO, J. L.; VILLAVERDE, A. Biomedical applications of distally controlled magnetic nanoparticles. **Trends Biotechnol**, v. 27, n. 8, p. 468-76, Ago 2009.

COUNCIL, M. L. Common skin cancers in older adults: approach to diagnosis and management. **Clin Geriatr Med**, v. 29, n. 2, p. 361-72, Maio 2013.

DA PAZ, M. C.; SANTOS, M. DE F.; SANTOS, C. M.; DA SILVA, S. W.; DE SOUZA, L. B.; LIMA E. C.; SILVA, R. C.; LUCCI, C. M.; MORAIS, P. C.; AZEVEDO, R. B.; LACAVALA, Z. G. Anti-CEA loaded maghemite nanoparticles as a theragnostic device for colorectal cancer. **Int J Nanomedicine**, v. 7, p. 5271-82, Out. 2012.

DAS, M.; DHAK, P.; GUPTA, S.; MISHRA, D.; MAITI, T. K.; BASAK, A.; PRAMANIK, P. Highly biocompatible and water-dispersible, amine functionalized magnetite nanoparticles, prepared by a low temperature, air-assisted polyol process: a new platform for bio-separation and diagnostics. **Nanotechnology**, v. 21, n. 12, p. 125103, Mar 2010.

DE SOUZA, F. F.; DOS SANTOS, M. C.; DOS PASSOS, D. C.; LIMA, E. C.; GUILLO, L. A. Curcumin associated magnetite nanoparticles inhibit in vitro melanoma cell growth. **J Nanosci Nanotechnol**, v. 11, n. 9, 7603-10, Set 2011.

DEBBAGE, P.; JASCHKE, W. Molecular imaging with nanoparticles: giant roles for dwarf actors. **Histochem Cell Biol**, v. 130, n. 5, p. 845-75, Nov 2008.

DELOUISE, L. A. Applications of nanotechnology in dermatology. **J Invest Dermatol**, v. 132, n. 3 Pt 2, p. 964-75, Mar 2012.

DIAL, S. M. Clinicopathologic evaluation of the liver. **Vet Clin North Am Small Anim Pract**, v. 25, n. 2, p. 257-73, Mar 1995.

DOLL, T. A.; RAMAN, S.; DEY, R.; BURKHARD, P. Nanoscale assemblies and their biomedical applications. **J R Soc Interface**, v. 10, n. 80, p. 20120740, Mar 2013.

DOS SANTOS, M. C. **Nanopartículas magnéticas funcionalizadas com bicamada de ácido láurico: caracterização, associação de moléculas bioativas e estudo de interação com BSA**. 2012. 88p. Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Química, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2012.

DREXLER, K. E. **Metamodern, The Trajectory of Technology**. Disponível em: <<http://metamodern.com/about-the-author/>>. Acesso em: ago. 2013.

DREXLER, K. E. Molecular engineering: An approach to the development of general capabilities for molecular manipulation. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 78, n. 9, p. 5275-8, Set 1981.

DREXLER, K. E. Molecular Machinery and Manufacturing with Applications to Computation. Ph.D. thesis. Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, MA, 1991.

DU, Y.; ZHANG, D.; LIU, H.; LAI, R. Thermochemotherapy effect of nanosized As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> complex on experimental mouse tumors and its influence on the expression of CD44v6, VEGF-C and MMP-9. **BMC Biotechnol**, v. 9, p. 84, 2009.

DUBAS, L. E.; INGRAFFEA, A. Nonmelanoma skin cancer. **Facial Plast Surg Clin North Am**, v. 21, n. 1, p. 43-53, Fev 2013.

DUMMER, R.; PITTELKOW, M. R.; IWATSUKI, K.; GREEN, A.; ELWAN, N. M. Skin Cancer – A World-Wide Perspective. 2011, XI, 398p. Springer, 2011.

DUNKI-JACOBS, E. M.; CALLENDER, G. G.; MCMASTERS, K. M. Current management of melanoma. **Curr Probl Surg**, v. 50, n. 8, p. 351-82, Ago 2013.

DURÁN, N., MARCATO, P.D. Nanobiotechnology perspectives. Role of nanotechnology in the food industry: A review. **Int J Food Sci Technol**, v. 48, n. 6, p. 1127-1134, Jun 2013.

ERNSTING, M. J.; MURAKAMI, M.; ROY, A.; LI, S. D. Factors controlling the pharmacokinetics, biodistribution and intratumoral penetration of nanoparticles. **J Control Release**, v. 172, n. 3, p. 782-794, Set 2013.

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

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

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

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

EZZEDINE, K.; LATREILLE, J.; KESSE-GUYOT, E.; GALAN, P.; HERCBERG, S.; GUINOT, C.; MALVY, D. Incidence of skin cancers during 5-year follow-up after stopping antioxidant vitamins and mineral supplementation. **Eur J Cancer**, v. 46, n. 18, p. 3316-22, Dez 2010.

FABIAN, E.; LANDSIEDEL, R.; MA-HOCK, L.; WIENCH, K.; WOHLLEBEN, W.; VAN RAVENZWAAY, B. Tissue distribution and toxicity of intravenously administered titanium dioxide nanoparticles in rats. **Arch Toxicol**, v. 82, n. 3, p. 151-7, Mar 2008.

FAIRWEATHER-TAIT, S. J.; BAO, Y.; BROADLEY, M. R.; COLLINGS, R.; FORD, D.; HESKETH, J. E.; HURST, R. Selenium in human health and disease. **Antioxid Redox Signal**, v. 14, n. 7, p. 1337-83, Abr 2011.

FAKRUDDIN, M.; HOSSAIN, Z.; AFROZ, H. Prospects and applications of nanobiotechnology: a medical perspective. **J Nanobiotechnology**, v. 10, p. 31, Jul 2012.

FALQUEIRO, A. M.; SIQUEIRA-MOURA, M. P.; JARDIM, D. R.; PRIMO, F. L.; MORAIS, P. C.; MOSINIEWWICZ-SZABLEWSKA, E.; SUCHOCKI, P.; TEDESCO, A. C. In vitro cytotoxicity of Selol-loaded magnetic nanocapsules against neoplastic cell lines under AC magnetic field activation. **J Appl Phys**, v. 111, n. 7, p. 07B335, Mar 2012.

FEYNMAN, R. P. **There is plenty of room at the bottom.** In: American Physical Society, Pasadena, California, 1959.

GAJEWICZ, A. RASULEV, B.; DINADAYALANE, T. C.; URBASZEK, P.; PUZYN, T.; LESZCZYNSKA, D.; LESZCZYNSKI, J. Advancing risk assessment of engineered nanomaterials: application of computational approaches. **Adv Drug Deliv Rev**, v. 64, n. 15, p. 1663-93, Dez 2012.

GALPERIN, A.; MARGEL, D.; BANIEL, J.; DANK, G.; BITON, H.; MARGEL, S. Radiopaque iodinated polymeric nanoparticles for X-ray imaging applications. **Biomaterials**, v. 28, n. 30, p. 4461-8, Out 2007.

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

GINGRICH, J. R. Bladder cancer: chemohyperthermia for bladder cancer--clinically effective? **Nat Rev Urol**, v. 8, n. 8, p. 414-6, Ago 2011.

GLOBOCAN 2008. **The GLOBOCAN Project**. Disponível em: <<http://globocan.iarc.fr/>>. Acesso em: ago. 2013.

GONZALEZ GONZALEZ, D.; VAN DIJK, J. D.; BLANK, L. E.; RUMKE, P. Combined treatment with radiation and hyperthermia in metastatic malignant melanoma. **Radiother Oncol**, v. 6, n. 2, p. 105-13, Jun 1986.

GROMADZINSKA, J.; RESZKA, E.; BRUZELIUS, K.; WASOWICZ, W.; AKESSON, B. Selenium and cancer: biomarkers of selenium status and molecular action of selenium supplements. **Eur J Nutr**, v. 47 Suppl 2, p. 29-50, Maio 2008.

HALEY, B.; FRENKEL, E. Nanoparticles for drug delivery in cancer treatment. **Urol Oncol**, v. 26, n. 1, p. 57-64, Jan-Fev 2008.

HALLOUARD, F.; BRIANCON, S.; ANTON, N.; LI, X.; VANDAMME, T.; FESSI, H. Iodinated nano-emulsions as contrast agents for preclinical X-ray imaging: Impact of the free surfactants on the pharmacokinetics. **Eur J Pharm Biopharm**, v. 83, n. 1, p. 54-62, Jan 2013.

HANUS, M. J.; HARRIS, A. T. Nanotechnology innovations for the construction industry. **Progress in Materials Science**, v. 58, n. 7, p. 1056-1102, Ago 2013.

HERCBERG, S.; EZZEDINE, K.; GUINOT, C.; PREZIOSI, P.; GALAN, P.; BERTRAIS, S.; ESTAQUIO, C.; BRIANCON, S.; FAVIER, A.; LATREILLE, J.; MALVY, D. Antioxidant supplementation increases the risk of skin cancers in women but not in men. **J Nutr**, v. 137, n. 9, p. 2098-105, Set 2007.

HOFF, D.; SHEIKH, L.; BHATTACHARYA, S.; NAYAR, S.; WEBSTER, T. J. Comparison study of ferrofluid and powder iron oxide nanoparticle permeability across the blood-brain barrier. **Int J Nanomedicine**, v. 8, p. 703-10, 2013.

HOFMANN-AMTENBRINK, M.; HOFMANN, H.; MONTET, X. Superparamagnetic nanoparticles - a tool for early diagnostics. **Swiss Med Wkly**, v. 140, p. w13081, 2010.

HORSMAN, M. R.; OVERGAARD, J. Hyperthermia: a potent enhancer of radiotherapy. **Clin Oncol (R Coll Radiol)**, v. 19, n. 6, p. 418-26, Ago 2007.

HOU, C. H.; HOU, S. M.; HSUEH, Y. S.; LIN, J.; WU, H. C.; LIN, F. H. The in vivo performance of biomagnetic hydroxyapatite nanoparticles in cancer hyperthermia therapy. **Biomaterials**, v. 30, n. 23-24, p. 3956-60, Ago 2009.

HU, J.; JOHNSTON, K. P.; WILLIAMS, R. O., 3RD. Nanoparticle engineering processes for enhancing the dissolution rates of poorly water soluble drugs. **Drug Dev Ind Pharm**, v. 30, n. 3, p. 233-45, Mar 2004.

HU, R.; MA, S.; LI, H.; KE, X.; WANG, G.; WEI, D.; WANG, W. Effect of magnetic fluid hyperthermia on lung cancer nodules in a murine model. **Oncol Lett**, v. 2, n. 6, p. 1161-1164, Nov 2011.

HUANG, C.; LI, Y.; CAO, P.; XIE, Z.; QIN, Z. Synergistic effect of hyperthermia and neferine on reverse multidrug resistance in adriamycin-resistant SGC7901/ADM gastric cancer cells. **J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci**, v. 31, n. 4, p. 488-96, Ago 2011.

HUANG, H. C.; BARUA, S.; SHARMA, G.; DEY, S. K.; REGE, K. Inorganic nanoparticles for cancer imaging and therapy. **J Control Release**, v. 155, n. 3, p. 344-57, Nov 2011.

HULSHOF, M. C.; VAN HAAREN, P. M.; ZUM VORDE SIVE VORDING, P. J.; KRISHNADATH, S.; MARSMAN, W. A.; VAN BERGE HENEGOUWEN, M. I.; GEIJSEN, E. D.; CREZEE, J. Radiotherapy combined with hyperthermia for primary malignant melanomas of the esophagus. **Dis Esophagus**, v. 23, n. 8, p. E42-7, Nov 2010.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. **O que é o câncer?** Disponível em: <[http://www1.inca.gov.br/conteudo\\_view.asp?id=322](http://www1.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=322)>. Acesso em: out. 2013.

IOCCA, D. C. **Síntese, caracterização, estabilidade e efeitos biológicos in vitro de nanopartícula magnética associada a anfotericina B**. 2013. 109p. Dissertação (Mestrado em Biologia Animal) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Brasília, 2013.

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

ITO, A.; TANAKA, K.; HONDA, H.; ABE, S.; YAMAGUCHI, H.; KOBAYASHI, T. Complete regression of mouse mammary carcinoma with a size greater than 15 mm by frequent repeated hyperthermia using magnetite nanoparticles. **J Biosci Bioeng**, v. 96, n. 4, p. 364-9, 2003b.

ITO, A.; TANAKA, K.; KONDO, K.; SHINKAI, M.; HONDA, H.; MATSUMOTO, K.; SAIDA, T.; KOBAYASHI, T. Tumor regression by combined immunotherapy and hyperthermia using magnetic nanoparticles in an experimental subcutaneous murine melanoma. **Cancer Sci**, v. 94, n. 3, p. 308-13, Mar 2003a.

JAIN, K. K. Advances in the field of nanooncology. **BMC Med**, v. 8, p. 83, 2010.

JAIN, K. K. Nanotechnology in clinical laboratory diagnostics. **Clin Chim Acta**, v. 358, n. 1-2, p. 37-54, Ago 2005.

JARIWALLA, R. J.; GANGAPURKAR, B.; NAKAMURA, D. Differential sensitivity of various human tumour-derived cell types to apoptosis by organic derivatives of selenium. **Br J Nutr**, v. 101, n. 2, p. 182-9, Jan 2009.

JASTRZEBSKI, Z.; CZYZEWSKA-SZAFRAN, H.; FIJATEK, Z.; SUCHOCKI, P.; FITAK, B. A. Toxicity studies of a new selenium compound, Selol, in rats. **Drugs Exp Clin Res**, v. 21, n. 6, p. 217-20, 1995.

JENSEN, J. D.; WING, G. J.; DELLAVALLE, R. P. Nutrition and melanoma prevention. **Clin Dermatol**, v. 28, n. 6, p. 644-9, Nov-Dez 2010.

KALENDER, W. A. X-ray computed tomography. **Phys Med Biol**, v. 51, n. 13, p. R29-43, Jul 7 2006.

KANAPARTHY, R.; KANAPARTHY, A. The changing face of dentistry: nanotechnology. **Int J Nanomedicine**, v. 6, p. 2799-804, Dez 2011.

KANAVY, H. E.; GERSTENBLITH, M. R. Ultraviolet radiation and melanoma. **Semin Cutan Med Surg**, v. 30, n. 4, p. 222-8, Dez 2011.

KANG, M. K.; KIM, M. S.; KIM, J. H. Clinical outcomes of mild hyperthermia for locally advanced rectal cancer treated with preoperative radiochemotherapy. **Int J Hyperthermia**, v. 27, n. 5, p. 482-90, Jul 2011.

KASPER, B.; D'HONDT, V.; VEREECKEN, P.; AWADA, A. Novel treatment strategies for malignant melanoma: a new beginning? **Crit Rev Oncol Hematol**, v. 62, n. 1, p. 16-22, Abr 2007.

KHAN, B. A. N.; KHAN, M. K.; ALMASAN, A.; SINGH, A. D.; MACKLIS, R. The evolving role of radiation therapy in the management of malignant melanoma. **Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys.**, Vol. 80, No. 3, pp. 645-654, 2011.

KHANDHAR, A. P.; FERGUSON, R. M.; ARAMI, H.; KRISHNAN, K. M. Monodisperse magnetite nanoparticle tracers for in vivo magnetic particle imaging. **Biomaterials**, v. 34, n. 15, p. 3837-45, Maio 2013.

KHANDHAR, A. P.; FERGUSON, R. M.; KRISHNAN, K. M. Monodispersed magnetite nanoparticles optimized for magnetic fluid hyperthermia: Implications in biological systems. **J Appl Phys**, v. 109, n. 7, p. 7B310-7B3103, Abr 2011.

KHANDHAR, A. P.; FERGUSON, R. M.; SIMON, J. A.; KRISHNAN, K. M. Tailored magnetic nanoparticles for optimizing magnetic fluid hyperthermia. **J Biomed Mater Res A**, v. 100, n. 3, p. 728-37, Mar 2012a.

KHANDHAR, A. P.; FERGUSON, R. M.; SIMON, J. A.; KRISHNAN, K. M. Enhancing cancer therapeutics using size-optimized magnetic fluid hyperthermia. **J Appl Phys**, v. 111, n. 7, p. 7B306-7B3063, Abr 2012b.

KIKUMORI, T.; KOBAYASHI, T.; SAWAKI, M.; IMAI, T. Anti-cancer effect of hyperthermia on breast cancer by magnetite nanoparticle-loaded anti-HER2 immunoliposomes. **Breast Cancer Res Treat**, v. 113, n. 3, p. 435-41, Feb 2009.

KONG, D. F.; GOLDSCHMIDT-CLERMONT, P. J. Tiny solutions for giant cardiac problems. **Trends Cardiovasc Med**, v. 15, n. 6, p. 207-11, Ago 2005.

KONG, W. H.; LEE, W. J.; CUI, Z. Y.; BAE, K. H.; PARK, T. G.; KIM, J. H.; PARK, K.; SEO, S. W. Nanoparticulate carrier containing water-insoluble iodinated oil as a

multifunctional contrast agent for computed tomography imaging. **Biomaterials**, v. 28, n. 36, p. 5555-61, Dez 2007.

KROTO, H. W.; HEATH, J. R.; O'BRIEN, S. C.; CURL, R. F.; SMALLEY, R. E. C60: Buckminsterfullerene. **Nature**, v. 318, n. 6042, p. 162163, Nov 1985.

KSIAZEK, I.; SITARZ, K.; ROSLON, M.; ANUSZEWSKA, E.; SUCHOCKI, P.; WILCZYNSKA, J. D. The influence of Selol on the expression of oxidative stress genes in normal and malignant prostate cells. **Cancer Genomics Proteomics**, v. 10, n. 5, p. 225-32, Set-Out 2013.

KUDCHADKAR, R. R.; SMALLEY, K. S.; GLASS, L. F.; TRIMBLE, J. S.; SONDAK, V. K. Targeted therapy in melanoma. **Clin Dermatol**, v. 31, n. 2, p. 200-8, Mar-Abr 2013.

LACAVA, L. M.; GARCIA, V. A. P.; KUCKELHAUS, S.; AZEVEDO, R. B.; SADEGHIANI, N.; BUSKE, N.; MORAIS, P. C.; LACAVA, Z. G. M. Long-term retention of dextran-coated magnetite nanoparticles in the liver and spleen. **J Magn Magn Mater**, v. 272-276, p. 2434-2435, 2004.

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

LACAVA, L. M.; LACAVA, Z. G. M.; AZEVEDO, R. B.; CHAVES, S. B.; GARCIA, V. A. P.; SILVA, O.; PELEGRINI, F.; BUSKE, N.; GANSAU, C.; DA SILVA, M. F.; MORAIS, P. C. Use of magnetic resonance to study biodistribution of dextran-coated magnetic fluid intravenously administered in mice. **J Magn Magn Mater**, v. 252, p. 367-369, 2002.

LAMMERS, R. J.; WITJES, J. A.; INMAN, B. A.; LEIBOVITCH, I.; LAUFER, M.; NATIV, O.; COLOMBO, R. The role of a combined regimen with intravesical chemotherapy and hyperthermia in the management of non-muscle-invasive bladder cancer: a systematic review. **Eur Urol**, v. 60, n. 1, p. 81-93, Jul 2011.

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

LEE, K. B.; PARK, S. J.; MIRKIN, C. A.; SMITH, J. C.; MRKSICH, M. Protein nanoarrays generated by dip-pen nanolithography. **Science**, v. 295, n. 5560, p. 1702-5, Mar 2002.

LI, D.; KANER, R. B. Shape and aggregation control of nanoparticles: not shaken, not stirred. **J Am Chem Soc**, v. 128, n. 3, p. 968-75, Jan 2006.

MADANI, S. Y.; SHABANI, F.; DWEK, M. V.; SEIFALIAN, A. M. Conjugation of quantum dots on carbon nanotubes for medical diagnosis and treatment. **Int J Nanomedicine**, v. 8, p. 941-50, Mar 2013.

MAEDA, H.; NAKAMURA, H.; FANG, J. The EPR effect for macromolecular drug delivery to solid tumors: Improvement of tumor uptake, lowering of systemic toxicity, and distinct tumor imaging in vivo. **Adv Drug Deliv Rev**, v. 65, n. 1, p. 71-9, Jan 2013.

MAIER-HAUFF, K.; ROTHE, R.; SCHOLZ, R.; GNEVECKOW, U.; WUST, P.; THIESEN, B.; FEUSSNER, A.; VON DEIMLING, A.; WALDOEFNER, N.; FELIX, R.; JORDAN, A. Intracranial thermotherapy using magnetic nanoparticles combined with external beam radiotherapy: results of a feasibility study on patients with glioblastoma multiforme. **J Neurooncol**, v. 81, n. 1, p. 53-60, Jan 2007.

MAMANI, J. B.; COSTA-FILHO, A. J.; CORNEJO, D. R.; VIEIRA, E. D.; GAMARRA, L. F. Synthesis and characterization of magnetite nanoparticles coated with lauric acid. **Materials Characterization**, v. 81, p. 28-36, Jul 2013.

MARQUIS, B. J.; LOVE, S. A.; BRAUN, K. L.; HAYNES, C. L. Analytical methods to assess nanoparticle toxicity. **Analyst**, v. 134, n. 3, p. 425-39, Mar 2009.

MARTINEZ-BOUBETA, C.; BALCELLS, L.; CRISTOFOL, R.; SANFELIU, C.; RODRIGUEZ, E.; WEISSLEDER, R.; LOPE-PIEDRAFITA, S.; SIMEONIDIS, K.; ANGELAKERIS, M.; SANDIUMENGE, F.; CALLEJA, A.; CASAS, L.; MONTY, C.; MARTINEZ, B. Self-assembled multifunctional Fe/MgO nanospheres for magnetic resonance imaging and hyperthermia. **Nanomedicine**, v. 6, n. 2, p. 362-70, Abr 2010.

MATSUMINE, A.; TAKEGAMI, K.; ASANUMA, K.; MATSUBARA, T.; NAKAMURA, T.; UCHIDA, A.; SUDO, A. A novel hyperthermia treatment for bone metastases using magnetic materials. **Int J Clin Oncol**, v. 16, n. 2, p. 101-8, Abr 2011.

MCKINNEY, A. J.; HOLMEN, S. L. Animal models of melanoma: a somatic cell gene delivery mouse model allows rapid evaluation of genes implicated in human melanoma. **Chin J Cancer**, v. 30, n. 3, p. 153-62, Mar 2011.

MCMASTER PATHOPHYSIOLOGY REVIEW. **Melanoma**. Disponível em: <<http://www.pathophys.org/melanoma/>>. Acesso em: out. 2013.

MEDINTZ, I. L.; UYEDA, H. T.; GOLDMAN, E. R.; MATTOUSSI, H. Quantum dot bioconjugates for imaging, labelling and sensing. **Nat Mater**, v. 4, n. 6, p. 435-46, Jun 2005.

MENDES, G. L. Q. **Melanoma cutâneo invasivo: mortalidade no Brasil e sobrevida hospitalar em centro de referência oncológica no Rio de Janeiro**. 2010. 67f. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública e Meio Ambiente) – Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2010.

MILLER, A. J.; MIHM, M. C., JR. Melanoma. **N Engl J Med**, v. 355, n. 1, p. 51-65, Jul 6 2006.

MINISTÉRIO DA CIÊNCIA, TECNOLOGIA E INOVAÇÃO. **Nanotecnologia**. Histórico do Programa. Disponível em: <[http://www.mct.gov.br/index.php/content/view/27107/Historico\\_do\\_Programa.html](http://www.mct.gov.br/index.php/content/view/27107/Historico_do_Programa.html)>. Acesso em: ago. 2013.

MONGE-FUENTES, V. **Estudo da biodistribuição e biocompatibilidade de nanopartículas magnéticas à base de maguema recobertas com DMSA em macacos-prego (*Cebus spp.*) juvenis mediante análise morfológica.** 2009. 92p. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília, 2009.

MORA-HUERTAS, C. E.; FESSI, H.; ELAISSARI, A. Polymer-based nanocapsules for drug delivery. **Int J Pharm**, v. 385, n. 1-2, p. 113-42, Jan 2010.

MORENO-RAMIREZ, D.; DE LA CRUZ, L.; FERRANDIZ, L.; CAMACHO, F. M. Study and treatment of locally advanced melanoma. **Actas Dermosifiliogr**, v. 100, n. 9, p. 767-79, Nov 2009.

MORGANTI, P. Use and potential of nanotechnology in cosmetic dermatology. **Clin Cosmet Investig Dermatol**, v. 3, p. 5-13, Jan 2010.

NARAYANAN, S.; SATHY, B. N.; MONY, U.; KOYAKUTTY, M.; NAIR, S. V.; MENON, D. Biocompatible magnetite/gold nanohybrid contrast agents via green chemistry for MRI and CT bioimaging. **ACS Appl Mater Interfaces**, v. 4, n. 1, p. 251-60, Jan 2012.

NATIONAL NANOTECHNOLOGY INITIATIVE. **About the NNI.** Disponível em: <<http://www.nano.gov/about-nni>>. Acesso em: ago. 2013.

NETSCHER, D. T.; LEONG, M.; ORENGO, I.; YANG, D.; BERG, C.; KRISHNAN, B. Cutaneous malignancies: melanoma and nonmelanoma types. **Plast Reconstr Surg**, v. 127, n. 3, p. 37e-56e, Mar 2011.

NOBEL PRIZE. **Press Release: the 1996 Nobel Prize in Physics.** Disponível em <[http://www.nobelprize.org/nobel\\_prizes/physics/laureates/1986/press.html](http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/physics/laureates/1986/press.html)>. Acesso em: ago. 2013.

OMHOLT, K.; PLATZ, A.; KANTER, L.; RINGBORG, U.; HANSSON, J. NRAS and BRAF mutations arise early during melanoma pathogenesis and are preserved throughout tumor progression. **Clin Cancer Res**, v. 9, n. 17, p. 6483-8, Dez 2003.

OVERGAARD, J.; GONZALEZ GONZALEZ, D.; HULSHOF, M. C.; ARCANGELI, G.; DAHL, O.; MELLA, O.; BENTZEN, S. M. Randomised trial of hyperthermia as adjuvant to radiotherapy for recurrent or metastatic malignant melanoma. European Society for Hyperthermic Oncology. **Lancet**, v. 345, n. 8949, p. 540-3, Mar 4 1995.

POPOVTZER, R.; AGRAWAL, A.; KOTOV, N. A.; POPOVTZER, A.; BALTER, J.; CAREY, T. E.; KOPELMAN, R. Targeted gold nanoparticles enable molecular CT imaging of cancer. **Nano Lett**, v. 8, n. 12, p. 4593-6, Dez 2008.

PORTAL BRASIL. **Educação.** Investimento em nanotecnologia pode chegar à R\$ 110 milhões. Disponível em: <<http://www.brasil.gov.br/educacao/2012/11/investimento-em-nanotecnologia-pode-chegar-a-r-110-milhoes>>. Acesso em: nov. 2013.

PORTILHO-CORRÊA, F. A. **Avaliação da biocompatibilidade de fluido magnético à base de nanopartículas de maghemita recobertas por polifosfato em camundongos.** 2007. 74p. Dissertação (Mestrado em Patologia Molecular) – Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília, Brasília, 2007.

PORTILHO, F. A. **O uso de nanoesferas de albumina na terapia fotodinâmica e magnetohipertermia do tumor de Ehrlich.** 2011. 126p. Tese (Doutorado em Patologia Molecular) – Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília, Brasília, 2011.

PRADHAN, P.; GIRI, J.; BANERJEE, R.; BELLARE, J.; BAHADUR, D. Cellular interactions of lauric acid and dextran-coated magnetite nanoparticles. **J Magn Magn Mater**, n. 311, p.282-287, 2007b.

PRADHAN, P.; GIRI, J.; SAMANTA, G.; SARMA, H. D.; MISHRA, K. P.; BELLARE, J.; BANERJEE, R.; BAHADUR, D. Comparative evaluation of heating ability and biocompatibility of different ferrite-based magnetic fluids for hyperthermia application. **J Biomed Mater Res B Appl Biomater**, v. 81, n. 1, p. 12-22, Abr 2007a.

QI, J.; CHEN, N.; WANG, J.; SIU, C. H. Transendothelial migration of melanoma cells involves N-cadherin-mediated adhesion and activation of the beta-catenin signaling pathway. **Mol Biol Cell**, v. 16, n. 9, p. 4386-97, Set 2005.

QU, X.; ALVAREZ, P. J.; LI, Q. Photochemical Transformation of Carboxylated Multiwalled Carbon Nanotubes: Role of Reactive Oxygen Species. **Environ Sci Technol**, Nov 2013.

QU, X.; BRAME, J.; LI, Q.; ALVAREZ, P. J. Nanotechnology for a safe and sustainable water supply: enabling integrated water treatment and reuse. **Acc Chem Res**, v. 46, n. 3, p. 834-43, Mar 2013.

RABIN, O.; MANUEL PEREZ, J.; GRIMM, J.; WOJTKIEWICZ, G.; WEISSLEDER, R. An X-ray computed tomography imaging agent based on long-circulating bismuth sulphide nanoparticles. **Nat Mater**, v. 5, n. 2, p. 118-22, Fev 2006.

RACHAKATLA, R. S.; BALIVADA, S.; SEO, G. M.; MYERS, C. B.; WANG, H.; SAMARAKOON, T. N.; DANI, R.; PYLE, M.; KROH, F. O.; WALKER, B.; LEAYM, X.; KOPER, O. B.; CHIKAN, V.; BOSSMANN, S. H.; TAMURA, M.; TROYER, D. L. Attenuation of mouse melanoma by A/C magnetic field after delivery of bi-magnetic nanoparticles by neural progenitor cells. **ACS Nano**, v. 4, n. 12, p. 7093-104, Dez 2010.

RAHDEN-STARON, I.; SUCHOCKI, P.; CZECZOT, H. Evaluation of mutagenic activity of the organo-selenium compound Selol by use of the Salmonella typhimurium mutagenicity assay. **Mutat Res**, v. 699, n. 1-2, p. 44-6, Jun 2010.

RAI, M.; INGLE, A. Role of nanotechnology in agriculture with special reference to management of insect pests. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 94, n. 2, p. 287-93, Abr 2012.

RAMOS-CABRER, P.; CAMPOS, F. Liposomes and nanotechnology in drug development: focus on neurological targets. **Int J Nanomedicine**, v. 8, p. 951-60, Mar 2013.

REN, Y.; ZHANG, H.; CHEN, B.; CHENG, J.; CAI, X.; LIU, R.; XIA, G.; WU, W.; WANG, S.; DING, J.; GAO, C.; WANG, J.; BAO, W.; WANG, L.; TIAN, L.; SONG, H.; WANG, X. Multifunctional magnetic Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles combined with chemotherapy and hyperthermia to overcome multidrug resistance. **Int J Nanomedicine**, v. 7, p. 2261-9, 2012.

ROOHI, F.; LOHRKE, J.; IDE, A.; SCHUTZ, G.; DASSLER, K. Studying the effect of particle size and coating type on the blood kinetics of superparamagnetic iron oxide nanoparticles. **Int J Nanomedicine**, v. 7, p. 4447-58, 2012.

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

RUSSAK, J. E.; RIGEL, D. S. Risk factors for the development of primary cutaneous melanoma. **Dermatol Clin**, v. 30, n. 3, p. 363-8, Jul 2012.

SADEGHIANI, N. **Avaliação *in vivo* da biocompatibilidade/toxicidade e biodistribuição de fluido magnético à base de nanopartículas de magnetita recobertas com ácido poliaspártico**. 2004. 90p. Dissertação (Mestrado em Patologia Molecular) – Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília, Brasília, 2004.

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

SALDANHA, C.A. **Avaliação da atividade antifúngica da anfotericina B conjugada com fluido magnético bicamada de ácido láurico no tratamento da Paracoccidioidomicose**. Tese (Doutorado em Biologia Animal) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Brasília, 2012.

SAMARASINGHE, V.; MADAN, V. Nonmelanoma skin cancer. **J Cutan Aesthet Surg**, v. 5, n. 1, p. 3-10, Jan 2012.

SAMEI, E.; SAUNDERS, R. S.; BADEA, C. T.; GHAGHADA, K. B.; HEDLUND, L. W.; QI, Y.; YUAN, H.; BENTLEY, R. C.; MUKUNDAN, S., JR. Micro-CT imaging of breast tumors in rodents using a liposomal, nanoparticle contrast agent. **Int J Nanomedicine**, v. 4, p. 277-82, 2009.

SANTHOSH, P. B.; ULRIH, N. P. Multifunctional superparamagnetic iron oxide nanoparticles: promising tools in cancer theranostics. **Cancer Lett**, v. 336, n. 1, p. 8-17, Ago 2013.

SCHLACHTER, E. K.; WIDMER, H. R.; BREGY, A.; LONNFORS-WEITZEL, T.; VAJTAI, I.; CORAZZA, N.; BERNAU, V. J.; WEITZEL, T.; MORDASINI, P.; SLOTBOOM, J.; HERRMANN, G.; BOGNI, S.; HOFMANN, H.; FRENZ, M.; REINERT, M. Metabolic pathway and distribution of superparamagnetic iron oxide nanoparticles: in vivo study. **Int J Nanomedicine**, v. 6, p. 1793-800, 2011.

SÉRGIO FRANCO Medicina Diagnóstica. **Hemograma**. Disponível em: <<http://www.sergiofranco.com.br/bioinforme/index.asp?cs=Hematologia&ps=hemogram>>. Acesso em: dez. 2013.

SHAHZADI, S.; ALI, S.; BEGUM, S. Lauric acid as biological active ligand for complexation with d-block metals. **Russian Journal of Coordination Chemistry**, v. 33, n. 4, p. 290-295, Abr 2007.

SHAW, D. J. **Introdução à Química dos Colóides e Superfícies**. São Paulo: Edgard Blücher, Ed. Universidade de São Paulo, 1975, p. 1-6, 128.

SHTUTMAN, M.; ZHURINSKY, J.; SIMCHA, I.; ALBANESE, C.; D'AMICO, M.; PESTELL, R.; BEM-ZE'EV, A. The cyclin D1 gene is a target of the beta-catenin/LEF-1 pathway. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 96, n. 10, p. 5522-7, Maio 11 1999.

SILVA, A. C.; OLIVEIRA, T. R.; MAMANI, J. B.; MALHEIROS, S. M.; MALAVOLTA, L.; PAVON, L. F.; SIBOV, T. T.; AMARO, E., JR.; TANNUS, A.; VIDOTO, E. L.; MARTINS, M. J.; SANTOS, R. S.; GAMARRA, L. F. Application of hyperthermia induced by superparamagnetic iron oxide nanoparticles in glioma treatment. **Int J Nanomedicine**, v. 6, p. 591-603, 2011.

SOENEN, S. J.; DE CUYPER, M. Assessing cytotoxicity of (iron oxide-based) nanoparticles: an overview of different methods exemplified with cationic magnetoliposomes. **Contrast Media Mol Imaging**, v. 4, n. 5, p. 207-19, Set-Out 2009.

SONG, H.; HUR, I.; PARK, H. J.; NAM, J.; PARK, G. B.; KONG, K. H.; HWANG, Y. M.; KIM, Y. S.; CHO, D. H.; LEE, W. J.; HUR, D. Y. Selenium Inhibits Metastasis of Murine Melanoma Cells through the Induction of Cell Cycle Arrest and Cell Death. **Immune Netw**, v. 9, n. 6, p. 236-42, Dez 2009.

STAGGERS, N.; MCCASKY, T.; BRAZELTON, N.; KENNEDY, R. Nanotechnology: the coming revolution and its implications for consumers, clinicians, and informatics. **Nurs Outlook**, v. 56, n. 5, p. 268-74, Set-Out 2008.

SUCHOCKI, P.; JAKONIUK, D.; FITAK, B. A. Specific spectrophotometric method with trifluoroacetic acid for the determination of selenium(IV) in selenitetriglycerides. **J Pharm Biomed Anal**, v. 32, n. 4-5, p. 1029-36, Ago 2003.

SUCHOCKI, P.; MISIEWICZ, I.; SKUPINSKA, K.; WACLAWEK, K.; FIJALEK, Z.; KASPRZYCKA-GUTTMAN, T. The activity of Selol in multidrug-resistant and sensitive human leukemia cells. **Oncol Rep**, v. 18, n. 4, p. 893-9, Out 2007.

SUZUKI, M.; SHINKAI, M.; HONDA, H.; KOBAYASHI, T. Anticancer effect and immune induction by hyperthermia of malignant melanoma using magnetite cationic liposomes. **Melanoma Res**, v. 13, n. 2, p. 129-35, Abr 2003.

TAN, L. L.; CHAI, S. P.; MOHAMED, A. R. Synthesis and Applications of Graphene-Based TiO<sub>2</sub> Photocatalysts. **ChemSusChem**, v. 5, p. 1868-1882, 2012.

TANIGUCHI, N. **On the Basic Concept of 'Nano-Technology'**. Proceedings of the International Conference on Production Engineering, Tokyo, 1974, Part II (Japan Society of Precision Engineering).

TESTORI, A.; RUTKOWSKI, P.; MARSDEN, J.; BASTHOLT, L.; CHIARION-SILENI, V.; HAUSCHILD, A.; EGGERMONT, A. M. Surgery and radiotherapy in the treatment of cutaneous melanoma. **Ann Oncol**, v. 20 Suppl 6, p. vi22-9, Ago 2009.

THOMPSON, J. F.; SCOLYER, R. A.; KEFFORD, R. F. Cutaneous melanoma. **Lancet**, v. 365, n. 9460, p. 687-701, Fev 2005.

TIAN, M.; LU, W.; ZHANG, R.; XIONG, C.; ENSOR, J.; NAZARIO, J.; JACKSON, J.; SHAW, C.; DIXON, K. A.; MILLER, J.; WRIGHT, K.; LI, C.; GUPTA, S. Tumor uptake of hollow gold nanospheres after intravenous and intra-arterial injection: PET/CT study in a rabbit VX2 liver cancer model. **Mol Imaging Biol**, v. 15, n. 5, p. 614-24, Out 2013.

TIETZE, R.; LYER, S.; DURR, S.; STRUFFERT, T.; ENGELHORN, T.; SCHWARZ, M.; ECKERT, E.; GOEN, T.; VASYLYEV, S.; PEUKERT, W.; WIEKHORST, F.; TRAHMS, L.; DORFLER, A.; ALEXIOU, C. Efficient drug-delivery using magnetic nanoparticles--biodistribution and therapeutic effects in tumour bearing rabbits. **Nanomedicine**, v. 9, n. 7, p. 961-71, Out 2013.

TIETZE, R.; RAHN, H.; LYER, S.; SCHREIBER, E.; MANN, J.; ODENBACH, S.; ALEXIOU, C. Visualization of superparamagnetic nanoparticles in vascular tissue using XmuCT and histology. **Histochem Cell Biol**, v. 135, n. 2, p. 153-8, Fev 2011.

TORRENTE, Y.; GAVINA, M.; BELICCHI, M.; FIORI, F.; KOMLEV, V.; BRESOLIN, N.; RUSTICHELLI, F. High-resolution X-ray microtomography for three-dimensional visualization of human stem cell muscle homing. **FEBS Lett**, v. 580, n. 24, p. 5759-64, Out 2006.

TORTORA, G. J.; DERRICKSON, B. **Principles of anatomy & physiology**. 13th. Hoboken, NJ: Wiley, 2012.

UNDERSTANDING NANO. **Sporting Goods with Nanotechnology**. Disponível em: <[http://www.understandingnano.com/sporting\\_goods.html](http://www.understandingnano.com/sporting_goods.html)>. Acesso em: ago. 2013.

VAN DER ZEE, J. Heating the patient: a promising approach? **Ann Oncol**, v. 13, n. 8, p. 1173-84, Ago 2002.

VILLANUEVA, A.; CANETE, M.; ROCA, A. G.; CALERO, M.; VEINTEMILLAS-VERDAGUER, S.; SERNA, C. J.; MORALES MDEL, P.; MIRANDA, R. The influence of surface functionalization on the enhanced internalization of magnetic nanoparticles in cancer cells. **Nanotechnology**, v. 20, n. 11, p. 115103, Mar 2009.

WANG, H.; ZHENG, L.; PENG, C.; GUO, R.; SHEN, M.; SHI, X.; ZHANG, G. Computed tomography imaging of cancer cells using acetylated dendrimer-entrapped gold nanoparticles. **Biomaterials**, v. 32, n. 11, p. 2979-88, Abr 2011.

WANG, Z. Y.; SONG, J.; ZHANG, D. S. Nanosized As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>/Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> complexes combined with magnetic fluid hyperthermia selectively target liver cancer cells. **World J Gastroenterol**, v. 15, n. 24, p. 2995-3002, Jun 2009.

WANG, Z.; CHUI, W. K.; HO, P. C. Nanoparticulate delivery system targeted to tumor neovasculature for combined anticancer and antiangiogenesis therapy. **Pharm Res**, v. 28, n. 3, p. 585-96, Mar 2011.

WHANGER, P. D. Selenium and its relationship to cancer: an update. **Br J Nutr**, v. 91, n. 1, p. 11-28, Jan 2004.

WIDLUND, H. R.; HORSTMANN, M. A.; PRICE, E. R.; CUI, J.; LESSNICK, S. L.; WU, M.; HE, X.; FISHER, D. E. Beta-catenin-induced melanoma growth requires the downstream target Microphthalmia-associated transcription factor. **J Cell Biol**, v. 158, n. 6, p. 1079-87, Set 16 2002.

WILCZEWSKA, A. Z.; NIEMIROWICZ, K.; MARKIEWICZ, K. H.; CAR, H. Nanoparticles as drug delivery systems. **Pharmacol Rep**, v. 64, n. 5, p. 1020-37, 2012.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Health topics**. Cancer. Disponível em: <<http://www.who.int/topics/cancer/en/index.html>>. Acesso em: out. 2013.

XIAO, Q.; BU, W.; REN, Q.; ZHANG, S.; XING, H.; CHEN, F.; LI, M.; ZHENG, X.; HUA, Y.; ZHOU, L.; PENG, W.; QU, H.; WANG, Z.; ZHAO, K.; SHI, J. Radiopaque fluorescence-transparent TaOx decorated upconversion nanophosphors for in vivo CT/MR/UCL trimodal imaging. **Biomaterials**, v. 33, n. 30, p. 7530-9, Out 2012.

XIE, H.; WANG, Z. J.; BAO, A.; GOINS, B.; PHILLIPS, W. T. In vivo PET imaging and biodistribution of radiolabeled gold nanoshells in rats with tumor xenografts. **Int J Pharm**, v. 395, n. 1-2, p. 324-30, Ago 2010.

XU, C.; SUN, S. Superparamagnetic nanoparticles as targeted probes for diagnostic and therapeutic applications. **Dalton Trans**, n. 29, p. 5583-91, Ago 2009.

YANASE, M.; SHINKAI, M.; HONDA, H.; WAKABAYASHI, T.; YOSHIDA, J.; KOBAYASHI, T. Intracellular hyperthermia for cancer using magnetite cationic liposomes: an in vivo study. **Jpn J Cancer Res**, v. 89, n. 4, p. 463-9, Apr 1998a.

YANASE, M.; SHINKAI, M.; HONDA, H.; WAKABAYASHI, T.; YOSHIDA, J.; KOBAYASHI, T. Antitumor immunity induction by intracellular hyperthermia using magnetite cationic liposomes. **Jpn J Cancer Res**, v. 89, n. 7, p. 775-82, Jul 1998b.

YANG, D.; VAN, S.; SHU, Y.; LIU, X.; GE, Y.; JIANG, X.; JIN, Y.; YU, L. Synthesis, characterization, and in vivo efficacy evaluation of PGG-docetaxel conjugate for potential cancer chemotherapy. **Int J Nanomedicine**, v. 7, p. 581-9, 2012.

YANG, L.; MAO, H.; CAO, Z.; WANG, Y. A.; PENG, X.; WANG, X.; SAJJA, H. K.; WANG, L.; DUAN, H.; NI, C.; STALEY, C. A.; WOOD, W. C.; GAO, X.; NIE, S. Molecular imaging of pancreatic cancer in an animal model using targeted

multifunctional nanoparticles. **Gastroenterology**, v. 136, n. 5, p. 1514-25 e2, Maio 2009.

YU, K. F.; ZHANG, W. Q.; LUO, L. M.; SONG, P.; LI, D.; DU, R.; REN, W.; HUANG, D.; LU, W. L.; ZHANG, X.; ZHANG, Q. The antitumor activity of a doxorubicin loaded, iRGD-modified sterically-stabilized liposome on B16-F10 melanoma cells: in vitro and in vivo evaluation. **Int J Nanomedicine**, v. 8, p. 2473-85, 2013.

YEN, S. K.; JANCZEWSKI, D.; LAKSHMI, J. L.; DOLMANAN, S. B.; TRIPATHY, S.; HO, V. H.; VIJAYARAGAVAN, V.; HARIHARAN, A.; PADMANABHAN, P.; BHAKOO, K. K.; SUDHAHARAN, T.; AHMED, S.; ZHANG, Y.; TAMIL SELVAN, S. Design and synthesis of polymer-functionalized NIR fluorescent dyes--magnetic nanoparticles for bioimaging. **ACS Nano**, v. 7, n. 8, p. 6796-805, Ago 2013.

ZHAO, Q.; WANG, L.; CHENG, R.; MAO, L.; ARNOLD, R. D.; HOWERTH, E. W.; CHEN, Z. G.; PLATT, S. Magnetic nanoparticle-based hyperthermia for head & neck cancer in mouse models. **Theranostics**, v. 2, p. 113-21, 2012.

**ANEXO – Aprovação do projeto pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)  
da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília**



**Faculdade de Medicina  
Universidade de Brasília  
Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/FM**

Brasília, 05 de dezembro de 2012

## **DECLARAÇÃO**

Declaramos que o projeto intitulado “Potencial aplicação de nanoestruturas magnéticas contendo selol no tratamento do câncer de pele e como contraste em exames de microtomografia computadorizada”, UnBDoc 140199/2012, sob responsabilidade da Zulmira Guerrero Marques Lacava, foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-FM) da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília.



Prof. Dr. Carlos Eduardo Gaio V. dos Santos  
Coordenador do CEUA-FM