



Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Nanociência e Nanobiotecnologia

**MODULAÇÃO DA EXPRESSÃO DE FIBRONECTINA E
LAMININA POR NANOPARTÍCULAS DE MAGHEMITA
ASSOCIADAS AO CITRATO DE RÓDIO II EM
CARCINOMA MAMÁRIO**

MÁRCIA CRISTINA OLIVEIRA DA ROCHA

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Sônia Nair Bão

**Brasília
2014**

MÁRCIA CRISTINA OLIVEIRA DA ROCHA

MODULAÇÃO DA EXPRESSÃO DE FIBRONECTINA E LAMININA POR
NANOPARTÍCULAS DE MAGHEMITA ASSOCIADAS AO CITRATO DE RÓDIO
II EM CARCINOMA MAMÁRIO

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-graduação em Nanociência
e Nanobiotecnologia, da Universidade de
Brasília, como parte integrante dos requisitos
para obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof^ª. Dra. Sônia Nair Bão

BRASÍLIA
2014



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

Dissertação de Mestrado

Márcia Cristina Oliveira da Rocha

Título:

“Modulação da expressão de fibronectina e laminina por nanopartículas de maghemita associadas ao citrato do ródio II em carcinoma mamário.”

Comissão Examinadora:

Prof. Dra. Sônia Nair Bão
Presidente / Orientador
UnB / Nano

Prof. Dra. Kelly Grace Magalhães
Membro Titular Interno não Vinculado ao Programa
UnB / CEL

Prof. Dra. Graziella Anselmo Joanitti
Membro Titular Interno Vinculado ao Programa
UnB / Nano

Prof. Dra. Maria de Fátima Menezes de Almeida Santos
Membro Suplente
Interno Vinculado ao Programa
UnB / Nano

Brasília, 29 de agosto de 2014.

A minha mãe Patrícia e avó Alda, pelo estímulo e apoio incondicionais, pela paciência e amor com que me conduzem.

AGRADECIMENTOS

Inicialmente, gostaria de agradecer a Deus, por sempre me guiar.

Agradeço à minha família, pelo apoio incondicional que sempre me deram. À minha mãe, por ser um exemplo, sempre me incentivando e me corrigindo quando preciso, e tudo isso contribuiu para definir quem sou hoje.

À professora Sônia Nair Bão, que para mim é um exemplo de profissional e colaborou com o meu crescimento pessoal e profissional. Agradeço pela orientação, oportunidade e incentivo.

Às Doutoradas Kelly Grace, Graziella Joanitti e Maria de Fátima, por terem aceitado o convite de participar da banca, obrigada pelas contribuições feitas para esta dissertação.

Ao Prof. Dr. Aparecido de Souza e ao Matheus Oliveira da Silva, pela síntese dos compostos utilizados neste trabalho.

À Profa. Marcella Carneiro, pelos ensinamentos e ajuda na elaboração e execução deste projeto.

Aos professores Dr. Ricardo Bentes, Dra. Carla Araújo, Dr. Pujol, Dr. Bergman, Dr. Tatsuya pelo uso de alguns equipamentos de seus laboratórios.

Ao Dr. Cláudio Lopes, pela ajuda, incentivo, ensinamentos e dedicação para a realização desse trabalho.

Às minhas amigas da graduação Carol Franco e Mariana Egas que sempre estiveram comigo.

À minha amiga Rachel Arcanjo, pela amizade e por sempre se dispor em me ajudar e mesmo longe tem feito muito por mim.

À Bruna Guido, pelos ensinamentos, amizade, por sempre ser tão prestativa e me ajudar sempre que preciso.

À Karine e Yasmin pelo apoio, ajuda e amizade.

Aos amigos que fiz na universidade e que alegraram meus dias e me incentivaram desde o início, Mosar, Danilo, Mayara, Luciana, Dani, Juliana, Raphael, Diego e Fred.

Aos meus amigos Alex, Andressa, Yuri e Lucas.

À Rachel Arcanjo, Ingrid Gracielle e Mariana, muito obrigada por me ajudarem nos experimentos, no desenvolvimento do trabalho e na criação dos animais. Obrigada pela amizade e por sempre poder contar com vocês.

À Fabiana, Marco e a Profa. Izabel pela ajuda nos experimentos de RTqPCR, muito obrigada.

Ao laboratório de Microscopia Eletrônica, Ingrid, Prof^o. José Raimundo, Mariana, Rachel, Bruna, Natália Lemos, Cláudio, Ludmilla, Nathalia Vasconcelos, Yasmin, Núbia, Edna, Shaiane, Karine, Mayara, João, Thatiane, Misléia, José Henrique, Elias, Lorena, Daniela, Mariane, Rafaela e Zé, por fazerem do laboratório um ótimo ambiente de trabalho, pela convivência amigável e pelos ensinamentos.

Ao laboratório de Enzimologia e Virologia, especialmente ao Helder, Brenda, Francilene, Paula, Lorena, Leonardo, Fabrício e Deborah pela ajuda nos experimentos e uso de equipamentos.

À Universidade de Brasília e ao Programa de Pós-graduação em Nanociência e Nanobiotecnologia, pela oportunidade.

Ao Sabin Laboratório Clínico, pelas análises.

À CAPES, pela concessão da bolsa, e demais agências de fomento, CNPq, FINATEC, FINEP e FAP-DF.

Resumo

O câncer de mama é o principal fator de morte nos países desenvolvidos e está em segundo lugar nos países em desenvolvimento, sendo o mais comum entre as mulheres. Com o aumento da incidência do câncer de mama e suas limitações terapêuticas, faz-se necessário uma busca por alternativas. Assim, a nanobiotecnologia está a progredir rapidamente, de modo a contribuir na resolução das limitações observadas na terapia convencional. O citrato de ródio II [$\text{Rh}_2(\text{H}_2\text{cit})_4$], um composto metálico, descrito como um análogo a cisplatina pertencente à família dos carboxilatos de ródio, apresentou atividade antitumoral em carcinoma ascítico de Ehrlich, entretanto possui sua atividade limitada devido à sua toxicidade. Portanto, a associação do citrato de ródio (II) a nanopartículas magnéticas [$\text{Magh-Rh}_2(\text{H}_2\text{cit})_4$], representa uma estratégia terapêutica que pode reduzir a toxicidade do citrato de ródio e, assim, melhorar sua ação terapêutica. Um dos fatores relacionados à progressão desta doença relaciona-se ao processo de degradação da matriz extracelular. Células tumorais tem a habilidade de obter as condições necessárias para crescer e sobreviver, promovendo processos de degradação de proteínas da matriz extracelular, como a laminina e fibronectina. O objetivo deste trabalho foi verificar se os tratamentos com $\text{Rh}_2(\text{H}_2\text{cit})_4$, Magh-Cit e $\text{Magh-Rh}_2(\text{H}_2\text{cit})_4$ possuem alguma influência na modulação da expressão das proteínas laminina e fibronectina. Foram injetadas células da linhagem de carcinoma mamário 4T1 para o estabelecimento do tumor na mama de camundongos BALB/c fêmeas. Após 14 dias, os animais foram tratados com $\text{Rh}_2(\text{H}_2\text{cit})_4$ livre (8 mg/kg), $\text{Magh-Rh}_2(\text{H}_2\text{cit})_4$ (8 mg/kg de citrato de ródio e 216 mg/kg de ferro) e nanopartículas de maghemita (Magh-Cit) (216 mg/kg de ferro), por administração intratumoral. Os tratamentos foram realizados a cada dois dias, totalizando cinco aplicações. Os pesos dos animais não foram alterados com os tratamentos. Nos parâmetros bioquímicos houve uma redução significativa de transaminase pirúvica nos animais controle com tumor e tratados com $\text{Magh-Rh}_2(\text{H}_2\text{cit})_4$. Nos parâmetros hematológicos foi observada uma redução do volume plaquetário médio nos animais tratados com Magh-Cit e $\text{Magh-Rh}_2(\text{H}_2\text{cit})_4$ e um aumento significativo na contagem de leucócitos nos tratamentos com Magh-Cit e $\text{Rh}_2(\text{H}_2\text{cit})_4$. Não foram observadas diferenças significativas no volume e peso do tumor. Quanto à genotoxicidade, foi observado um aumento significativo da fragmentação do

DNA e um aumento na proporção de células que se encontravam na fase G1 dos animais com tumor que não receberam tratamento. A expressão das proteínas laminina e fibronectina, foi analisada por imunohistoquímica e não foram observadas diferenças significativas entre os grupos. Os genes codificantes de laminina e fibronectina analisados por RTq-PCR, não apresentaram amplificação, possivelmente por ter uma baixa quantidade de transcritos, portanto, não sendo possível sua detecção. Os tratamentos não produziram uma redução significativa no tumor. Acredita-se que com o ajuste adequado da dose, essas composições podem apresentar um potencial terapêutico para o câncer de mama.

Palavras-chave: Câncer de mama; citrato de ródio (II); nanopartículas de maghemita; nanotecnologia; BALB/c; fibronectina; laminina; imunohistoquímica.

Summary

Breast cancer is the leading factor of death in developed countries and is on the second place in developing countries, and the most common among women. To the increased incidence of breast cancer and its therapeutic limitations it is necessary a search for alternatives. Thus, nanobiotechnology is progressing rapidly in order to solve these limitations of conventional therapy. The rhodium (II) citrate $[\text{Rh}_2(\text{H}_2\text{cit})_4]$, a metal compound, described as a cisplatin analogue belonging to the family of the carboxylates of rhodium showed antitumor activity in Ehrlich ascites breast carcinoma, however, it has limited activity due to its toxicity. Therefore, the association of rhodium (II) citrate with magnetic nanoparticles $[\text{Magh-Rh}_2(\text{H}_2\text{cit})_4]$ could represent a therapeutic strategy that can reduce the toxicity of rhodium citrate and improve a therapeutic action. One of the factors related to the progression of this disease is the process of extracellular matrix degradation. Tumor cells have the ability to obtain the necessary conditions for growth and survival, promoting the degradation processes of extracellular matrix proteins, such as laminin and fibronectin. The objective of this study was to determine if the treatments with, $\text{Rh}_2(\text{H}_2\text{cit})_4$, Magh-Cit and $\text{Magh-Rh}_2(\text{H}_2\text{cit})_4$ have some influence in modulating the expression of laminin and fibronectin proteins. 4T1 mammary carcinoma cells were used for establishing the tumor breast in BALB/c mice. After 14 days, animals were treated with free rhodium (II) citrate, rhodium (II) citrate loaded maghemite nanoparticles and maghemite nanoparticles by intratumoral administration. Treatments were carried out every two days, a total of five applications. The animal weights were not changed with the treatments. Biochemical parameters had a significant reduction of pyruvic transaminase in control animals with tumor and treated with $\text{Magh-Rh}_2(\text{H}_2\text{cit})_4$. Hematological parameters has a reduction in mean platelet volume in animals treated with Magh-Cit and $\text{Magh-Rh}_2(\text{H}_2\text{cit})_4$ and a significant increase in leukocytes count in the treatments with Magh-Cit and $\text{Rh}_2(\text{H}_2\text{cit})_4$ was observed. No significant differences in the volume and weight of tumors were observed. About genotoxicity, there were a significant increase in DNA fragmentation and an increase in the proportion of cells that were in the G1 phase of the non-treated animals. The expression of laminin and fibronectin proteins was analyzed by immunohistochemistry and no significant differences were observed between groups. The laminin and fibronectin genes, analyzed by RTq-PCR, showed no amplification, possibly by having

low amount of these transcripts, so it was not possible to detect. The treatment did not produce a significant reduction in the tumor. It is believed that with appropriate dose adjustment, these compositions may have a therapeutic potential for breast cancer.

Keywords: Breast cancer; rhodium (II) citrate; maghemite nanoparticles; nanobiotechnology; BALB/c; fibronectin; laminin; immunohistochemistry.

Índice de Figuras

Figura 1 - Estimativa de novos casos de câncer no mundo em homens e mulheres em 2014.....	1
Figura 2 – Anatomia da mama.....	3
Figura 3 - Características comuns no câncer.....	4
Figura 4 - Fases do ciclo celular.....	5
Figura 5 – Estrutura molecular do citrato de ródio (II).....	8
Figura 6 – Representação esquemática do tratamento passivo em tecido tumoral associado ao efeito de permeabilidade e retenção aumentada.....	10
Figura 7 - Esquema da associação química de uma nanopartícula de maghemita com uma molécula de citrato de ródio (II).....	11
Figura 8 - Cascata metastática.....	13
Figura 9 – Invasão celular.....	15
Figura 10 – Fluxograma com os elementos que compõem a matriz extracelular.....	16
Figura 11 - Componentes da Matriz extracelular e alguns de seus mecanismos de regulação de processos celulares e transdução de sinais	17
Figura 12- Domínios estruturais da Laminina.....	19
Figura 13 - Estrutura da molécula dímera de fibronectina e seus domínios.....	22
Figura 14 - Desenho esquemático da metodologia utilizada.....	27
Figura 15 - Aglomerado de nanopartículas de Magh-Rh ₂ (H ₂ cit) ₄ visualizadas por microscopia eletrônica de transmissão (MET) apresentando morfologia esférica.....	30
Figura 16 - Dados do diâmetro hidrodinâmico das partículas Magh-Rh ₂ (H ₂ cit) ₄	30
Figura 17 – Dados do potencial zeta das nanopartículas de Magh-Rh ₂ (H ₂ cit) ₄	31
Figura 18 - Imagem ilustrativa do perfil eletroforético em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídio (0,5 µg/mL) do RNA total extraído do tecido tumoral e da mama normal.....	36
Figura 19 - Amplificação dos <i>primers</i> dos genes <i>Laminina</i> e <i>Fibronectina</i>	38
Figura 20 – Representação do método de decomposição de cores.....	42
Figura 21 - Peso corpóreo dos camundongos ao longo do experimento.....	45
Figura 22 - Efeito dos tratamentos sobre o volume do tumor.....	46
Figura 23 - Fotografia dos tumores de carcinoma mamários dos diferentes grupos experimentais.....	47
Figura 24 - Efeito dos tratamentos sobre o peso do tumor.....	48

Figura 25 - Valores bioquímicos da creatinina dosada no soro de camundongos portadores de carcinoma mamário tratados com Rh ₂ (H ₂ cit) ₄ , Magh-Cit e Magh-Rh ₂ (H ₂ cit) ₄	52
Figura 26 - Valores bioquímicos de transaminase pirúvica dosada no soro de camundongos portadores de carcinoma mamário tratados com Rh ₂ (H ₂ cit) ₄ , Magh-Cit e Magh-Rh ₂ (H ₂ cit) ₄	53
Figura 27 - Fotomicrografia de tecido mamário de camundongos fêmeas BALB/c.....	54
Figura 28 - Fotomicrografias comparativas da histologia de carcinoma mamário de camundongos fêmeas BALB/c.....	56
Figura 29 - Fotomicrografia da histologia de carcinoma mamário de camundongos fêmeas BALB/c tratados com MaghRh ₂ (H ₂ cit) ₄	57
Figura 30 - Fotomicrografias da histologia de carcinoma mamário de camundongos fêmeas BALB/c tratados com Rh ₂ (H ₂ cit) ₄ (II) livre.....	58
Figura 31 - Fotomicrografias da histologia de carcinoma mamário de camundongos fêmeas BALB/c tratados com Magh-Cit.....	59
Figura 32 - Fotomicrografias da histologia de carcinoma mamário de camundongos fêmeas BALB/c controle com tumor (salina).....	60
Figura 33 - Efeito dos tratamentos com Rh ₂ (H ₂ cit) ₄ , Magh-Rh ₂ (H ₂ cit) ₄ e Magh-Cit na proliferação de células da medula óssea.....	61
Figura 34 - Efeito dos tratamentos com Rh ₂ (H ₂ cit) ₄ , Magh-Rh ₂ (H ₂ cit) ₄ e Magh-Cit sobre a fragmentação do DNA em células da medula óssea.....	62
Figura 35 - Fotomicrografias de carcinoma mamário de camundongos BALB/C submetido à marcação imunohistoquímica para avaliação da expressão da proteína fibronectina.....	63
Figura 36 - Percentuais de células tumorais positivamente imunomarcadas para avaliação da expressão da proteína fibronectina em carcinoma mamário de camundongos BALB/C do grupo controle com tumor (salina) ou tratados com Magh-Rh ₂ (H ₂ cit), Magh-Cit ou Rh ₂ (H ₂ cit) ₄	64
Figura 37 - Percentuais de área da matriz extracelular positivamente imunomarcada para avaliação da expressão da proteína fibronectina em carcinoma mamário de camundongos BALB/C do grupo controle com tumor (salina) ou tratados com Magh-Rh ₂ (H ₂ cit), Magh-Cit ou Rh ₂ (H ₂ cit) ₄	64

Figura 38 - Fotomicrografias de carcinoma mamário de camundongos BALB/C submetido a marcação imunohistoquímica para avaliação da expressão da proteína laminina.....	65
Figura 39 - Percentuais de células tumorais positivamente imunomarcadas para avaliação da expressão da proteína laminina em carcinoma mamário de camundongos BALB/C do grupo controle com tumor (salina) ou tratados com Magh-Rh ₂ (H ₂ cit), Magh-Cit ou Rh ₂ (H ₂ cit) ₄	66
Figura 40 - Percentuais de área da matriz extracelular positivamente imunomarcada para avaliação da expressão da proteína laminina em carcinoma mamário de camundongos BALB/C do grupo controle com tumor (salina) ou tratados com Magh-Rh ₂ (H ₂ cit), Magh-Cit ou Rh ₂ (H ₂ cit) ₄	66
Figura 41 - Curva de amplificação dos <i>primers</i> de Fibronectina e RPS9 por RT-qPCR.....	67
Figura 42 - Curva de amplificação dos <i>primers</i> Laminina e RPS9 por RT-qPCR.....	68

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Cadeias da laminina e localização nos tecidos.....	20
Tabela 2 - Materiais utilizados nos experimentos.....	28
Tabela 3 - Concentração de ródio (II) e de ferro nas soluções estoques de $Rh_2(H_2cit)_4$, Magh- $Rh_2(H_2cit)_4$ e Magh-Cit.....	33
Tabela 4 - Distribuição dos limites mínimos e máximos para a construção dos oligonucleotídeos segundo o parâmetro.....	37
Tabela 5 - Sequência dos oligonucleotídeos utilizados para a amplificação do RNAm relativo aos genes <i>Fibronectina</i> , <i>Laminina</i> e <i>RPS9</i>	39
Tabela 6 - Eritrograma de camundongos BALB/c fêmeas portadores de carcinoma mamário tratados via intratumoral com $Rh_2(H_2cit)_4$, Magh- $Rh_2(H_2cit)_4$ e Magh- Cit.....	49
Tabela 7 - Plaquetograma de camundongos BALB/c fêmeas portadores de carcinoma mamário tratados via intratumoral com $Rh_2(H_2cit)_4$, Magh- $Rh_2(H_2cit)_4$ e Magh-Cit.....	50
Tabela 8 - Leucograma de camundongos BALB/c fêmeas portadores de carcinoma mamário tratados via intumoral com $Rh_2(H_2cit)_4$, Magh- $Rh_2(H_2cit)_4$ e Magh-Cit.....	51

Lista de Abreviaturas e Siglas

ALT	Alanina aminotransferase
BSA	Albumina sérica bovina
cDNA	DNA complementar
CHCM	Concentração de hemoglobina corpuscular média
DAB	Diaminobenzidina
DMEM	Dulbecos's modified Eagle's médium
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTPs	Desoxirribonucleotídeo trifosfato
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético bipotássico
EPR	Permeação e retenção aumentadas
FN	Fibronectina
HCM	Hemoglobina corpuscular média
HCT	Hematócrito
HGB	Hemoglobina
IDT	Integrated DNA Technologies
IHQ	Imunohistoquímica
INCA	Instituto Nacional do Câncer
LN	Laminina
Magh-Cit	Nanopartículas de maghemita
Magh-Rh ₂ (H ₂ cit) ₄	Nanopartículas de maghemita associadas ao citrato de ródio (II)
MEC	Matriz Extracelular
MET	Microscopia eletrônica de transmissão
MMP	Metaloproteinases
mV	Milivolts
Pb	Pares de base
PBS	Tampão fosfato salino
PdI	Índice de polidispersão
PI	Iodeto de propídeo
PLT	Número de plaquetas
RBC	Número de hemácias
Rh ₂ (H ₂ cit) ₄	Citrato de ródio (II)

RT-qPCR	Reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real
SFB	Soro fetal bovino
TEM	Transição epitélio mesenquimal
TGP	Transaminase pirúvica
UTDL	Unidade terminal ducto-lobular
UV	Ultravioleta
VCM	Volume corpuscular médio
VPM	Volume plaquetário médio
WBC	Leucócitos totais

SUMÁRIO

1. Introdução	1
1.1 Câncer de mama: Epidemiologia e incidência.....	1
1.2 Mama sadia e progressão do câncer.....	2
1.3 Ciclo celular.....	5
1.4 Terapêuticas convencionais e suas limitações.....	6
1.5 Uso de compostos metálicos como quimioterápicos.....	7
1.6 Nanobiotecnologia.....	8
1.7 Nanopartículas magnéticas.....	10
1.8 Associação de nanopartículas magnéticas ao citrato de ródio (II).....	11
1.9 Metástase.....	12
1.10 Matriz extracelular e suas interações com as células tumorais.....	16
1.11 Laminina.....	19
1.12 Fibronectina.....	22
2. Justificativa	25
3. Objetivos	26
3.1 Objetivo Geral.....	26
3.2 Objetivos Específicos.....	26
4. Materiais e Métodos	27
4.1 Amostras de citrato de ródio (II) e dos fluidos magnéticos associados.....	29
4.2 Cultura celular.....	31
4.3 Animais.....	32
4.4 Inoculação de células tumorais.....	32
4.5 Tratamento.....	32
4.6 Coleta de material biológico dos camundongos.....	33
4.6.1 Coleta de amostras para análise hematológica e bioquímica.....	34
4.6.2 Coleta do tumor e mama.....	34
4.6.3 Coleta da medula óssea.....	35
4.7 Análise da expressão dos genes <i>Fibronectina</i> e <i>Laminina</i>	35
4.7.1 Extração e quantificação de RNA.....	35
4.7.2 Síntese do DNA complementar.....	36

4.7.3 Desenho dos <i>primers</i>	37
4.7.4. Validação dos <i>primers</i> por meio de PCR qualitativo.....	38
4.7.5 Reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real.....	39
4.8 Microscopia ótica.....	39
4.9 Imunohistoquímica.....	40
4.10 Avaliação genotóxica de células da medula óssea por fragmentação de DNA e ciclo celular.....	43
4.11 Análises Estatísticas.....	43
5. Resultados.....	45
5.1 Análises clínicas.....	45
5.1.1 Avaliação do peso dos camundongos.....	45
5.1.2 Mensuração do tumor.....	46
5.2 Análises hematológicas e bioquímicas.....	48
5.2.1 Testes hematológicos.....	48
5.2.2. Testes bioquímicos.....	51
5.3 Análises histopatológicas.....	53
5.4 Análises do ciclo celular e fragmentação do DNA de células da medula óssea.....	61
5.5 Imunohistoquímica.....	62
5.6 Reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real – RT qPCR....	67
6. Discussão.....	69
7. Conclusões e perspectivas.....	78
8. Referências Bibliográficas.....	79
9. Anexo.....	91

1. Introdução

1.1. Câncer de mama: Epidemiologia e incidência

O câncer é um conjunto de doenças que têm em comum o crescimento desordenado de células, resultando na formação de um novo tecido chamado de tumor (ROBBINS & COTRAN, 2010). Este tumor é classificado em benigno, quando as células são parecidas com as do tecido de origem e se multiplicam de forma mais lenta, ou maligno, quando invadem os tecidos adjacentes, as células tendem a se dividir rapidamente de forma agressiva e descontrolada. Segundo o Instituto Nacional do Câncer, em 2014, estima-se que ocorram 576 mil novos casos de câncer. As taxas de mortalidade continuam elevadas, muito provavelmente porque a doença é diagnosticada já em estágios avançados. Na população mundial, a sobrevida média após cinco anos do diagnóstico da doença é de 61% (INCA, 2014).

Estimativas para 2014 indicam aumento no número de novos casos das neoplasias de próstata, traqueia, brônquio, pulmão, cólon/reto e estômago, em homens, e das neoplasias de mama, cólon/reto, colo do útero, traqueia, brônquio e pulmão, em mulheres, em abrangência mundial (**Figura 1**).

Homens			Mulheres		
Localização primária	casos	%	Localização primária	casos	%
Próstata	68.800	22,8%	Mama Feminina	57.120	20,8%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	16.400	5,4%	Cólon e Reto	17.530	6,4%
Cólon e Reto	15.070	5,0%	Colo do Útero	15.590	5,7%
Estômago	12.870	4,3%	Traqueia, Brônquio e Pulmão	10.930	4,0%
Cavidade Oral	11.280	3,7%	Glândula Tireoide	8.050	2,9%
Esôfago	8.010	2,6%	Estômago	7.520	2,7%
Laringe	6.870	2,3%	Corpo do Útero	5.900	2,2%
Bexiga	6.750	2,2%	Ovário	5.680	2,1%
Leucemias	5.050	1,7%	Linfoma não Hodgkin	4.850	1,8%
Sistema Nervoso Central	4.960	1,6%	Leucemias	4.320	1,6%

*Números arredondados para 10 ou múltiplos de 10.

Figura 1 - Estimativa de novos casos de câncer no mundo em homens e mulheres em 2014. INCA (2014).

O câncer de mama, atualmente, é o tipo de neoplasia mais comum entre mulheres, sendo o principal fator de morte por câncer em países desenvolvidos e o segundo maior responsável em países em desenvolvimento (INCA, 2014). Alguns fatores de risco para o desenvolvimento do câncer de mama são bem conhecidos, como: gênero, envelhecimento, fatores relacionados à vida reprodutiva da mulher, predisposição genética, doença benigna prévia, consumo de álcool, excesso de peso, sedentarismo, exposição à radiação ionizante e alta densidade do tecido mamário (razão entre o tecido glandular e o tecido adiposo da mama), sendo os quatro primeiros os mais fortes e consistentes fatores de risco (MCPHERSON *et al.*, 2000; TRICHOPOULOS *et al.*, 2008).

A idade continua sendo um dos fatores mais importantes. As taxas de incidência desta doença aumentam rapidamente após os 50 anos. Em 2014, são estimados 57.120 novos casos de câncer de mama no Brasil. No Distrito Federal, para 2014, são estimados 920 novos casos de câncer de mama. Além disto, os atuais padrões de vida adotados em relação ao trabalho, nutrição e consumo em geral, expõem os indivíduos a fatores ambientais mais agressivos, relacionados a agentes químicos, físicos e biológicos resultantes de um processo de industrialização cada vez mais intenso. Todavia, nos últimos 40 anos, a sobrevida vem aumentando em países desenvolvidos, correspondendo a cerca de 85% enquanto, nos países em desenvolvimento, permanece com valores entre 50% e 60% (INCA, 2014).

1.2. Mama sadia e progressão do câncer

Para compreender melhor a origem e progressão do câncer de mama, é necessário entender como é organizada a estrutura e o tecido glandular da mama normal.

A mama humana normal é um complexo de ductos ramificados a partir do mamilo, os quais se estendem para um estroma formado por tecido adiposo e tecido conjuntivo fibroso. As glândulas mamárias não estão completamente desenvolvidas ao nascimento e é na fase da puberdade feminina que acontece a ramificação do sistema ductal. O sistema ductal ramificado da mama é dividido em dois grupos: a unidade terminal ducto-lobular (UTDL) e os grandes ductos (**Figura 2**). O lóbulo mamário representa a porção secretória da glândula e, por isto, é considerado a unidade anátomo-

funcional da mama (SCHMITT & GOBBI, 2006; JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2013).

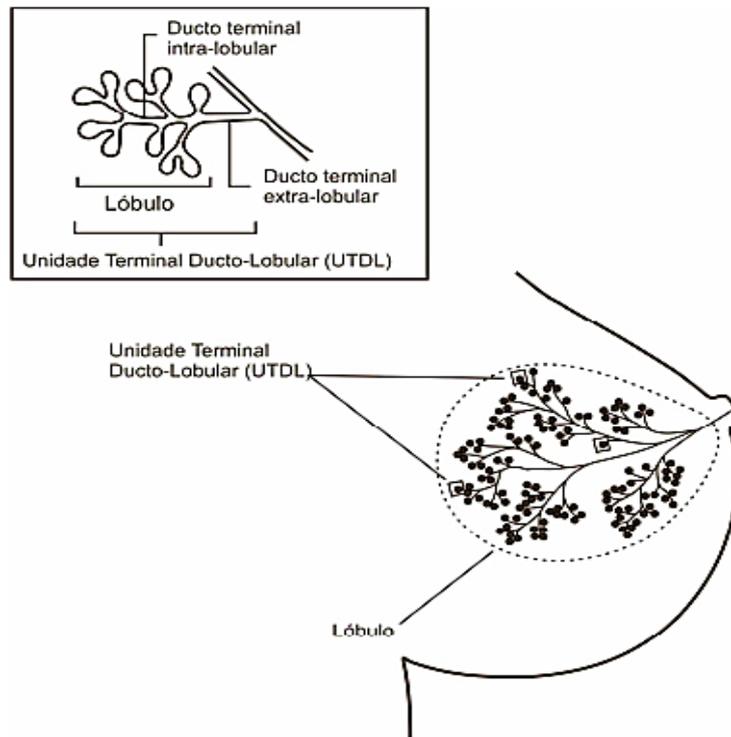


Figura 2 – Anatomia da mama. ARAUJO (2012).

Os lóbulos e ductos da glândula mamária são revestidos internamente por dois tipos de células epiteliais: as células luminais e as mioepiteliais, sendo que ambas estão apoiadas em uma lâmina basal. As células luminais compõem a camada mais interna da glândula mamária e são células com capacidade de secreção e absorção de fluidos. Estas células expressam citoqueratinas, proteínas relacionadas ao leite e receptores para o estrógeno. As células mioepiteliais formam a camada mais externa da glândula mamária e estas mostram diferenciação miofibrilar e estão envolvidas na regulação da polaridade das células luminais, na morfogênese do ducto mamário, na produção de componentes da lâmina basal e na ejeção do leite durante a lactação. Entre as células do mioepitélio e a camada luminal, estão presentes células multipotentes e células progenitoras, que estão envolvidas na regeneração da glândula mamária (SCHMITT & GOBBI, 2006; CICHON *et al.*, 2010).

Os tumores são denominados de acordo com o nome do tecido de onde se originam. Assim, a maioria dos cânceres de mama são denominados carcinomas, por terem origem epitelial. (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2014).

O carcinoma mamário pode ter alterações na expressão de genes que regulam funções essenciais como proliferação, morte e diferenciação celular. A célula que sofre mutação pode adquirir vantagem seletiva e passar por uma expansão clonal, sendo que cada uma de suas células-filhas tem o potencial de adquirir novas alterações moleculares. Os sucessivos eventos de alteração molecular, seleção e expansão clonal levam a um acúmulo de modificações genéticas e epigenéticas, induzindo a progressão tumoral (AXELROD *et al.*, 2006). As células neoplásicas apresentam características específicas ao final do processo de evolução tumoral, como: 1) sustentação da proliferação celular, 2) evasão de supressores de crescimento, 3) resistência à morte celular, 4) potencial replicativo ilimitado, 5) indução da angiogênese, 6) invasão tecidual e metástase, 7) evasão do sistema imune, 8) desregulação do metabolismo energético da célula, 9) inflamação, 10) instabilidade genômica e mutação (HANAHAN & WEINBERG, 2011) (**Figura 3**).

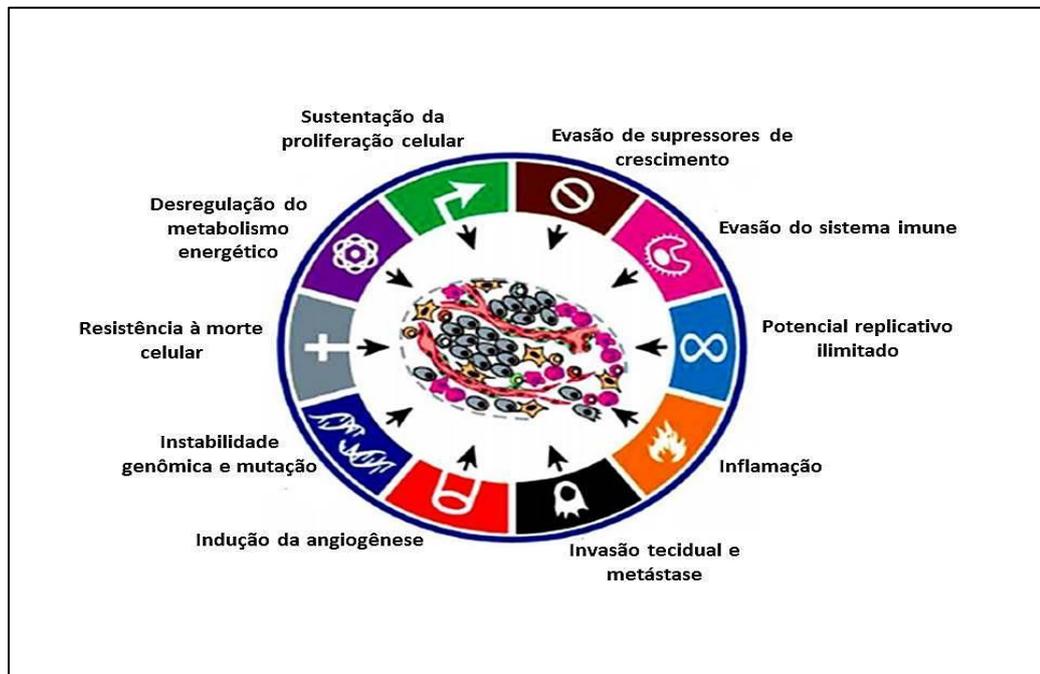


Figura 3 - Características comuns no câncer. Adaptado: HANAHAN & WEINBERG (2011).

1.3. Ciclo celular

A replicação das células é estimulada por fatores de crescimento ou por sinalização dos componentes da matriz extracelular, por meio das integrinas. Para conseguir fazer a replicação e divisão do DNA, a célula passa por vários eventos estritamente controlados chamados de ciclo celular, o qual consiste nas fases pré síntese (G1), síntese de DNA (S), pré-mitótica (G2) e mitótica (M). As células quiescentes, que não entraram no ciclo celular, estão no estado G0 (ROBBINS & COTRAN, 2010) (Figura 4).

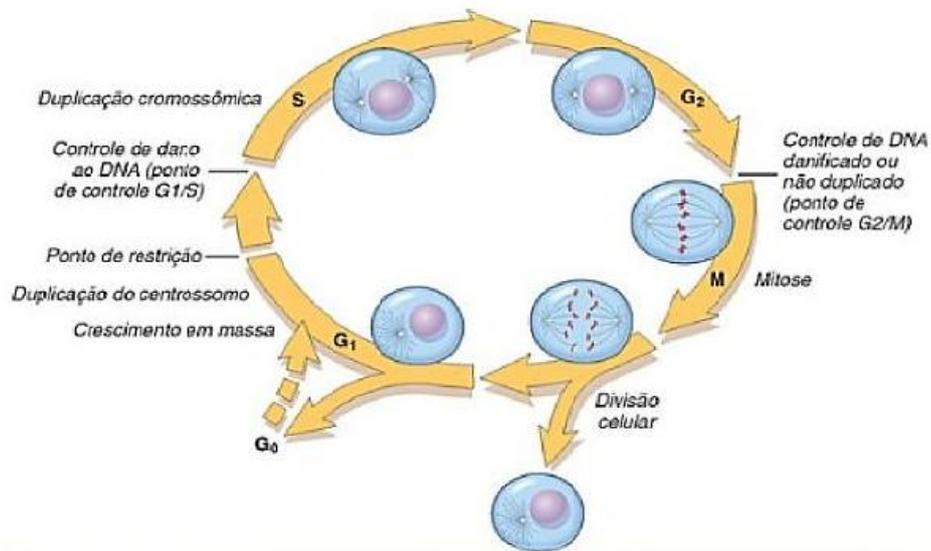


Figura 4 - Fases do ciclo celular. ROBBINS & COTRAN (2010).

Para cada fase do ciclo celular acontecer é necessária a ativação apropriada e a finalização da fase anterior, e, quando um gene essencial para o processo se encontra deficiente, o ciclo se interrompe. Há diversos mecanismos de controle da integridade do ciclo celular chamados de pontos de checagem (*checkpoints*) que certificam a ocorrência de lesões no DNA/cromossomo e se as condições celulares estão adequadas para: 1) acontecer a transição da primeira fase de intervalo do ciclo celular (G1) para a fase S; 2) para manter a integridade do DNA durante a replicação por meio do ponto de checagem na fase S; 3) realizar a transição do segundo intervalo do ciclo celular (G2), para a fase de mitose (M); 4) fazer a transição da metáfase para anáfase, dentro da fase

M e 5) manter a integridade da célula na citocinese ao final da mitose (GOTO *et al.*, 2013).

Quando uma lesão no DNA é detectada pelos pontos de checagem, é ativado um controle que retarda o ciclo e desencadeia mecanismos de reparo. Se a lesão for grave para ser reparada, as células entram em apoptose ou em senescência replicativa (ROBBINS & COTRAN, 2010).

1.4. Terapêuticas convencionais e suas limitações

As terapêuticas convencionais para o tratamento do câncer de mama tais como a cirurgia, quimioterapia, radioterapia e hormonioterapia, apresentam relativa eficiência apenas quando o câncer é diagnosticado precocemente (BERGMANN *et al.*, 2000). Quando o tumor é detectado em estágios iniciais, ou seja, está somente na mama ou em alguns casos em mulheres com nódulo-positivo para câncer de mama, a cirurgia é um tratamento bastante utilizado. Porém, alguns vestígios não detectados de tecido tumoral podem permanecer no corpo do paciente e, caso não seja feito o tratamento adjuvante, há o risco de recorrência do tumor (CTSU, 2005). Nos casos de metástase, esta terapia não é possível, pois as células neoplásicas têm uma localização dispersa, o que também limita uma resposta a agentes antitumorais sistêmicos. Entender os caminhos e as interações dinâmicas desta doença ajudará a identificar alvos moleculares promissores para a terapia do câncer e os principais obstáculos ao seu desenvolvimento clínico. Então, acredita-se que a chave para um tratamento eficaz para o câncer depende do desenvolvimento de métodos para prever a agressividade do tumor metastático do paciente e os locais de invasão, assim como identificar e tratar micrometástases clinicamente assintomáticas ou imperceptíveis (VALASTYAN, 2011).

Uma das limitações dos quimioterápicos convencionais ocorre devido ao fato destes induzirem toxicidade tanto em células tumorais, quanto em células normais, causando toxicidade sistêmica. Devido à baixa especificidade dos quimioterápicos, há uma distribuição em tecidos não alvo e isto requer maior quantidade na administração dos fármacos, o que na maioria das vezes não é possível devido a alta toxicidade, o que demanda o desenvolvimento constante de alternativas terapêuticas que possibilitem o tratamento da doença de uma forma menos invasiva e mais efetiva (GU *et al.*, 2007; DHANKHAR *et al.*, 2010).

1.5. Uso de compostos metálicos como quimioterápicos

Dentre os quimioterápicos conhecidos, destacam-se os compostos por metais. Estes foram conhecidos anteriormente ao século XVI, porém, permaneceram em esquecimento até 1960, quando a atividade antitumoral do complexo inorgânico cis-diaminodicloroplatina (II) (cisplatina) foi descoberta. O mecanismo de ação da cisplatina está relacionado à sua capacidade de induzir morte celular por meio da formação de ligações covalentes cruzadas entre as guaninas do DNA, causando distorções na sua estrutura de dupla hélice e impedindo processos como a transcrição e replicação do DNA, levando a citotoxicidade (WING *et al.*, 1984; KATSAROS & ANAGNOSTOPOULOU, 2002; PASETTO *et al.*, 2006).

A cisplatina é uma das drogas mais utilizadas atualmente no tratamento de vários tipos de câncer, porém seu sucesso clínico é limitado por induzir severos efeitos adversos e também pela capacidade de resistência adquirida ou intrínseca das células tumorais (ZHANG & LIPPARD, 2003; ZHAO & LIN, 2005).

A necessidade de descoberta de novos complexos metálicos com atividade citotóxica semelhante à da cisplatina implica em melhor eficácia na terapêutica e menor toxicidade da droga. Assim, os carboxilatos de ródio (II) (fórmula geral $(\text{Rh}_2(\text{O}_2\text{CR})_4)$) têm sido estudados desde 1972, procurando superar estas desvantagens. Acredita-se que os carboxilatos de ródio possuam atividade antitumoral similar à cisplatina, causando danos ao DNA (SOUZA *et al.*, 1996; KATSAROS & ANAGNOSTOPOULOU, 2002).

A maioria dos carboxilatos de ródio causam efeitos tóxicos e há uma dificuldade de solubilizá-lo em água, o que torna seu uso limitado e diminui o interesse de pesquisas com estes compostos. Entretanto, estratégias estão sendo estudadas para aumentar a solubilidade dos carboxilatos de ródio (II) em água, como ligantes compostos por um grupo hidrofílico em posições opostas na molécula, como é o caso do citrato de ródio (II) (SOUZA *et al.*, 1996; NOTHENBERG, 2000).

O citrato de ródio (II), cuja fórmula molecular é $\text{Rh}_2(\text{H}_2\text{cit})_4$, é constituído por quatro moléculas de citrato e dois átomos de ródio ligados a duas moléculas de água na posição axial. Esse composto possui oito ácidos carboxílicos livres (-COOH) (dois para cada citrato) e duas hidroxilas (-OH) das moléculas de água (**Figura 5**).

Foi observado que o citrato de ródio (II) apresenta atividade citotóxica, citostática e antitumoral em células de carcinoma mamário em tumor ascético de

Ehrlich e em células tumorais (Y-1) e normais da adrenocortical (AR-1(6)) (REIBSCHEID, 1994; ZYNGIER 1989).

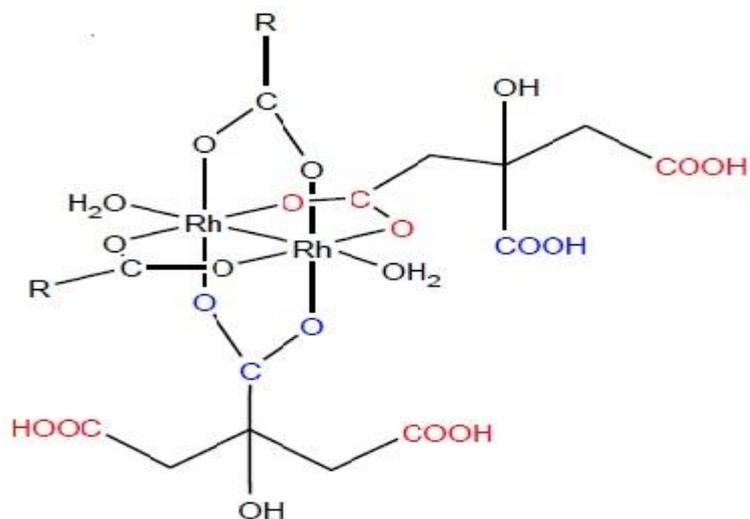


Figura 5 – Estrutura molecular do citrato de ródio (II). CARNEIRO (2011).

1.6. Nanobiotecnologia

A nanobiotecnologia é uma área da ciência que utiliza partículas menores do que 100 nanômetros (nm), no entanto, para aplicações farmacêuticas ou biomédicas, a faixa de tamanho adotada é de 5 – 1000 nm. As nanoestruturas representam uma alternativa promissora para o tratamento do câncer (NIE *et al.*, 2007).

O desafio dos pesquisadores é conseguir integrar materiais sintéticos e híbridos, em micro e nano escala, no sistema biológico. São vários os tipos de sistemas desenvolvidos, dentre eles as nanopartículas poliméricas, metálicas, magnéticas; lipossomos, nanocápsulas, entre outros (SAFARI & ZARNEGAR, 2014).

Os nanocarreadores podem oferecer vantagens em relação aos fármacos administrados de forma livre, como: 1) proteger a droga da degradação prematura; 2) prevenir que a droga interaja prematuramente com o sistema biológico; 3) aumentar a absorção da droga em um tecido específico (exemplo, tumoral); 4) controlar a farmacocinética e o perfil de liberação da droga no tecido; 5) melhorar a infiltração intracelular da droga (PEER *et al.*, 2007).

Sistemas de entrega de droga (*Drug Delivery Systems*), em escala nanométrica, podem melhorar a eficácia dos tratamentos contra várias doenças por ter a capacidade de se deslocar para o alvo terapêutico, poupando fisiologicamente as células e tecidos saudáveis, melhorando a qualidade de vida do paciente e potencializando a ação do princípio ativo (SAFARI & ZARNEGAR, 2014). Esses sistemas apresentam vantagens quando comparados a terapêuticas convencionais, como aumento da eficácia terapêutica, liberação progressiva e controlada do fármaco, redução da toxicidade do tratamento, maior tempo de permanência na circulação sanguínea, menor número de doses, direcionamento a alvos específicos e possibilidade de incorporação a substâncias lipofílicas como hidrofílicas (CHIDAMBARAM *et al.*, 2012).

A liberação da droga no tecido alvo pode ocorrer de duas maneiras: liberação passiva e ativa (CHO *et al.*, 2008). A liberação passiva utiliza o efeito de permeabilidade e retenção aumentada (EPR - *Enhanced Permeability and Retention*) do tecido tumoral. As nanopartículas utilizam o capilar endotelial do tecido tumoral descontínuo e, conseqüentemente, mais permeável às nanoestruturas do que os capilares dos tecidos saudáveis, o que permite o extravasamento de uma maior concentração de nanopartículas no tecido tumoral (**Figura 6**). Outro fator que promove um acúmulo das nanopartículas no tecido tumoral é a redução da drenagem linfática desta região, que resulta em um maior acúmulo do agente terapêutico (TORCHILIN *et al.*, 2011).

Na liberação ativa, ocorre quando é feita a conjugação de ligantes na superfície das nanopartículas, permitindo, um acúmulo preferencial da droga no tecido tumoral. Utiliza-se para direcionar nanopartículas para se ligarem de maneira específica a receptores, antígenos ou carboidratos contidos na superfície da célula tumoral (SINGH, 2009).

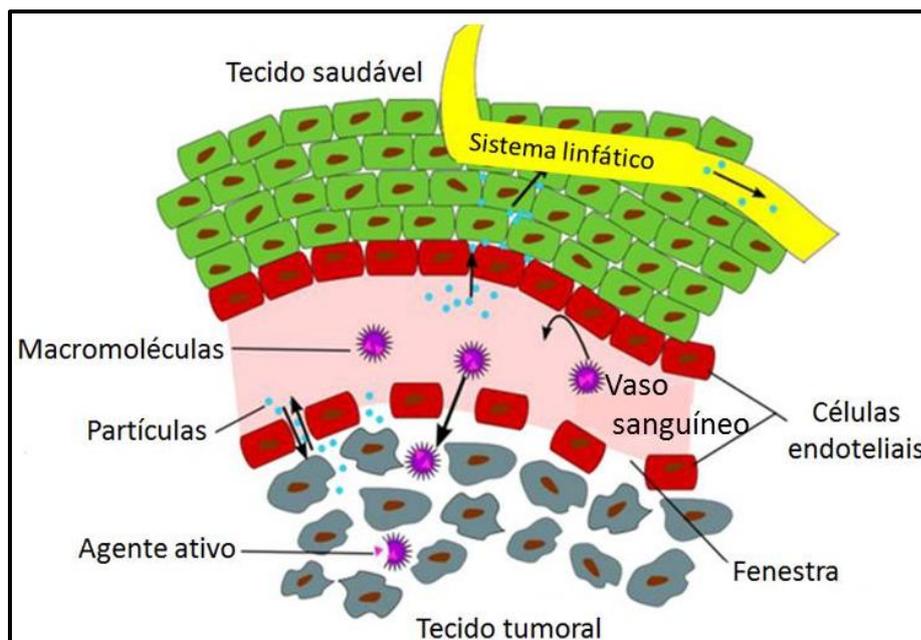


Figura 6 - Representação esquemática do tratamento passivo em tecido tumoral associado ao efeito de permeabilidade e retenção aumentada (EPR). STOCKHOFE (2014).

1.7. Nanopartículas magnéticas

O uso das nanopartículas magnéticas em aplicações biomédicas tem se tornado cada vez mais comum. Estas têm sido utilizadas para diagnóstico (na melhoria do contraste de imagens de ressonância magnética nuclear) e na terapêutica (magnetohipertermia, sistema de entrega de drogas, terapia gênica e etc.).

Uma vez as nanopartículas magnéticas concentradas na região do tumor ou no tecido alvo, o agente terapêutico pode ser, então, liberado levando a um aumento da internalização do fármaco pelo tumor no sítio alvo (FALQUEIRO, 2011).

Alguns fatores devem ser considerados ao se utilizar as nanopartículas magnéticas como, os parâmetros físicos: as propriedades magnéticas e o tamanho das partículas, a força do campo e a geometria do campo, assim como parâmetros fisiológicos: como a profundidade do alvo, a taxa de fluxo sanguíneo, o suprimento vascular e o peso corporal (GRIEF & RICHARDSON, 2005).

As nanopartículas de óxido de ferro, como a maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$), são uma das mais utilizadas em aplicações biológicas por possuírem excelentes propriedades magnéticas e não serem tóxicas. As características mais importantes ao estudar nanopartículas de maghemita é a sua estabilidade coloidal, ou seja, a manutenção das nanopartículas em suspensão na forma de objetos isolados, evitando assim a

aglomeração e precipitação, que é um fator importante a ser observado para a aplicação *in vivo* (FALQUEIRO, 2011).

1.8. Associação de nanopartículas de maghemita ao citrato de ródio (II)

O citrato de ródio (II) apresenta em sua estrutura os grupos funcionais constituídos por ácidos carboxílicos (-COOH) e por hidroxilas (-OH). Estes grupos funcionais são quimicamente semelhantes a moléculas utilizadas para funcionalizar nanopartículas magnéticas, levando a suspensões coloidais estáveis e com biocompatibilidade (CARNEIRO, 2011). Os grupos livres funcionais são apropriados para interagir com superfícies de nanopartículas de maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) proporcionando estabilidade coloidal (NUNES *et al.*, 2010) (**Figura 7**).

Por possuir maior solubilidade em água do que os outros carboxilatos de ródio, o citrato de ródio (II), tem sua eficiência reduzida havendo necessidade de uma dose sistêmica elevada para garantir sua eficácia como agente antitumoral *in vivo*. Desta forma, a associação do citrato de ródio (II) com nanopartículas de maghemita é uma estratégia empregada na tentativa de reduzir a toxicidade no organismo e aumentar a especificidade no tecido alvo (KATSAROS & ANAGNOSTOPOULOU, 2002; COUVREUR & VAUTHIER, 2006).

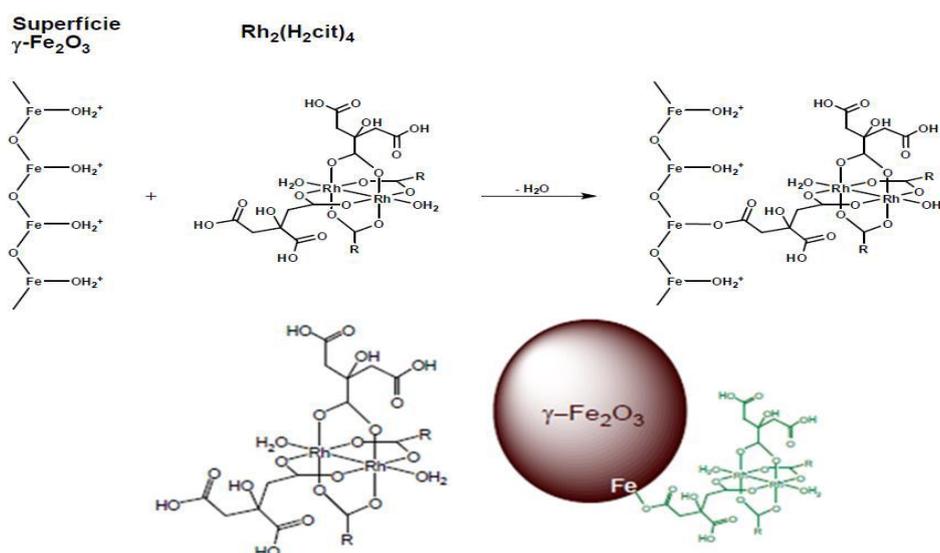


Figura 7 - Esquema da associação química de uma nanopartícula de maghemita com uma molécula de citrato de ródio (II). CHAVES (2013).

Estudos realizados pelo nosso grupo demonstraram que o tratamento intratumoral com citrato de ródio (II) livre $[Rh_2(H_2cit)_4]$ e associado a nanopartículas de maghemita $[Magh-Rh_2(H_2cit)_4]$ induziu redução do carcinoma mamário 4T1 estabelecido ortotopicamente em camundongos BALB/c (CARNEIRO *et al.*, 2013). Apesar dos resultados obtidos, a atividade biológica e as vias de atuação ainda não estão bem elucidadas.

A linhagem 4T1 é um modelo de carcinoma mamário derivado de tumor espontâneo em camundongos BALB/c. É uma linhagem em que o tumor possui características similares ao câncer de mama humano (estágio IV). Uma das vantagens do uso desta linhagem celular é que as células 4T1 são facilmente transplantadas na glândula mamária e isto permite crescimento do tumor e também, como ocorre no câncer de mama humano, estas células originam a metástase, possibilitando estudos de câncer metastático (PULASKI & OSTRAND-ROSENBERG, 2001; CARNEIRO *et al.*, 2010).

1.9. Metástase

A metástase ocorre quando as células cancerígenas se desprendem do tumor primário percorrendo o organismo até se alojarem em outro tecido, diferente daquele de origem, promovendo, o desenvolvimento de tumores secundários (RIETHDORF *et al.*, 2008; ZHAO *et al.*, 2008). Ela é responsável por mais de 90% das mortes associadas ao câncer, contudo, este é um processo que continua a ser um dos menos compreendidos na patogênese do câncer (CHAFFER & WENBER, 2011).

O processo da formação dos tumores secundários tem sido descrito com uma série de eventos, como: (1) Degradação da Matriz extracelular (perda da adesão celular), invasão e infiltração em tecidos subjacentes; (2) liberação de células neoplásicas na circulação, estas células se deslocam em pequenos vasos sanguíneos e/ou linfáticos; (3) sobrevivência destas células na circulação; (4) retenção destas células nos capilares de órgãos distantes; (5) seu extravasamento dos vasos linfáticos ou sanguíneos e a formação de um tumor secundário em outro tecido (CHAFFER & WENBER, 2011) (**Figura 8**).

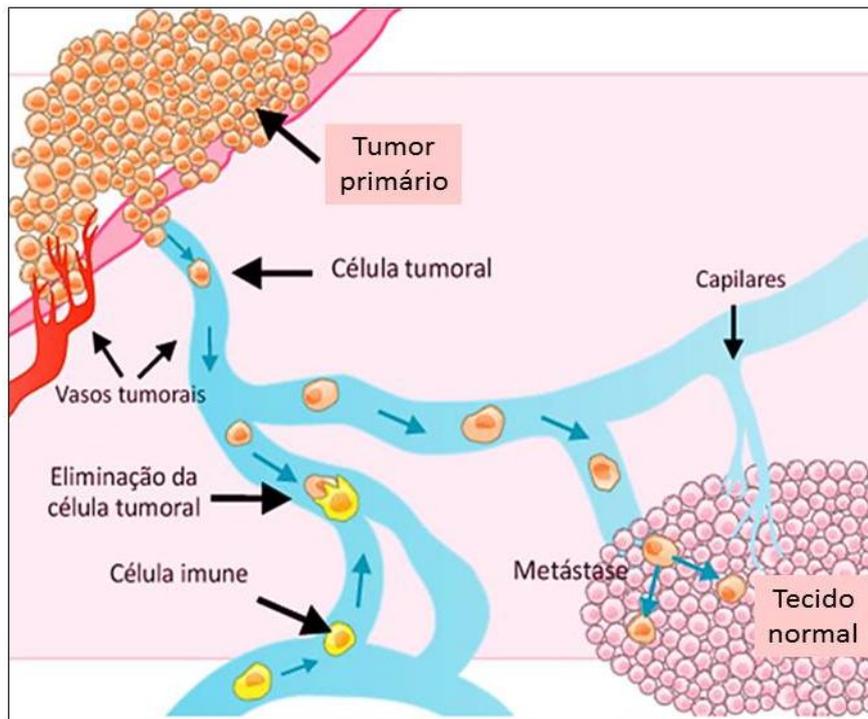


Figura 8 - Cascata metastática. As células no interior do tumor primário adquirem um fenótipo de célula invasiva. Ocorre a degradação da matriz extracelular e as células tumorais migram para os vasos sanguíneos. As células se deslocam através da circulação para os órgãos distantes e sobrevivem de forma independente. As células saem da circulação e invadem um novo tecido. Estas células precisam ser capazes de evitar a resposta imune inata, sobreviver como uma célula única (ou como um pequeno aglomerado de células), se adaptar ao novo microambiente e iniciar a proliferação (INCA, 2011).

Ao longo deste processo, fatores imunológicos e mecânicos devem ser superados para que as células neoplásicas consigam desenvolver um tumor em um novo órgão e cresçam de forma autônoma, em relação ao tumor primário. Geralmente, nos estágios avançados de desenvolvimento tumoral, as células tumorais apresentam uma série de alterações gênicas que as tornam altamente invasivas e resistentes aos medicamentos antitumorais (GRAVITZ, 2011).

A diferenciação celular é um processo complexo com muitas etapas no qual a célula adquire funcionalidade e especializações para a formação de determinado tecido do corpo. De início, a diferenciação celular é a instalação de um programa genético específico ao tecido em questão, que inclui o silenciamento de alguns genes e ativação de outros de acordo com a função que a célula vai exercer no tecido (MARCHAL *et al.*, 2006). É na etapa de diferenciação, que as funções biológicas das células são reguladas de acordo com o tipo celular, podendo ser diferenciadas das demais com funções distintas no mesmo tecido. Nas células tumorais, os controles do ciclo e da

diferenciação celular estão em desequilíbrio, resultando em células com alta capacidade de multiplicação e baixa diferenciação (ROBINS & COTRAN, 2010).

A progressão da metástase está associada aos mecanismos de escape da vigilância imunológica das células neoplásicas, como a perda da expressão de moléculas do complexo de histocompatibilidade, baixa expressão de antígenos tumorais, produção de citocinas inibitórias, dentre outras, dificultando o sucesso do tratamento em alguns casos (DIERSSEN *et al.*, 2006). O desenvolvimento de metástases depende de uma série de características que são adquiridas pelas células tumorais no decorrer do processo. De forma geral, as transformações que ocorrem nas células tumorais para adquirir um caráter invasivo requer que estas células passem por um processo chamado transição-epitélio-mesenquimal (TEM), isto é, estas células perdem algumas características epiteliais para adquirir características das células mesenquimais (THIERY & SLEEMAN, 2006). Estas células mesenquimais são fracamente organizadas, possuem alta capacidade migratória, o qual confere, às células tumorais que apresentam o fenótipo mesenquimal, a capacidade de migrar e invadir o tecido adjacente (SHI & WU, 2008).

Algumas características que ocorrem em tumores malignos são: (1) perda da coesão intercelular das células tumorais umas das outras e do tecido adjacente; (2) migração e colonização de tecidos distantes; (3) degradação da matriz extracelular e da membrana basal. Este processo ocorre com a secreção de proteases, como as metaloproteinases (MMP) da matriz. A clivagem de proteínas da matriz também gera sítios de ligação para moléculas de adesão do tipo integrinas, as quais irão ligar-se aos substratos da matriz extracelular possibilitando a invasão celular (KOBILINSKI, *et al.*, 2000); (4) fixação a componentes ancoradouros de locomoção da matriz (fibronectina, laminina e colágeno). É desta forma que as células tumorais se espalham por diversos tecidos e órgãos do corpo (**Figura 9**). Nesses novos tecidos, essas células utilizam nutrientes, espaço e desestabilizam o microambiente quimiostático das células normais, podendo resultar em falência múltipla dos órgãos e morte do indivíduo (ROBINS & COTRAN, 2010).

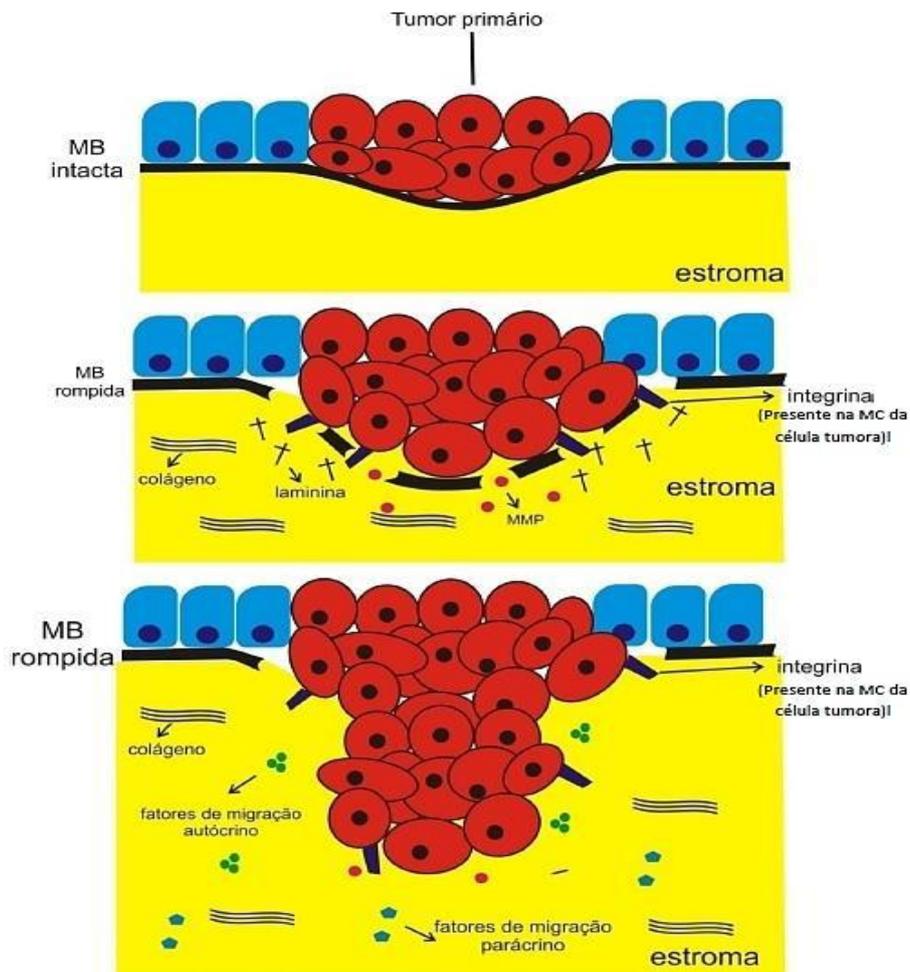


Figura 9 – Invasão celular. As células tumorais aderidas na membrana basal pelos seus receptores integrinas. Estas células liberam proteases que irão degradar os componentes da membrana basal e do estroma tumoral. Então, as células migram ao longo da matriz extracelular até alcançar a corrente sanguínea ou linfática. MB: Membrana Basal; MMP: Metaloproteínases; MC: Membrana celular (CARVALHO, 2011).

No câncer de mama, metástases macroscópicas podem surgir décadas após o tumor primário ser removido cirurgicamente ou ter sido farmacologicamente reduzido. Isto pode ocorrer por consequência de micrometástases dormentes. Esta dormência pode ocorrer quando se tem privação de nutrientes, às células tumorais, promovendo intensa autofagia, causando diminuição das células cancerígenas, induzindo estas células a adotar um estado reversível de dormência. As células voltam a crescer e proliferar apenas quando ocorrem mudanças no microambiente tecidual, como o acesso a mais nutrientes (LUO *et al.*, 2009; HANAHAN, & WEINBERG, 2011).

1.10. Matriz extracelular e suas interações com as células tumorais

A matriz extracelular (MEC) é uma rede tridimensional complexa, constituída por macromoléculas e pode ser dividida em matriz intersticial e lâmina basal (SIU *et al.*, 2003).

A MEC é constituída por elementos fluidos e fibrosos. Os fluidos são as glicosaminoglicanas e proteoglicanas. Os fibrosos são as proteínas estruturais e as proteínas adesivas, sendo que esta composição varia de acordo com o tecido (HOHENESTER & ENGEL, 2002; LODISH *et al.*, 2014). As proteínas constituintes da MEC são sintetizadas localmente pelas células e estão em íntima associação com a superfície celular (ZIOBER *et al.*, 2006). Estas proteínas são o colágeno, elastina, fibronectina, vitronectina, lamininas, dentre outras (DALEY *et al.*, 2008) (**Figura 10**).

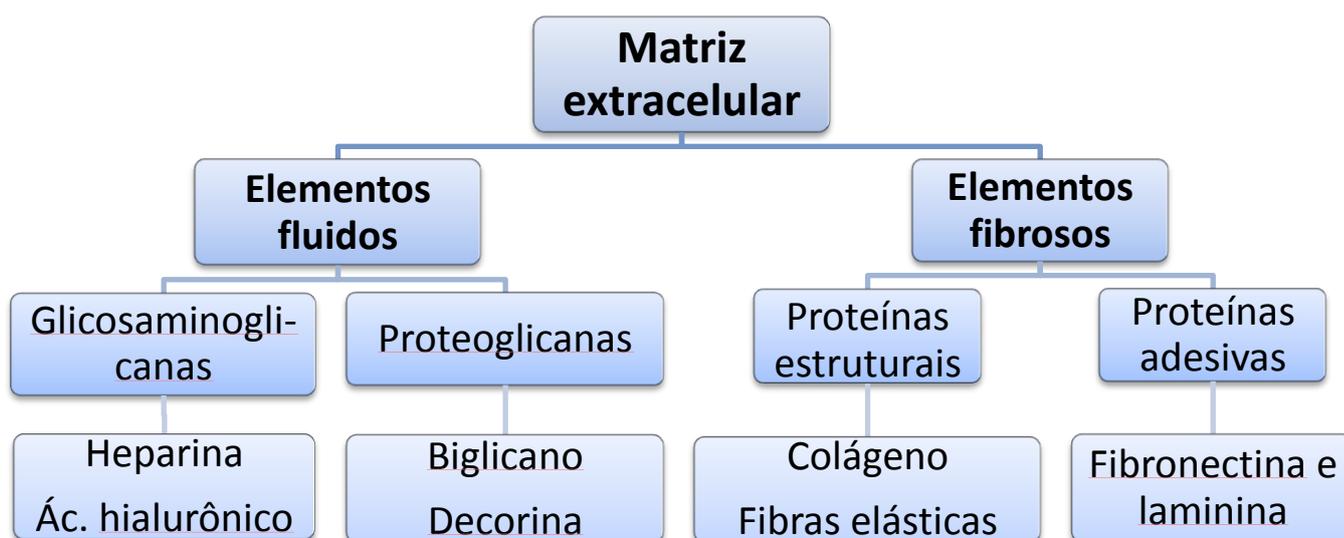


Figura 10 – Fluxograma com os elementos que compõem a matriz extracelular (LODISH *et al.*, 2014).

As proteínas da MEC são grandes, multifuncionais e contêm diferentes domínios com várias funções em uma mesma macromolécula (HOHENESTER & ENGEL, 2002). As proteoglicanas possuem carga negativa elevada, fator que as faz atrair cátions, principalmente Na^+ . Por serem compostos osmoticamente ativos, tornam a MEC altamente hidratada, formando um gel viscoso, onde as proteínas da matriz estão embebidas (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2013).

A MEC é reguladora de vários aspectos do comportamento celular, como, proliferação, crescimento celular, sobrevivência, morfologia, migração e diferenciação

(DALEY *et al.*, 2008). Por regular esses processos biológicos, a MEC tem importância na progressão tumoral. A MEC contém enzimas proteolíticas, citocinas e moléculas regulatórias que, ao serem ativadas fora do contexto normal, podem estimular a evolução do tumor. A organização da MEC é importante para as funções regulatórias da célula, pois mutações em genes que codificam proteínas da matriz ou seus receptores celulares já foram associadas ao câncer. Uma célula normal precisa receber estímulos mitogênicos do seu meio externo para entrar em divisão celular, esses estímulos são transmitidos para o interior da célula por meio de receptores celulares, que incluem as integrinas e os receptores de fatores de crescimento (STREULI, 1995) (**Figura 11**).

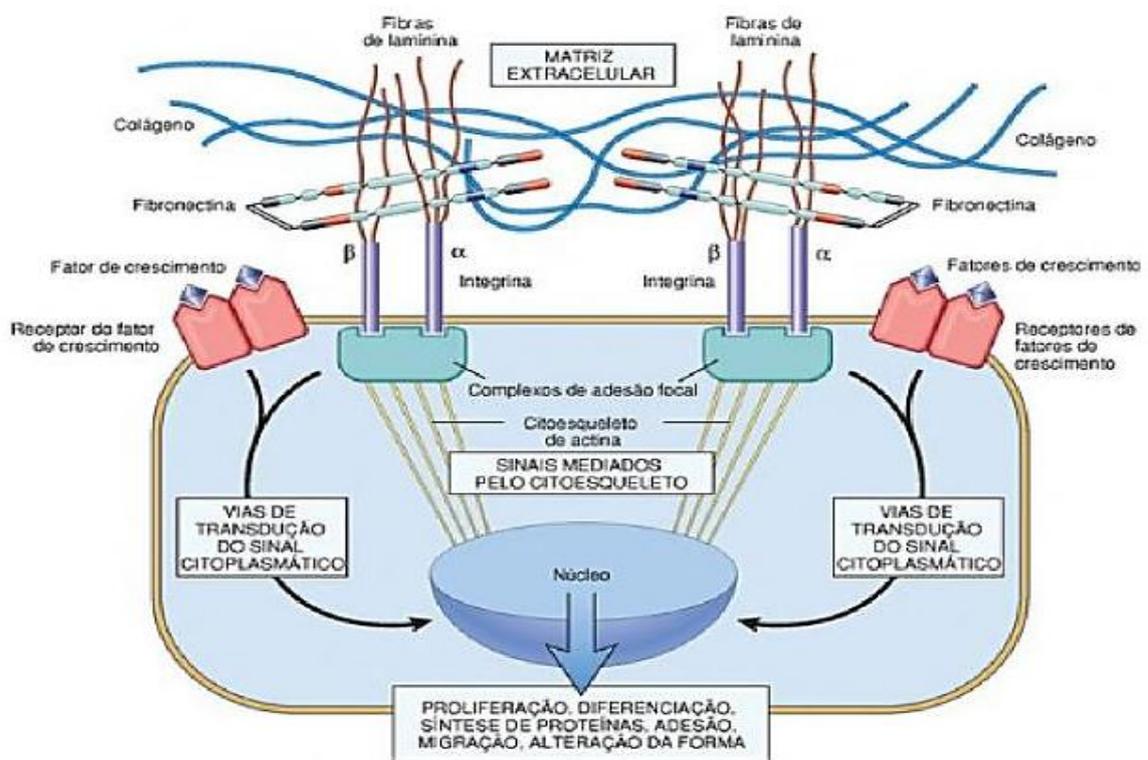


Figura 11 - Componentes da Matriz Extracelular e alguns de seus mecanismos de regulação de processos celulares e transdução de sinais. ROBBINS & COTRAN (2010).

As proteínas da MEC regulam vários aspectos do comportamento celular e parte desta regulação é mediada pela modulação da expressão gênica (BLUM *et al.*, 1989). A expressão gênica pode ser afetada por proteínas da MEC, pela interação com uma variedade de receptores celulares, principalmente as integrinas. A regulação da expressão gênica iniciada por integrinas está associada à progressão tumoral (SANTOS, 2011). Engbring *et al.* (2008) avaliaram o efeito de um peptídeo da cadeia $\alpha 1$ da laminina na expressão proteica de células de melanoma metastático. Utilizando

microarranjos de anticorpo, estes pesquisadores observaram que o tratamento com esse peptídeo aumentou a expressão da proteína fibronectina, de forma tempo e dose dependente.

Interações entre proteínas da matriz e as células são intermediadas por receptores de membrana celular, as integrinas, que são glicoproteínas alongadas com uma extremidade que se prende aos componentes da matriz e uma extremidade citoplasmática, que se liga, por intermédio da proteína talina, as actinas do citoesqueleto. São classificadas também como glicoproteínas heterodiméricas da membrana celular, constituídos por duas subunidades, α e β (HYNES, 1996; THORUP *et al.*, 1998). As integrinas interagem com ligantes presentes na matriz extracelular, mediam a adesão e geram sinalização celular de forma a integrar a célula a seu microambiente (GIANCOTTI & RUOSLAHTI, 1999). A expressão de integrinas pode ser alterada em células de carcinoma, de maneira a favorecer a expressão daquelas que mais estimulam a evolução tumoral (HANAHAN & WEINBERG, 2011).

A degradação da matriz extracelular é um evento essencial em muitos processos fisiológicos como durante o desenvolvimento embrionário, crescimento e reparo dos tecidos. As interações entre células neoplásicas e constituintes da MEC interferem fortemente no desenvolvimento tumoral, pois influenciam a proliferação e sobrevivência celular, bem como a sua capacidade de migrar do sítio primário para outros tecidos e formar metástases (IOACHIM *et al.*, 2002; KIERSZENBAUM & TRES, 2012).

A matriz extracelular tem um papel importante na invasão tumoral. Os processos envolvidos na invasão são: a migração celular e o remodelamento tecidual através de degradação proteolítica da MEC (JOHNSEN *et al.*, 1998; HEGERFELDT *et al.*, 2002). A migração é um processo complexo que depende, além de outros fatores, da célula ter interações com a matriz extracelular, como as glicoproteínas, fibronectina e laminina que guiam as células durante o processo de migração celular (ALBERTS *et al.*, 2010).

Para o processo de invasão acontecer, as células tumorais migram para os tecidos circundantes a fim de formar metástases e é necessária uma extensiva degradação de componentes da matriz extracelular, incluindo, colágeno, fibronectina, laminina e proteoglicanas (MOSCATELLI *et al.*, 1988; WOESSNER, 1991). Esta degradação é feita por enzimas da MEC chamadas proteinases que podem ser produzidas tanto pelas células tumorais, quanto por células normais. Entre as proteinases, destacam-se as metaloproteinases (MMP) que são capazes de degradar

diversos componentes da MEC (JOHNSEN *et al.*, 1998). O processo de invasão utilizado pelas células tumorais é o mesmo utilizado por células não tumorais em condições normais, a diferença é que em células normais, esta invasão é regulada e cessa quando o estímulo é retirado (SANTOS, 2011).

1.11. Laminina

Laminina (LN) é uma glicoproteína heterotrimérica, composta por três cadeias polipeptídicas diferentes, chamadas de cadeia α (440 kDa), β (210 kDa) e γ (200 kDa). São moléculas grandes, com 400-900 kDa de massa molecular. As três cadeias da LN se organizam formando uma estrutura em cruz, com três braços curtos e um braço longo formado a partir do entrelaçamento de parte de cada uma das cadeias (GOLBERT, 2011) (**Figura 12**).

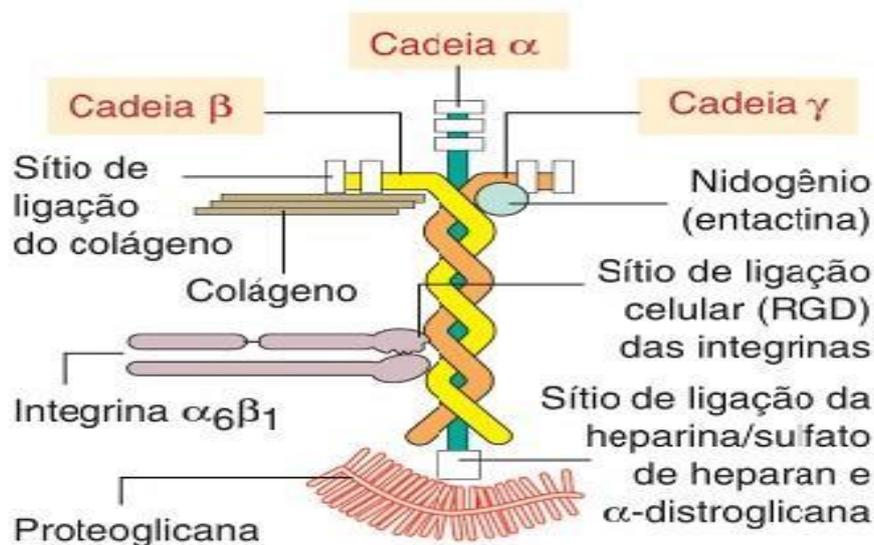


Figura 12 - Domínios estruturais da Laminina. Cadeias α , β e γ e demais domínios de ligações a várias moléculas KIERSENBAUM & TRES (2012).

A laminina apresenta isoformas resultantes das combinações de diferentes cadeias β , α e γ . Foram identificados cinco genes distintos que codificam subtipos da laminina de cadeia α , quatro para a cadeia β e três para a cadeia γ . A família da LN, atualmente, é constituída por 16 isoformas que são sintetizadas por quase todas as células epiteliais, além de células musculares lisas, tecido muscular cardíaco, tecido ósseo, células nervosas, células de medula óssea e endoteliais. Cada tecido expressa

isoformas de LN específicas, decorrente do fato de que as cadeias individuais que constituem a LN apresenta expressão diferenciada em cada tecido (PATARROYO *et al.*, 2002; BOSMAN & STAMANKOV, 2003; KIERSZENBAUM & TRES, 2012). Os tecidos onde as cadeias individuais da LN são expressas normalmente estão apresentados na **Tabela 1**.

Tabela 1 – Cadeias da laminina e localização nos tecidos.

Cadeias da laminina	Distribuição nos tecidos onde são expressas
$\alpha 1$	Embrião, neuroretina, rim, glândulas mamárias e salivares
$\alpha 2$	Músculo esquelético e cardíaco, nervos periféricos, capilares, trofoblasto, cérebro e outros tecidos
$\alpha 3$	Pele e outros epitélios
$\alpha 4$	Músculos esquelético, cardíaco e liso fetal, nervos, vasos sanguíneos, endotélio, medula óssea e outros tecidos
$\alpha 5$	Diversos epitélios, rins, vasos sanguíneos, medula óssea, músculo e nervos em desenvolvimento e lâmina basal sináptica
$\beta 1$	Na maioria dos tecidos
$\beta 2$	Junção neuromuscular, vasos sanguíneos e glomérulo renal
$\beta 3$	Pele e maioria dos outros epitélios
$\gamma 1$	Na maioria dos tecidos
$\gamma 2$	Pele e maioria de outros epitélios
$\gamma 3$	Rim, pulmão, trato reprodutivo, nervo e cérebro

PATARROYO *et al.*, (2002).

Para a formação da proteína laminina, inicialmente, são formados dímeros das subunidades β e γ , que são unidas por pontes dissulfeto. Esse dímero é retido no citoplasma até a incorporação da subunidade α . A LN só é secretada após a formação da trimerização (KIERSZENBAUM & TRES, 2012).

A laminina tem a função de ligar as células basais do epitélio ao colágeno IV e também desempenha um papel importante na diferenciação, proliferação, adesão e migração celular. Tem sido relacionada diretamente a estágios avançados de

diferenciação celular, sendo pré-requisito para diferenciação terminal e execução de funções especializadas, por interagir com as integrinas e outros componentes da superfície celular, assim como, por controlar a migração celular, polarização, proliferação e apoptose. Além do papel que as lamininas exercem em tecidos normais, algumas de suas atividades já foram relacionadas a importantes eventos de progressão tumoral (KUNZ-SCHUGHART *et al.*, 2001). A laminina possui uma atividade quimiotática, o que explica sua habilidade em estimular os movimentos celulares necessários aos processos de invasão e metástase (MALINDA & KLEINMAN, 1996). Estudos com células de mama tumorais, co-injetadas com laminina, em ratos, promoveram um aumento da formação de metástase no pulmão (IWAMOTO *et al.*, 1987).

Dentre as várias isoformas da LN, a mais estudada é a laminina-111 (anteriormente chamada de laminina-1). A cadeia $\alpha 1$ é encontrada no blastocisto e em vários locais no processo de embriogênese. Já em adultos, é expressa nas glândulas mamárias e salivares, rins, neuroretina, testículos, tireoide, endométrio e folículos capilares em desenvolvimento. As outras isoformas das cadeias β e γ são expressas em vários tecidos (SANTOS, 2011).

A laminina-111 exerce um papel fundamental na glândula mamária, determinando a polaridade das células epiteliais luminais, sendo que a cadeia $\alpha 1$ é a principal responsável em exercer esta função. Algumas isoformas da laminina-111 são sintetizadas principalmente pelas células mioepiteliais (KLEIN *et al.*, 1988; GUDJOHNSON *et al.*, 2005).

No processo do carcinoma mamário, acontecem alterações na composição e nível de expressão da laminina, contribuindo assim para a progressão da doença. Uma atividade proteolítica intensa resulta em uma menor deposição e dissolução da lâmina basal, o que caracteriza tumores invasivos. E algumas isoformas da laminina continuam sendo expressas mesmo nas células tumorais, o que contribui para o fenótipo invasivo do tumor. As células de câncer de mama deixam de expressar a cadeia $\alpha 1$, mas expressam as cadeias $\beta 1$ e $\gamma 1$ de forma aumentada de acordo com o potencial metastático (CHIA *et al.*, 2007).

1.12. Fibronectina

A fibronectina (FN) é uma glicoproteína adesiva. A sua molécula forma um dímero e cada subunidade possui uma porção amino-terminal e uma porção carboxi-terminal. Pontes dissulfeto ligam uma subunidade à outra, próximo à porção carboxiterminal de cada uma delas. A FN possui sítios de interação com várias moléculas (MANABE *et al.*, 1997; NARDIN, 2006) (**Figura 13a**).

As isoformas da FN são codificadas por um único gene, que possui 50 éxons aproximadamente, e codifica três tipos de subunidades homólogas repetitivas chamadas de tipo I, II e III (NARDIN, 2006). Os módulos são classificados de acordo com o tipo e numerados em ordem crescente da porção amino-terminal para a porção carboxiterminal. Os monômeros são compostos por doze repetições do tipo I, duas do tipo II e quinze a dezessete do tipo III (GRAVINA, 2010) (**Figura 13b**).

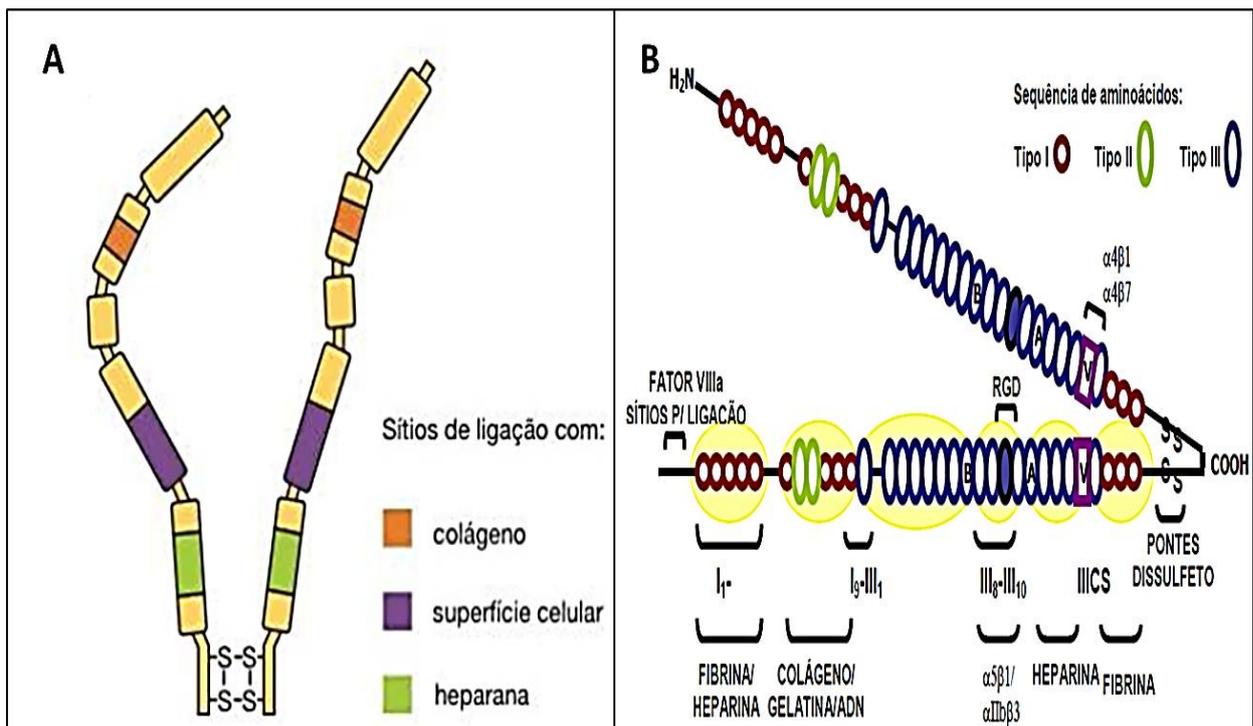


Figura 13 – (A) Estrutura da molécula dímera de fibronectina e seus domínios. Com sítios de ligação para Fibrina, Heparina e colágeno. (B) Ilustração da fibronectina com os fragmentos de Tipo I (em vermelho), II (em verde) e III (em azul). NARDIN (2006); JUNQUEIRA & CARNEIRO (2013).

O RNA mensageiro que codifica a FN tem duas formas de junção, dando origem à fibronectina celular e à fibronectina plasmática. A forma celular da FN é uma proteína insolúvel existente na matriz extracelular com aproximadamente 550 kDa. A

fibronectina plasmática é uma proteína solúvel com 220 a 250 kDa. A FN plasmática se liga à fibrina, auxiliando na estabilização do coágulo, que preenche as lacunas criadas por lesões e atua como substrato para deposição de MEC e formação de matriz provisória durante a recuperação das lesões. As propriedades estruturais e funcionais são semelhantes entre as duas formas, que têm função de adesão, diferenciação celular e migração (ARMSTRONG, 2000; KIERSZENBAUM & TRES, 2012).

A FN plasmática é secretada pelo fígado, enquanto a FN celular é produzida por fibroblastos, monócitos, células endoteliais e células da medula óssea. Esta se associa a superfícies celulares, membranas basais, matrizes pericelulares, componentes da MEC, como colágeno, fibrina, heparina e proteoglicanas, via domínios específicos, e as células, via receptores de integrinas (RUOSLAHTI & MORLA, 1992).

Foi observado em tecidos neoplásicos, que uma baixa deposição de FN promove uma maior movimentação das células tumorais, favorecendo a metástase (MOHRI, 1996).

Segundo Kosmehl *et al.* (1999), a expressão de FN tem relação com a diferenciação e a maturação celular. Em seus experimentos, foi observada uma elevada expressão de FN no estroma tumoral com fragmentação pericelular da proteína, mostrando que a FN tem um papel importante na progressão tumoral.

As proteínas fibronectina e laminina têm sido relacionadas ao controle de migração celular (ARMSTRONG, 2000; KUNZ-SCHUGHART *et al.*, 2001). Estudos recentes mostram que células adjacentes ao tumor não são apenas elementos estruturais passivos, mas atuam ativamente na progressão do tumor (POLYAK & KALLURI, 2010; PLACE *et al.*, 2011). Os tecidos tumorais apresentam matriz extracelular modificada, composta por um complexo de colágeno, glicoproteínas e proteoglicanas que interagem com o interior da célula, assim modulando a adesão celular, proliferação e diferenciação (IOACHIM *et al.*, 2002).

A imunomarcagem da fibronectina e da laminina tem sido utilizada para avaliar a expressão destas proteínas na MEC (BERNDT *et al.*, 2001; KUNZ-SCHUGHART *et al.*, 2001; MIRANDA *et al.*, 2002). Proteínas como CD44 participam de processos moleculares relacionados à migração celular desencadeada pela fibronectina. Além disso, o envolvimento de uma enzima proteolítica denominada catepsina D tem sido associado à expressão de fibronectina e laminina (JAHKOLA *et al.*, 1999; KAVISLIA *et al.*, 2005).

Por não estar elucidado o papel das proteínas fibronectina e laminina no processo de migração e invasão das células tumorais, há divergência entre os autores. Alguns afirmam que a superexpressão das proteínas fibronectina e laminina está diretamente relacionada com este processo, enquanto outros autores acreditam que seja a degradação destas proteínas na matriz extracelular o principal fator. Segundo Potts & Campbell (1996), a degradação destas proteínas está diretamente associada ao processo de metástase tumoral. A perda da fibronectina durante a carcinogênese pode permitir a livre migração das células neoplásicas (PEREIRA, 2005). Entretanto, Wang *et al.* (2010), mostraram que a superexpressão destas proteínas em células neoplásicas tem demonstrado um papel importante na progressão do tumor, que geralmente está associado a liberação de proteases pela célula, onde ocorre ruptura da MEC podendo formar espaços intersticiais nesta região facilitando a migração.

Devido à importância que as proteínas laminina e fibronectina desempenham na matriz extracelular, acredita-se que a compreensão dos mecanismos envolvidos na degradação e descontinuidade da estrutura destas proteínas precisa ser elucidada para melhor compreender os mecanismos envolvidos na invasão tumoral, adesão tecidual e metástases, os quais representam os principais fatores indicadores de prognóstico e sobrevida dos pacientes portadores de câncer.

2. Justificativa

Sabendo que o câncer de mama tem uma alta incidência no mundo, faz-se necessário entender a doença para promover um aumento da sobrevivência dos pacientes e minimizar os efeitos adversos provenientes das terapêuticas tradicionais. Por outro lado, a utilização de nanopartículas como carreadores de drogas no tratamento de algumas doenças tem se mostrado uma alternativa promissora.

Até o momento, são poucos os estudos sobre a utilização de agentes antitumorais na modulação da expressão de proteínas da matriz extracelular, tais como fibronectina e laminina em carcinoma mamário, o padrão de expressão e a utilização dessas proteínas como marcadores na progressão tumoral. Desta forma, acredita-se que a compreensão dos mecanismos envolvidos na degradação dessas proteínas, poderá favorecer o tratamento do câncer, em especial aqueles com potencial metastático, uma vez que a inibição desta degradação poderia ser utilizada como alvo molecular para a ação de quimioterápicos. Além disso, o estudo das proteínas laminina e fibronectina é importante para conhecer o comportamento do tumor, e também para o estudo da interação de agentes quimioterápicos com essas proteínas da MEC. Portanto, neste trabalho serão avaliadas possíveis alterações na expressão e síntese das proteínas laminina e fibronectina induzidas pelo citrato de ródio (II) livre ou associado a nanopartículas magnéticas de maghemita, em camundongos fêmeas portadores de carcinoma mamário.

3. Objetivos

3.1 Geral

Avaliar a expressão e a síntese das proteínas fibronectina e laminina em tecidos de tumor de mama e a toxicidade após os tratamentos com citrato de ródio (II) livre e nanopartículas de maghemita associadas ao citrato de ródio (II) em camundongos BALB/c.

3.2 Específicos

- Avaliar e comparar a expressão das proteínas laminina e fibronectina em tecidos do tumor após o tratamento com Magh-Rh₂(H₂cit)₄, Rh₂(H₂cit)₄ e Magh-Cit em camundongos BALB/c por meio das análises de imunohistoquímica (IHQ).
- Avaliar o efeito antitumoral dos tratamentos com Magh-Rh₂(H₂cit)₄, Rh₂(H₂cit)₄ e Magh-Cit.
- Avaliar a expressão gênica dessas proteínas por meio de reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (RT-qPCR).
- Avaliar uma possível toxicidade induzida pelos tratamentos por meio de análises bioquímicas e hematológicas.
- Avaliar a genotoxicidade dos tratamentos por meio de citometria de fluxo de células da medula óssea.
- Avaliar as características do tumor como o peso, volume e histologia.

4. Materiais e Métodos

Para uma melhor compreensão do delineamento experimental e execução do projeto, o fluxograma abaixo resume a metodologia utilizada no trabalho (**Figura 14**). Da mesma forma, a listagem e os respectivos fabricantes dos materiais utilizados encontram-se descritos na **Tabela 2**.

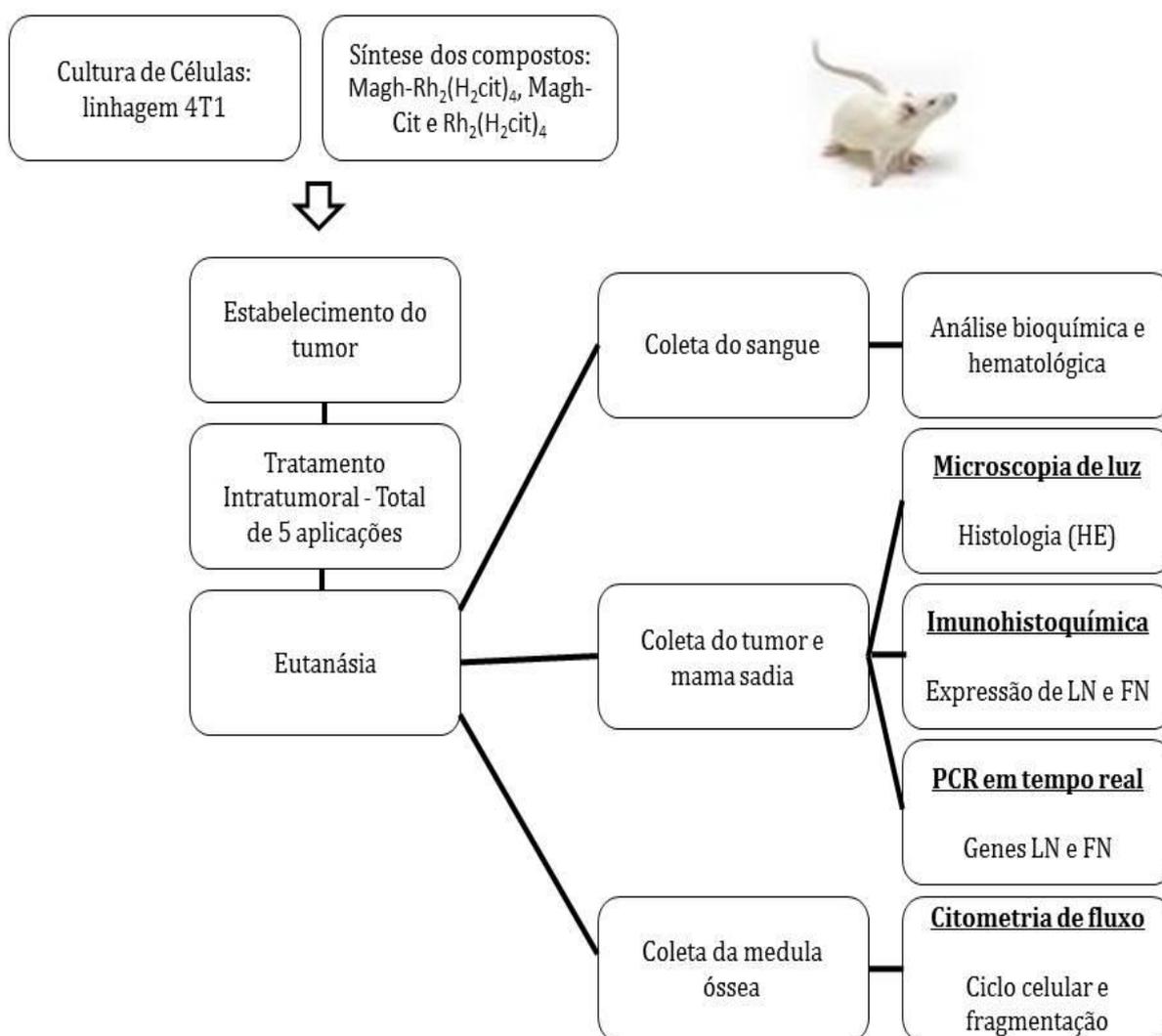


Figura 14 - Desenho esquemático da metodologia utilizada.

Tabela 2 - Materiais utilizados nos experimentos.

Materiais	Fabricante
Anticorpo anti-fibronectina (ab23750)	Abcam, EUA
Anticorpo anti-laminina (ab11575)	Abcam, EUA
Azul de Tripán	Sigma, EUA
Cetamina	Agener União, Brasil
Diaminobenzidina (DAB)	Spring, EUA
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)	Gibco, EUA
Entellan	Merck, Brasil
Eosina	Lafan Química Fina, Brasil
Etanol	J. T. Backer, Brasil
Hematoxilina de Harris	Lafan Química Fina, Brasil
Hematoxilina de Mayer's	Sigma, EUA
Iodeto de Propídeo	Invitrogen, EUA
<i>Kit</i> anticorpo secundário e estreptavidina peroxidase	Diagnostic Biosystem, EUA
<i>Kit</i> pureLink RNA Mini	Life Technology, EUA
<i>Kit</i> HIGH-Capacity cDNA reverse transcription	Applied Biosystems, EUA
<i>Kit</i> DNase, RNase-free	Invitrogen, EUA
<i>Kit</i> SYBR green PCR Master mix	Life Technology, EUA
Oligonucleotídeos (primers)	Life Technology, EUA
Parafina	Vetec, Brasil
Paraformaldeído	Vetec, Brasil
Penicilina	Sigma, EUA
Peróxido de hidrogênio	Vetec, Brasil
Placas (PCR em tempo real)	Applied Biosystem EUA
Soro Fetal Bovino (SFB)	Gibco, EUA
Tampão fosfato salino (PBS)	Laborclin, Brasil
Taq-Polimerase	Invitrogen, EUA
Tripsina	Gibco, EUA
Triton X-100	Merck, Brasil
Xilazina	Agener União, Brasil
Xileno	J. T. Backer, Brasil

4.1. Amostra de citrato de ródio (II) e dos fluidos magnéticos associados

Para a realização de testes antitumorais *in vivo*, o complexo de $\text{Rh}_2(\text{H}_2\text{cit})_4$ e o fluido magnético composto por $\text{Magh-Rh}_2(\text{H}_2\text{cit})_4$ foram sintetizados no Instituto de Química da Universidade Federal de Goiás (UFG) pelo doutorando Matheus Oliveira da Silva sob orientação do professor Dr. Aparecido Ribeiro de Souza.

Foram utilizadas três diferentes composições: (1) amostras de citrato de ródio (II) [$\text{Rh}_2(\text{H}_2\text{cit})_4$], (2) nanopartículas de maghemita funcionalizadas com citrato de ródio (II) [$\text{Magh-Rh}_2(\text{H}_2\text{cit})_4$] e (3) nanopartículas de maghemita [Magh-Cit], como controle das nanopartículas. A caracterização destas nanopartículas foi realizada anteriormente por Peixoto (2012) e Chaves (2013).

Nanopartículas de maghemita associadas ao citrato de ródio (II) [$\text{Magh-Rh}_2(\text{H}_2\text{cit})_4$], apresentaram diâmetro hidrodinâmico médio de $160,8 \pm 0,1$ nm, característica monodispersa com Índice de Polidispersão (PdI) de $0,118 \pm 0,013$ (**Figura 16**) e potencial zeta de superfície de $-57,6$ mV (**Figura 17**), quando diluídas em água deionizada (CHAVES, 2013). A caracterização do diâmetro modal dessas nanopartículas (**Figura 15**) foi realizada em microscopia eletrônica de transmissão (JEOL 1011), observando-se um diâmetro modal de 8,90 nm e diâmetro médio 9,41 nm (PEIXOTO, 2012).

O tamanho da partícula é um parâmetro importante a ser determinado, por ter influência direta na biodistribuição *in vivo*, na toxicidade e na capacidade de atingir o tecido alvo. Além disso, influencia na estabilidade do sistema e na liberação da droga (FALQUEIRO, 2011). A distribuição do tamanho das nanopartículas é analisada levando em conta o PdI. O cálculo do PdI leva em consideração o tamanho médio das partículas, o índice de refração do solvente, o ângulo de medição e a variância da distribuição. Em uma escala de 0 a 1, um PdI próximo a 0,1 está associado a uma alta homogeneidade na população de partículas, enquanto valores de PdI elevados sugerem uma ampla distribuição de tamanho ou mesmo várias populações (GAUMET *et al.*, 2008). O PdI encontrado nos resultados aqui apresentados indicam uma formulação uniforme, tamanho e diâmetro controlado, características que são de grande importância para o uso em aplicações biomédicas.

O método de análise de medição do tamanho das partículas avalia o raio hidrodinâmico das mesmas, sendo que pode estar avaliando também a presença de possíveis agregados de nanopartículas, consequentemente resultando em um aumento

do tamanho das formulações (KULKAMP *et al.*, 2009). A confirmação da presença dos agregados foi possível de ser observada nos resultados de microscopia eletrônica de transmissão. Para verificar a estabilidade eletrostática da solução e considerá-la estável são utilizados como referência os valores de Potencial Zeta superiores a +30 mV, ou inferiores a -30 mV, os valores obtidos demonstram a estabilidade das partículas utilizadas (KOCBEK *et al.*, 2013).

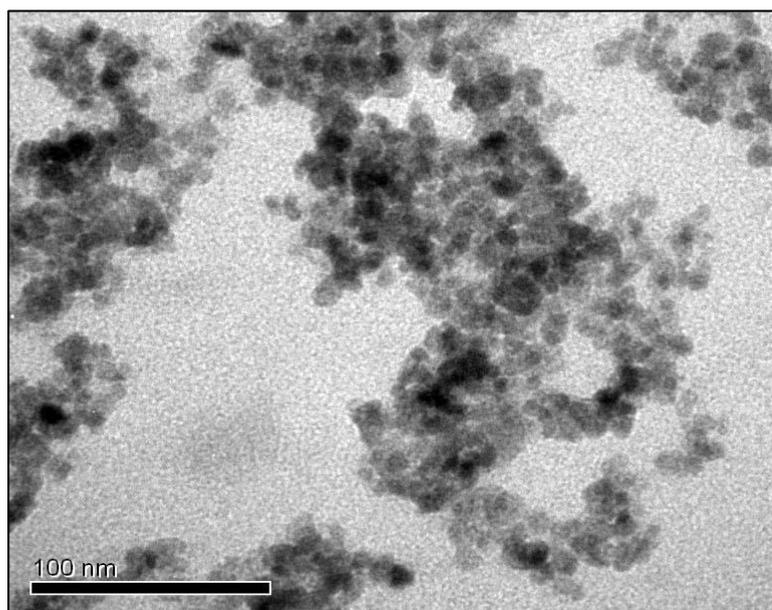


Figura 15 – Aglomerado de nanopartículas de Magh-Rh₂(H₂cit)₄ visualizadas por microscopia eletrônica de transmissão (MET), apresentando morfologia esférica. PEIXOTO (2012).

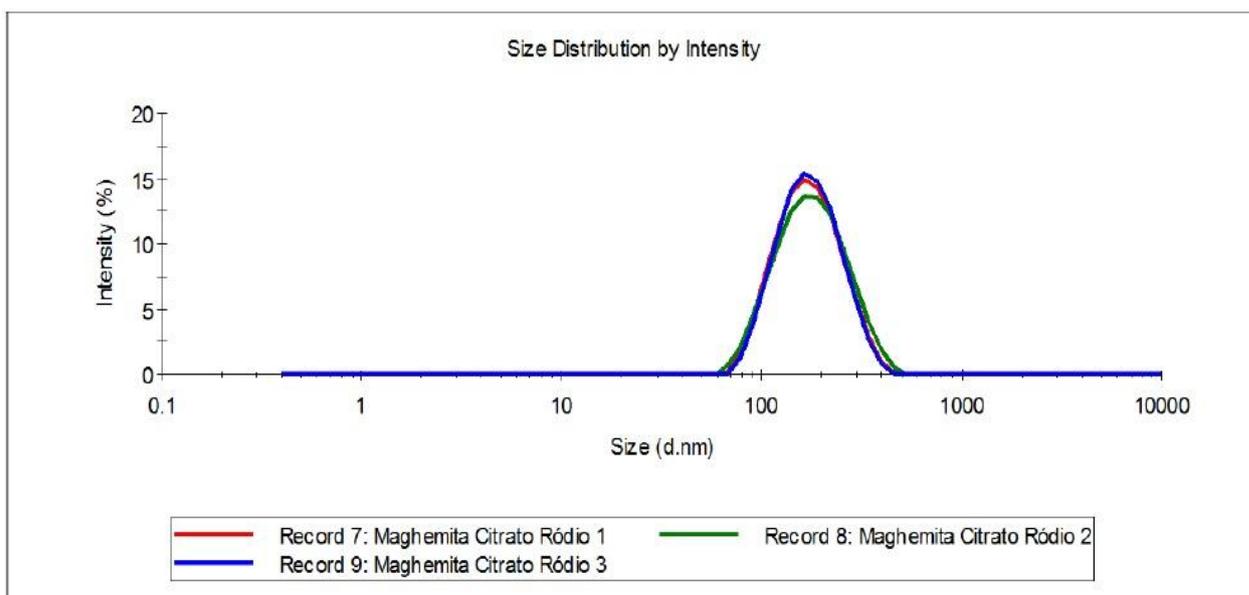


Figura 16 – Dados do diâmetro hidrodinâmico das partículas Magh-Rh₂(H₂cit)₄. Apresentaram diâmetro hidrodinâmico médio de 160,8 nm. O experimento foi realizado em triplicata (cada uma delas representadas pelas cores em vermelho, verde e azul) CHAVES (2013).

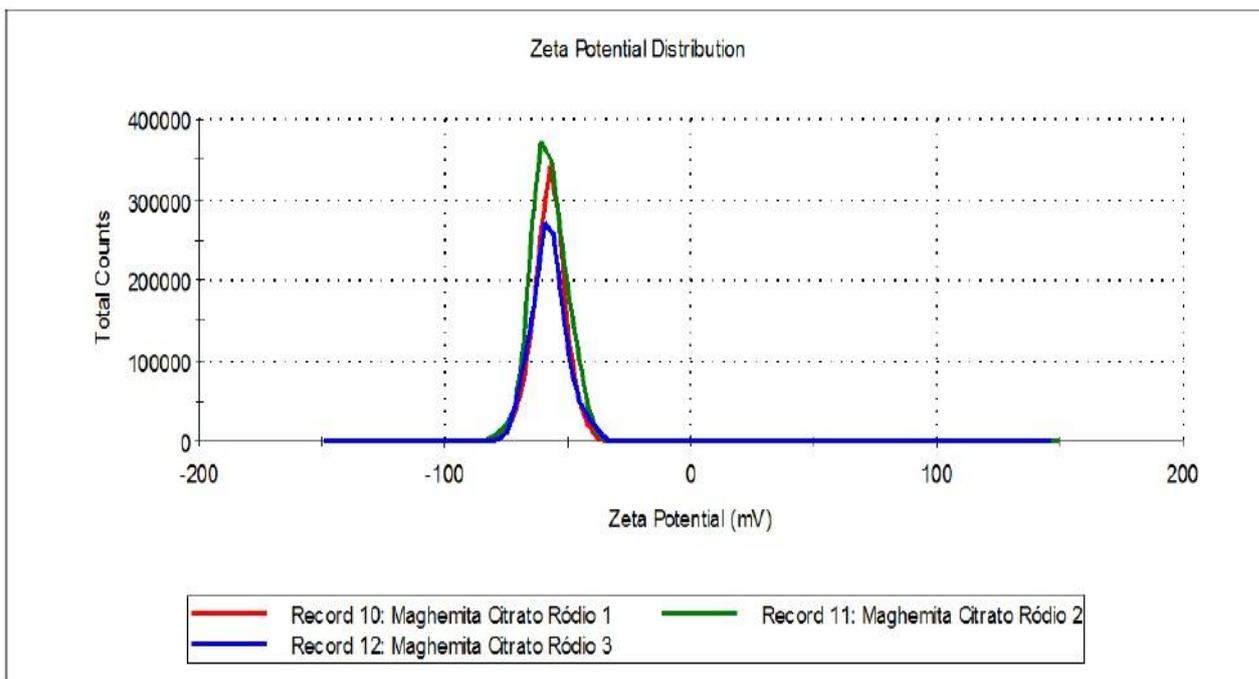


Figura 17 – Dados do potencial zeta das nanopartículas de Magh-Rh₂(H₂cit)₄. As nanopartículas tem a carga de superfície negativa com potencial zeta de - 57, 6 mV. O experimento foi realizado em triplicata (cada uma delas representadas pelas cores em vermelho, verde e azul) CHAVES (2013).

4.2. Cultura Celular

As células de linhagem de carcinoma mamário murino 4T1, foram cultivadas em meio de cultura DMEM suplementado com 1% de penicilina e 10% de soro fetal bovino (SFB) em estufa à 37°C com 5% de CO₂. Eram feitos repiques para a manutenção das células quando estas atingiam confluência.

As células foram desprendidas da garrafa por ação de 0,25% de tripsina-EDTA mantida no meio por 3 minutos, a 37°C. A tripsina foi neutralizada com DEMEM e descartada após centrifugação. O meio de cultura foi repostado e as células foram mantidas até atingirem um número suficiente para os experimentos *in vivo*. Para estabelecer o número de células viáveis utilizou-se o método de exclusão por azul de Tripán, e a contagem foi realizada em câmara de Neubauer para estimar a quantidade celular desejada. Os procedimentos de descongelamento, substituição de meio e repique foram realizados em fluxo laminar previamente esterilizado juntamente com os demais materiais utilizados no cultivo celular.

4.3. Animais

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade de Brasília, registrado com UnBDOC nº 329781/2013 (Anexo).

Foram obtidos 30 camundongos fêmeas, com 12 semanas de idade, isogênicos da linhagem BALB/c (*Mus musculus*) do Centro de criação de animais de laboratório da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), Rio de Janeiro, Brasil. Todos os animais foram atestados pelo Laboratório de Controle de Qualidade Animal e apresentavam-se saudáveis. Os animais foram mantidos no Biotério do Instituto de Ciências Biológicas do Laboratório de Genética e Morfologia da Universidade de Brasília (GEM-IB-UnB), com temperatura controlada (23°C), água e ração *ad libitum* e ciclo claro/escuro de 12 horas.

4.4. Inoculação de células tumorais

Antes do transplante de células tumorais, os animais foram anestesiados, via intraperitoneal, com solução de cetamina/xilazina (doses aproximadas de 75/kg e 5 mg/kg, respectivamente), pesados e então foi realizada a inoculação com 2×10^4 células 4T1 por meio de suspensão contendo 50 μ L de meio DMEM sem SFB, na 9ª glândula mamária abdominal esquerda.

4.5. Tratamento

Os animais foram tratados com $Rh_2(H_2cit)_4$, Magh- $Rh_2(H_2cit)_4$ e Magh-Cit, em doses preparadas de acordo com a massa corporal de cada camundongo, resultando em concentrações de miligramas de citrato de ródio e de ferro por quilograma de massa corporal iguais.

Estes compostos foram utilizados com as concentrações definidas de ródio e de ferro em cada uma das cinco aplicações administradas como descrito na **Tabela 3**.

Tabela 3 – Concentrações de citrato de ródio e de ferro utilizadas durante o experimento.

	Rh₂Cit (mg/kg)	Magh-Rh₂(H₂cit)₄ (mg/kg)	Magh-Cit (mg/kg)
[Rh₂]	8,0	8,0	-----
[Fe]	-----	216,0	216,0

Após quatorze dias do transplante de células tumorais os animais foram pesados e distribuídos aleatoriamente em cinco grupos experimentais com seis camundongos cada: (1) controle com tumor tratado com salina fisiológica 0,9% [solvente do citrato de ródio (II)]; (2) animais tratados com ródio livre Rh₂(H₂cit)₄ (8 mg/kg); (3) animais tratados com nanopartículas de maghemita associada ao citrato de ródio [Magh-Rh₂(H₂cit)₄] (8 mg/kg de citrato de ródio e 216 mg/kg de ferro); (4) animais tratados com maghemita livre Magh-Cit (216 mg/kg de ferro); (5) animais sem transplante de células tumorais e submetidos a injeção contendo salina fisiológica 0,9% (sadios), que foram mantidos sob as mesmas condições experimentais de alojamento e alimentação.

Em seguida, foram preparadas as soluções de tratamento e estas soluções foram administradas via intratumoral por meio de injeção contendo 50 µL na penúltima mama esquerda a cada dois dias, totalizando cinco aplicações.

4.6. Coleta de material biológico dos camundongos

No 24º dia após o transplante de células tumorais (um dia após o último tratamento), os camundongos foram anestesiados, pesados, submetidos à coleta de sangue e após a eutanásia dos animais, foram coletados os tumores e a mama para diversas análises, conforme os itens a seguir.

4.6.1. Coleta de amostras para análises hematológicas e bioquímicas

Por meio de punção cardíaca foi retirado sangue dos camundongos (aproximadamente 1000 µL) com o auxílio de seringas descartáveis de 1 mL. O volume sanguíneo foi, então, separado em minitubos para análise hematológica, com anticoagulante EDTA (ácido etilenodiaminotetracético bipotássico, 10%), e cuidadosamente homogeneizado por inversão logo após a coleta e, em seguida, foi mantido a 4°C, centrifugado a 1.150 g por 10 minutos a 4 °C. As amostras foram submetidas à leitura em hematocitômetro automático (pocH-100iV Diff, Sysmex, Brasil). Os parâmetros avaliados foram: (1) leucograma (leucócitos totais - WBC, número de linfócitos, neutrófilos, monócitos e eosinófilos); (2) eritograma (número de hemácias – RBC, hemoglobina - HGB, hematócrito - HCT, volume corpuscular médio - VCM, hemoglobina corpuscular – HCM e concentração de hemoglobina corpuscular média - CHCM); e (3) plaquetograma (número de plaquetas – PLT e volume plaquetário médio – VPM).

Para a análise bioquímica, o sangue coletado foi colocado em um tubo com gel separador de soro sanguíneo. Pelo método cinético otimizado U.V. as amostras foram analisadas avaliando os níveis de transaminase pirúvica (TGP). O método Jaffe foi utilizado para a dosagem de creatinina, avaliados como indicadores de disfunção renal. Os procedimentos foram realizados com reagentes da marca Siemens conforme orientações do fabricante, e as dosagens realizadas em instrumento Advia 2400, Siemens, Alemanha.

Os resultados dos animais sadios foram utilizados como valores de referência, por esse grupo ser composto por animais submetidos às mesmas condições ambientais. Os testes bioquímicos e o hemograma foram realizados pelo Laboratório clínico Sabin, que contribuiu em parceria com o presente projeto.

4.6.2. Coleta do tumor e mama

Encerrado o período de tratamento, os camundongos foram anestesiados, via intraperitoneal, com solução de cetamina/xilazina (doses aproximadas de 75/kg e 5 mg/kg, respectivamente) e eutanasiados por deslocamento cervical. O tumor e a mama saudável (do grupo controle sadio) foram coletados, mensurados e fotografados. Além disso, foram feitas secções do tumor e da mama saudável em fragmentos para a análise em microscopia ótica e para a RTq-PCR.

Os tumores foram mensurados com paquímetro milimetrado para obtenção dos parâmetros de comprimento, largura e espessura e o volume tumoral foi calculado utilizando a fórmula:

$$\frac{\text{Comprimento} \times \text{largura}^2}{2}$$

As amostras do tumor e da mama saudável, seccionadas passaram por fixação à temperatura ambiente, utilizando solução de paraformaldeído (4%, diluído em PBS) por 4 horas. O material fixado foi armazenado a 4°C em solução de álcool etílico 70% até posterior processamento histológico. As amostras para a RT-qPCR foram congeladas à -80°C.

4.6.3. Coleta da medula óssea

A medula óssea foi coletada dos fêmures dos camundongos. Para isso, as epífises foram seccionadas e as células da medula foram depositadas em tubos falcon mediante a inserção de 1 mL de SFB no fêmur, utilizando uma agulha acoplada a uma seringa. Posteriormente, o material contendo células da medula foi centrifugado a 800 g por 3 minutos a 8°C, fixadas em etanol 70% a 8°C e armazenadas a 4°C.

4.7. Análise da expressão dos genes *Fibronectina* e *Laminina*

4.7.1. Extração e quantificação de RNA

A técnica reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (RT-qPCR) foi utilizada neste trabalho com o objetivo de verificar os efeitos dos tratamentos com as nanopartículas de maghemita livre e associadas ao citrato de ródio (II) na expressão dos genes *Laminina* e *Fibronectina*.

A extração dos RNAs dos tecidos de tumor e mama normal foi realizada com a utilização de *Kit* de extração conforme as instruções do fabricante. Os tecidos foram macerados com o auxílio do *Pellet pestles* (Z3 5997 - Cordless motor, Sigma - EUA) em 500 µL de tampão de lise (*Kit*). Em seguida, foram adicionados 100 µL de etanol 100% e o conteúdo obtido foi transferido para uma coluna de purificação. Os ácidos nucleicos foram coletados e ressuspensos em 20µL de água ultrapura. A quantificação

de RNA obtido para avaliação do rendimento foi feita por espectrofotometria (NanoVue Plus – GE Healthcare, Reino Unido). As amostras com valores considerados aceitáveis (razões 260/280 nm > 2,00) foram utilizadas na RT-qPCR.

Para a eliminação de qualquer traço residual de DNA genômico das amostras foi utilizado um *Kit* DNase I livre de RNase. Desta forma, a reação foi feita a 37°C, utilizando 6 µL dos ácidos nucleicos, 1 µL de tampão MgCl₂ 10X, 1 µL de DNase I livre de RNase e 2 µL de água livre de RNase. Após 30 minutos, a reação foi interrompida pela adição de 1 µL de tampão de parada (EDTA 50 mM) e incubação a 65°C por dez minutos.

A integridade do RNA foi verificada por eletroforese em gel de agarose desnaturante 1% em condições livre de RNase, onde foram avaliadas as regiões 18S e 28S do RNA ribossomal. Esta verificação permite inferir a integridade do RNA purificado, se este for íntegro ele pode ser utilizado para análise de expressão gênica. Conforme exemplificado na **figura 18**.

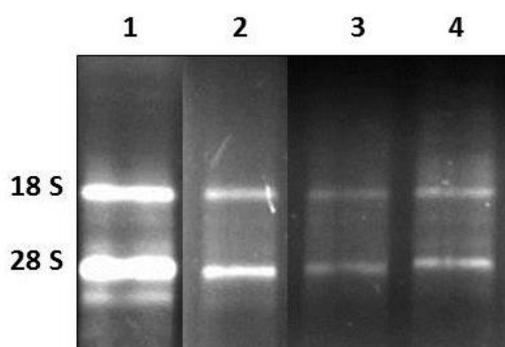


Figura 18 - Imagem ilustrativa do perfil eletroforético em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídio (0,5 µg/mL) do RNA total extraído das amostras de tecido tumoral e da mama normal. (bandas referentes às regiões 18S e 28S do RNA ribossomal). Amostras: (1) Controle mama normal; (2) Magh-Rh₂(H₂cit)₄; (3) Magh-Cit; (4) Controle com tumor (salina). Imagem capturada em Gel Doc Ez Imager (Bio-rad, EUA).

4.7.2. Síntese do DNA complementar

Para a síntese do DNA complementar, cDNA, 1 µL de RNA total já tratado com a enzima DNase I foi utilizado para cada reação. Foi adicionado 1 µL de iniciador oligonucleotídeo e 5 µL de água ultrapura. A solução foi incubada a 65°C por dez minutos e logo em seguida, colocada no gelo. Após um minuto, foram adicionados 4 µL do mix da reação 5x (tampão, dNTPs, oligo (dT) e os primers), 1 µL da enzima transcriptase reversa e 1 µL de inibidor RNaseOUT[®] incubado a 50°C por 60 minutos, em seguida, mantida a 70°C por 15 minutos para desnaturação da enzima transcriptase

reversa e conseqüentemente finalizando a reação. O cDNA produzido foi estocado a -20 °C.

4.7.3. Desenho dos *primers*

Com a descrição das seqüências referentes às regiões específicas dos genes Fibronectina e Laminina, foram desenhados oligonucleotídeos usando o programa Primer 3 Plus (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>). Os parâmetros utilizados para a construção dos *primers* estão listados na **Tabela 4**.

Tabela 4 – Distribuição dos limites mínimos e máximos para a construção dos oligonucleotídeos segundo o parâmetro.

Parâmetro	Limite mínimo	Limite máximo
Temperatura de anelamento	58°C	62°C
Conteúdo de GC no oligonucleotídeo	20%	80%
Tamanho do Oligonucleotídeo	18 bases	27 bases
Temperatura do <i>amplicon</i>	75°C	85°C
Tamanho do <i>amplicon</i>	80 bases	120 bases

*GC = Bases Guanina (G) e Citosina (C).

Após selecionar os pares de oligonucleotídeos que atendiam a essas condições, foi utilizado o programa *Oligo Analyzer da Integrated DNA Technologies* (IDT), disponível online (<http://www.idtdna.com/analyzer/applications/oligoanalyzer>) para verificar a formação de dímeros, dobramento (*hairpin*) e força de ligação entre os nucleotídeos.

4.7.4. Validação dos *primers* por meio de PCR qualitativo

A validação dos *primers* utilizados foi feita por meio de PCR convencional (qualitativo), com o objetivo de verificar se estariam amplificando eficientemente a região genômica desejada da amostra e não regiões inespecíficas, antes do início dos testes em RT-qPCR. Conforme a **figura 19**, os *primers* dos genes de interesse deste estudo amplificaram nas regiões específicas (100 pb). O material utilizado foi DNA extraído da mama de camundongos saudável.

As condições de termociclagem foram 50°C por 2 minutos, 95°C por 2 minutos e 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 15 segundos, seguida de 60°C por 30 segundos, para o anelamento dos oligonucleotídeos e 72°C por 30 segundos para a extensão dos fragmentos, utilizando termociclador (Arktik termo Scientific, EUA).

Foram utilizados 2,5µL de tampão 10x (10mM de Tris e 50mM de KCl), 0,7 µL de MgCl₂, 1,5 µL de dNTPs (2,5mM), 0,5 µL de Taq-Polimerase (5U/µL), 1,5µL de oligonucleotídeos senso e antisenso (10µM), completando com água Milli-Q para um volume final de 25 µL por reação.

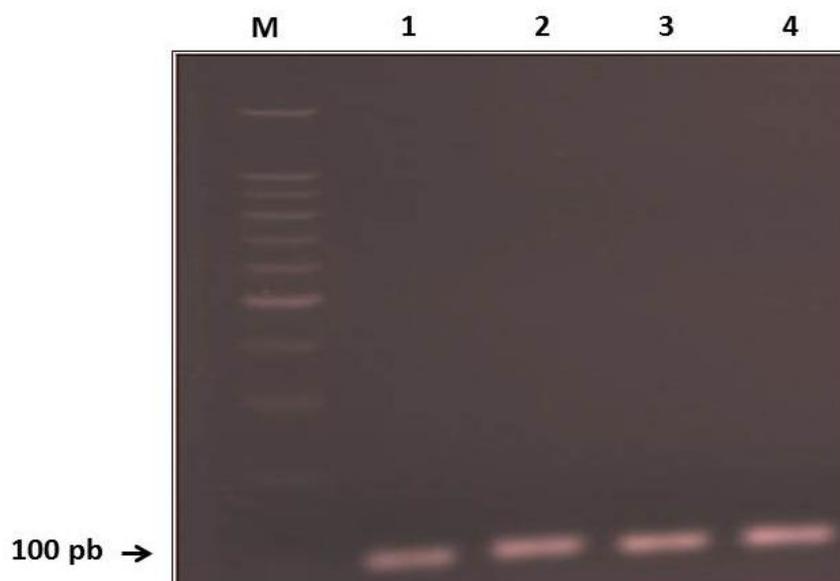


Figura 19 - Amplificação dos *primers* dos genes *Laminina*, e *Fibronectina*. Os tamanhos de fragmentos são 100 pb. O marcador (M) usado é de 100 pb. *Primers*: (1) Fibronectina 1 F/R; (2) Fibronectina 2 F/R; (3) Laminina 1 F/R; (4) Laminina 2 F/R. F: Forward (Senso); R: Reverse (antisenso).

4.7.5. Reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real

A PCR em tempo real foi realizada para os genes *Fibronectina*, *Laminina* e *RPS9* (ribossomal) como controle interno, utilizando o sistema de detecção por SYBR-Green, uma molécula fluorescente que se intercala à dupla fita de DNA. Os ensaios de amplificação foram realizados em reações de 10 µL contendo 2 µL de cada oligonucleotídeo, 5 µL de solução completa para PCR contendo SYBR-Green e 1 µL do cDNA sintetizado na reação descrita acima. O experimento foi realizado em triplicata para cada amostra. As condições de ciclagem foram: 10 minutos a 95°C (1 ciclo), 15 segundos a 95°C, seguido por 1 minuto a 60°C (45 ciclos). Foi feita, também, a curva de *Melting* nas seguintes condições: 10 segundos a 95°C, seguido por 1 minuto a 60°C e 90°C com a coleta contínua de dados (1 ciclo) para a observação da formação de dímeros de *primers* e amplificação não específica.

As sequências dos *primers* de interesse são as sequências descritas na **Tabela 5**. Nas análises de quantificação relativa por reações de RT-qPCR é necessário utilizar um gene normalizador, que deve ser constitutivo e não variar diante das condições experimentais. Neste trabalho os transcritos de *RPS9* foram utilizados como controle endógeno para normalização da quantidade do RNA total presente em cada reação. Os conjuntos de *primers* (senso e antisenso) apresentam as características necessárias para a utilização no equipamento Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR system.

Tabela 5 – Sequência dos oligonucleotídeos utilizados para a amplificação do mRNA relativo aos genes *Fibronectina*, *Laminina* e *RPS9*.

Gene	Senso	Anti-senso
<i>Laminina</i>	TGTCTGCGTCATGTGATGAG	TCGCCATGTAGAACAGAACG
<i>Fibronectina</i>	GCAGAGGCATAAGGTTCGGG	CAGGAGCAAATGGCACCGAG
<i>RPS9</i>	CTATTCACCATGCCCGTCTG	GAGAGTCCAGGCGAACAATG

4.8. Microscopia ótica

Os tecidos da mama e tumor foram fixados em paraformaldeído (4%) com tampão fosfato (0,1 M, pH 7,4), desidratados em uma série de concentrações crescentes de álcool etílico. Em seguida, foram diafanizadas em xileno, incluídos em parafina e

emblocados em formas de metal. O processamento foi feito utilizando um histotécnico (Metalúrgica Oma DM-40, Brasil).

Os cortes histológicos (5 µm) dos tumores e da mama foram realizados em micrótomo Leica (RM 2235, Alemanha). As secções foram distendidas, previamente, em álcool 30% e, depois, em banho-maria a 40°C, para serem coletadas com lâminas de vidro. Estas foram mantidas, overnight, em estufa a 37°C.

Para coloração, os cortes histológicos foram desparafinizados e reidratados durante três minutos em xileno 100% e em concentrações decrescentes de etanol, respectivamente. Em seguida, foram corados com hematoxilina e eosina por 60 e 120 segundos respectivamente. A desidratação foi feita com soluções crescentes de etanol e xileno 100% (60 segundos cada banho), as lâminas foram recobertas por lamínulas, utilizando-se Entellan® como meio de montagem, e secadas em estufa (37°C) por 12 horas. As lâminas foram fotografadas com câmera fotográfica (MC 80 DX) acoplada ao microscópio de luz modelo Zeiss (Axiophot, Alemanha).

4.9. Imunohistoquímica

As amostras de mama e tumor foram fixadas em paraformaldeído a 4% em 0,1 M de PBS e processadas para inclusão em parafina. Foram feitos cortes de 3 µm de espessura e coletados em lâminas de vidro previamente silanizadas (solução de organossilano a 2%), com o objetivo que os cortes histológicos permanecessem aderidos à lâmina durante o processo imunohistoquímico. Os cortes histológicos foram submetidos à desparafinização em xileno, seguida de hidratação em concentrações decrescentes de etanol (100% a 70%). A recuperação antigênica foi realizado com tampão citrato (0,21 g/L de ácido cítrico, pH: 6) em panela de pressão por 20 minutos, iniciando a contagem de tempo após o momento em que a panela atingiu a pressão. O bloqueio das peroxidases endógenas foi realizado com peróxido de hidrogênio a 3% em duas incubações, sendo cada uma por 15 minutos à temperatura ambiente. O bloqueio das ligações inespecíficas foi realizado com leite em pó a 3% em PBS por 30 minutos à temperatura ambiente. As lâminas foram incubadas com o anticorpo primário policlonal anti-laminina ou anti-fibronectina diluído 1:50 em BSA a 3% overnight (12 horas) a 4°C. As secções foram então incubadas com anticorpo secundário biotilado conjugado com estreptavidina-peroxidase por 30 minutos à temperatura ambiente. A revelação foi realizada por meio da incubação com o cromógeno diaminobenzidina (DAB) por 10

segundos e lavadas com PBS. As lâminas foram então contracoradas com hematoxilina de Mayer's, desidratadas e montadas com Entellan®.

Foi utilizado como controle positivo amostras de pele de camundongo. Em cada experimento realizado, foi utilizado um controle negativo, com omissão do anticorpo primário, o qual foi substituído por BSA a 3%. Somente as regiões coradas em marrom foram consideradas positivas. Foram fotografados dez campos por animal em um microscópio de luz (Leica MD 2000, Wetzlar, Alemanha) nos aumentos de 200x e 400x.

Para avaliação da expressão das proteínas fibronectina e laminina no tecido tumoral dos camundongos submetidos aos diferentes tratamentos descritos, foi utilizada a metodologia empregada por Marsden *et al.* (2012), com algumas modificações. Fotomicrografias de dez campos microscópicos (aumento de 200x) representativos de cada amostra de tecido tumoral foram utilizadas para a obtenção dos valores percentuais de células positivamente marcadas quanto à presença das referidas proteínas. Para este propósito, o total de células em cada imagem foi obtido com o uso do software ImageJ (Rasband, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, EUA) para contagem de células coradas com hematoxilina, por meio do seu comando para contagem de partículas. Em seguida, o mesmo procedimento foi realizado com células marcadas com DAB após a execução do comando de decomposição de cores, sendo então calculada a razão percentual de células imunorreativas (**Figura 20**). A mensuração dos níveis de fibronectina e laminina presentes na matriz extracelular também foi realizada nestas mesmas imagens por meio de algoritmos de decomposição de cores, sendo os resultados expressos como área percentual da imunomarcção.

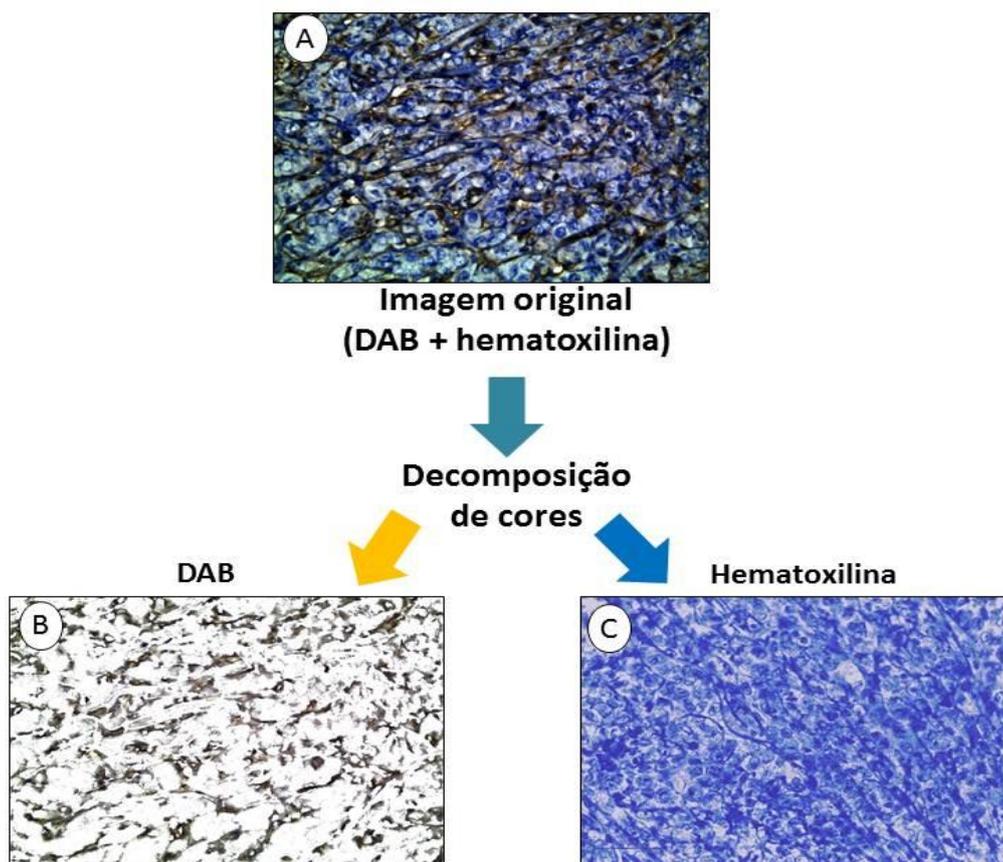


Figura 20 – Representação do método de decomposição de cores. Com o software *ImageJ* foi realizada a separação da imagem original (A), corresponde a coloração com DAB (B) e contracoloração com Hematoxilina (C).

Parâmetros que consideram a intensidade da marcação, comumente utilizados neste tipo de quantificação imunohistoquímica, mas de forma subjetiva, não foram contemplados pelo fato de que ao cromógeno utilizado (DAB) não se aplica a Lei de Lambert-Beer sobre a absorção de luz. Este postulado rege que a densidade óptica (logaritmo da intensidade) é proporcional à concentração do corante (e, assim, também à concentração da molécula-alvo imunomarcada) no tecido. Todavia, DAB não apresenta a propriedade de absorção de luz, mas atua como um espalhador de ondas luminosas (TAYLOR & LEVENSON, 2006). Além disso, as avaliações de intensidade são comumente subjetivas, imprecisas e pouco reprodutíveis. Esta questão nos conduziu ainda à opção pela quantificação assistida por computador.

4.10. Avaliação genotóxica de células da medula óssea por fragmentação de DNA e ciclo celular.

A avaliação do ciclo celular foi feita pela quantificação do DNA total. As células da medula óssea foram coletadas para avaliar o perfil do ciclo celular e a fragmentação de DNA, que são indicadores de toxicidade hematopoiética, sendo uma avaliação complementar ao hemograma.

As células obtidas da medula óssea foram fixadas com etanol 70% a 4°C e armazenadas a -20°C. Um volume de 75 µL de células foi centrifugado (800 g por 3 minutos a 8°C) o sobrenadante foi descartado e as células foram lavadas com 500 µL de PBS, para remoção do etanol. Logo, as células foram incubadas com 200 µL de solução de permeabilização contendo 0,1% de citrato de sódio, 0,1% de Triton X-100 e 20 µg/mL de iodeto de propídio e RNase, por 30 minutos em temperatura ambiente e na ausência de luz.

As análises de fragmentação de DNA e a identificação das fases do ciclo celular foram feitas em citômetro de fluxo da BD FACSVerse (BD Biosciences, Inc, Ashland, OR, EUA) no canal de fluorescência vermelha FL-2 (sensível a detecções na faixa de 560 a 580 nm). Os dados obtidos foram analisados com o programa FlowJo v.5.2.7 (Tree Star, Inc). O cálculo da proporção de células em cada uma das fases do ciclo celular foi obtido considerando apenas as células com DNA não fragmentado. Somente as células que apresentaram conteúdo de DNA entre 2n e 4n foram consideradas na análise do ciclo celular. O DNA fragmentado foi identificado na população sub-G1 e calculado considerando a totalidade de eventos. Os histogramas gerados para representar os dados foram obtidos pelo programa GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, Inc).

4.11. Análises estatísticas

Os dados estão apresentados pela média \pm EPM (erro padrão da média) e os valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. Dados com distribuição normal, como o peso dos animais, foram comparados por ANOVA para avaliar diferenças entre os grupos. Nos dados sem distribuição normal (volume tumoral, quantidade de creatinina, quantidade de hemácias, HGB, hematócrito, HCM, VPM e leucograma completo), utilizou-se o teste de Kruskal-Wallis a fim de identificar diferença

estatística. Para resultados significantes de ANOVA e de Kruskal-Wallis, foram usados, respectivamente, o pós-teste de Bonferroni e o teste de Dunn para verificar as diferenças entre os tratamentos (comparações 2 a 2). As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa GraphPad Prism 5.0.

5. Resultados

5.1. Análises clínicas

Durante o tratamento dos camundongos com $\text{Rh}_2(\text{H}_2\text{cit})_4$, $\text{Magh-Rh}_2(\text{H}_2\text{cit})_4$ e Magh-Cit foram realizadas cinco aplicações via intratumoral a cada dois dias e houve 100% de sobrevida em todos os grupos experimentais. Não foram observadas alterações comportamentais e clínicas como diarreia, queda de pelos e atividade motora reduzida ao longo de todo o experimento, em todos os grupos estudados.

5.1.1. Avaliação do peso dos camundongos

O peso dos animais foi registrado antes do dia de transplante de células tumorais, durante os tratamentos e no dia da eutanásia. Antes de dar início ao tratamento (dia 0), o peso dos animais era, em média, $21,9 \pm 1,15$ g. Ao final do tratamento (dia 25) houve um ganho de peso dos animais sendo, este em média, $24,5 \pm 1,21$ g. Não foram constatadas mudanças significativas no peso corpóreo dos animais ao longo dos tratamentos, mostrando que não houve influência dos mesmos no crescimento dos camundongos (**Figura 21**).

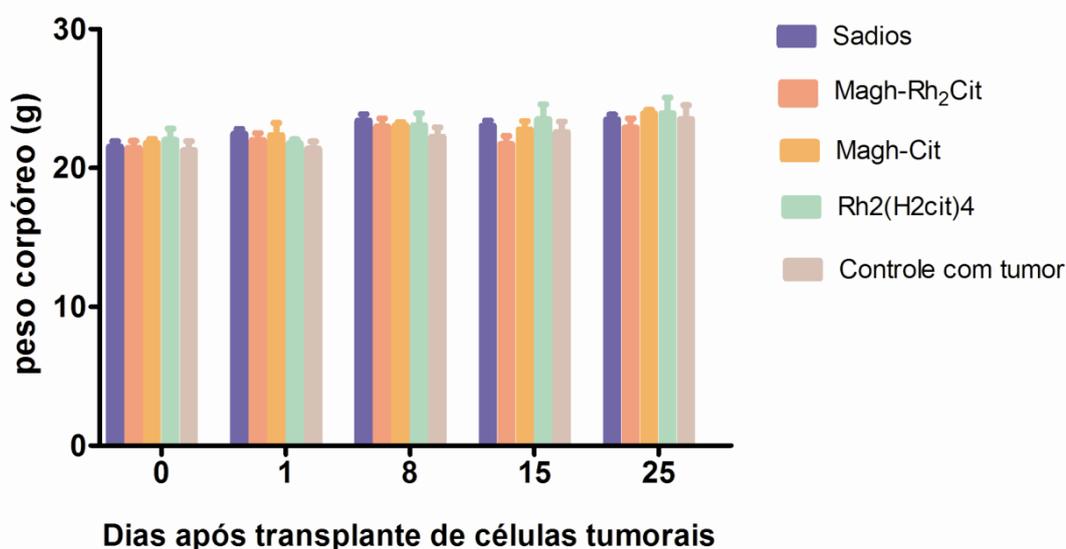


Figura 21 - Peso corpóreo dos camundongos ao longo do experimento. Os animais foram pesados antes do implante de células tumorais (dia 0), no decorrer dos tratamentos, uma vez por semana (dias 1, 8 e 15) e no dia da eutanásia (dia 25).

5.1.2. Mensuração do tumor

Ainda que não significativa, foi observada uma leve diminuição no volume dos tumores dos animais tratados com Magh-Rh₂(H₂cit)₄, em relação aos outros grupos estudados (Figura 22).

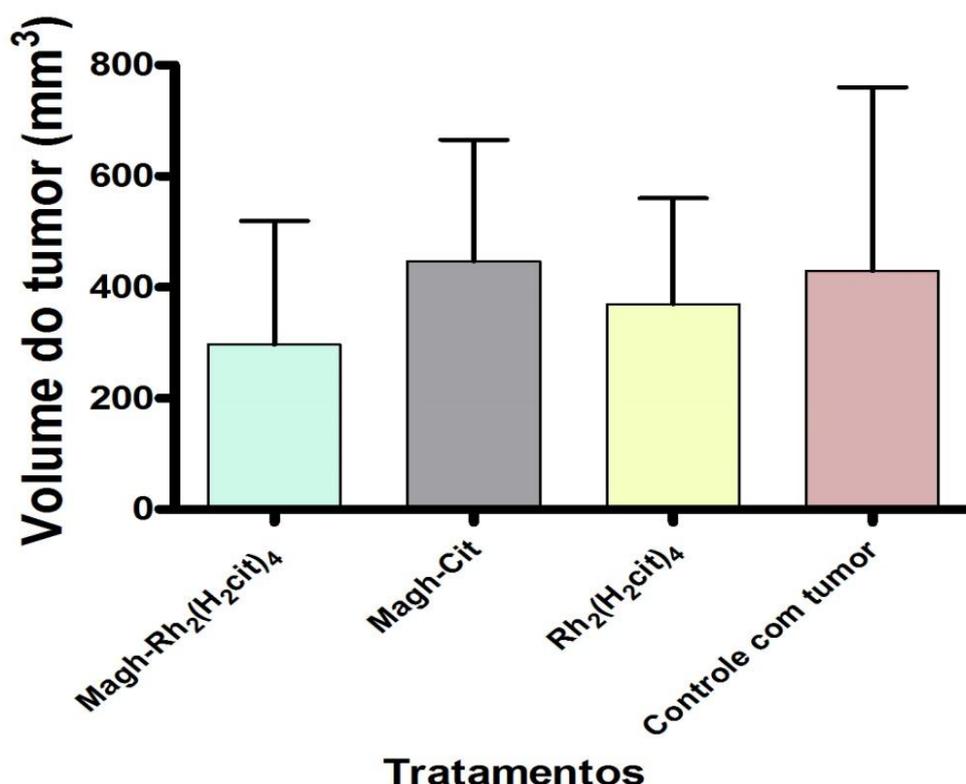


Figura 22 - Efeito dos tratamentos sobre o volume do tumor. O tratamento com Magh-Rh₂(H₂cit)₄ (216 mg de ferro por kg de peso corpóreo e 8 mg de ródio por kg de peso corpóreo) mostrou uma redução do tumor de mama em relação ao grupo controle (salina), porém, esta diferença não foi estatisticamente significativa. Valores correspondem a média ± erro padrão n = 6.

Todos os animais em que as células tumorais 4T1 foram implantadas desenvolveram tumor na mama. Os tumores apresentaram formato irregular, tamanhos variados, estrutura consistente e vascularizada. A figura 23 apresenta imagens ilustrativas dos tumores em cada um dos grupos experimentais. As figuras 23 A e 23 C mostraram camundongos portadores de carcinoma mamário do grupo controle com tumor sem tratamento e do grupo tratado com Rh₂(H₂cit)₄, respectivamente. Na figura 23 (B e D) é possível visualizar o acúmulo de nanopartículas de maghemita na região do

tumor, uma vez que a administração foi realizada por via intratumoral. O tamanho dos tumores do grupo tratado com Magh-Rh₂(H₂cit)₄ (Figura 23 D) era visualmente menor em comparação com o grupo controle, porém esta diferença não foi estatisticamente significativa.

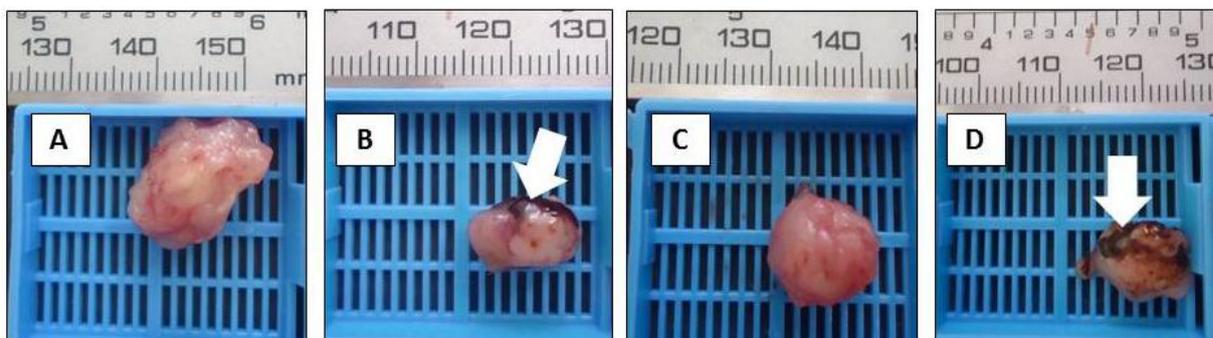


Figura 23 - Fotografia dos tumores de carcinoma mamários dos diferentes grupos experimentais. A) Controle (salina), B) Animais tratados com Magh-Cit, C) Animais tratados com Rh₂(H₂cit)₄ e D) animais tratados com Magh-Rh₂(H₂cit)₄. (216 mg de ferro por kg de peso corpóreo e 8 mg de ródio por kg de peso corpóreo). Em B e D é possível observar algumas regiões do tumor com uma coloração marrom possivelmente indicando a presença das nanopartículas de maghemita (setas).

A massa do tumor foi mensurada, destacou-se um maior peso tumoral dos animais tratados com Magh-Cit, que pode ter sido ocasionado pela presença de um edema inflamatório, porém, não foi observada diferença significativa quando comparando com o grupo controle. O tratamento com Magh-Rh₂(H₂cit)₄, revelou uma diminuição do peso da massa tumoral em relação aos grupos tratados somente com o citrato de ródio ou maghemita, ainda que estas diferenças não tenham sido significativas (**Figura 24**).

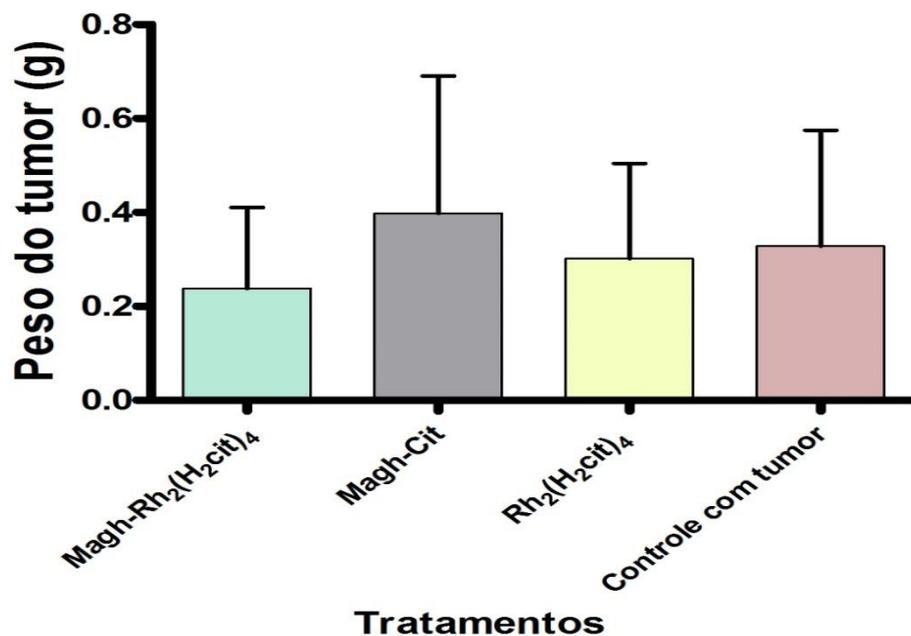


Figura 24 - Efeito dos tratamentos sobre o peso do tumor. O tumor foi mensurado após a eutanásia dos animais. Não houve diferença significativa no peso tumoral dos grupos tratados em relação ao grupo controle (salina). Animais tratados Magh-Cit, Rh₂(H₂cit)₄, e Magh-Rh₂(H₂cit)₄ (216 mg de ferro por kg de peso corpóreo e 8 mg de ródio por kg de peso corpóreo). Valores correspondem a média ± erro padrão, n = 6.

5.2. Análises hematológicas e bioquímicas

5.2.1. Testes hematológicos

Os resultados obtidos nas análises do eritrograma dos camundongos estão apresentados na **Tabela 6**.

Os tratamentos com Rh₂(H₂cit)₄, Magh-Rh₂(H₂cit)₄ e Magh-Cit não causaram alterações significativas em relação aos animais controle (sadio) e aos animais controle portadores de tumor (salina).

Tabela 6 - Eritrograma de camundongos BALB/c fêmeas portadores de carcinoma mamário tratados via intratumoral com Rh₂(H₂cit)₄, Magh-Rh₂(H₂cit)₄ e Magh-Cit.

Tratamento	VCM (fL)	HCM (pg)	CHCM (g/mL)	HGB (g/dL)	HCT (%)	RBC (milhões/mm ³)
Sadio	48,3± 0,2	15,7 ± 0,2	32,6 ± 0,4	14,0±0,4	42,9 ± 1,0	8,9 ± 0,2
Controle com tumor	47,3± 0,3	15,3 ± 0,1	32,3 ± 0,3	12,8±0,5	39,6 ± 1,2	8,4 ± 0,3
Magh-Rh₂Cit	48,9± 0,4	15,1± 0,7	31,0 ± 1,4	12,7±1,0	41,0 ± 2,3	8,4 ± 0,5
Magh-Cit	48,8± 0,7	15,5 ± 0,3	31,7 ± 0,2	13,4±0,2	34,2 ± 0,6	8,6 ± 0,1
Rh₂(H₂cit)₄	48,2± 0,3	14,5± 0,7	30,1 ± 1,5	10,7±2,3	34,1 ± 6,8	7,1 ± 01,4

Os dados correspondem à média e ao erro padrão da média (EPM). VCM = Volume Corpuscular Médio; HCM = Hemoglobina Corpuscular Média; CHCM = Concentração Hemoglobínica Corpuscular Média; HGB = Hemoglobina; HCT = Hematócrito; RBC = número de hemácias; g/dL = gramas por decilitros; fL = fentolitros; pg = picograma; g/mL = grama por mililitro.

Os resultados do plaquetograma, mostrados na **Tabela 7**, revelaram que os tratamentos com Rh₂(H₂cit)₄, Magh-Cit e Magh-Rh₂(H₂cit)₄ não causaram alterações significativas no volume plaquetário médio (VPM) e no número de plaquetas quando comparados com o grupo controle (sadio) e animais portadores de tumor não tratados. O volume plaquetário médio (VPM) é comumente utilizado como um parâmetro indicador da atividade normal da medula óssea e da taxa de renovação das plaquetas (COMAR & SILVA, 2009).

Tabela 7 - Plaquetograma de camundongos BALB/c fêmeas portadores de carcinoma mamário tratados via intratumoral com Rh₂(H₂cit)₄, Magh-Rh₂(H₂cit)₄ e Magh-Cit.

Tratamento	Plaquetas (mil/mm³)	VPM (fL)
Sadio	456,7± 35,6	7,3 ± 0,1
Controle com tumor	447,6± 45,4	7,4 ± 0,2
Magh-Rh₂(H₂cit)₄	358,7± 84,0	6,7 ± 0,1
Magh-Cit	453,4± 71,1	6,4 ± 0,1
Rh₂(H₂cit)₄	428,2 ± 89,3	7,3 ± 0,1

Os dados correspondem à média e ao erro padrão da média (EPM). VPM = volume plaquetário médio; fL = femtolitros.

Foi verificada intensa leucocitose, com aumento significativo, nos grupos Rh₂(H₂cit)₄ e Magh-Cit em relação ao grupo controle (sadio). Foi possível observar aumento com diferença significativa nos monócitos e neutrófilos do grupo tratado com Magh-Rh₂(H₂cit)₄. Os valores das demais células descritas no leucograma (linfócitos, bastonetes, eosinófilos, e basófilos) não apresentaram diferenças estatísticas, sugerindo que os tratamentos utilizados pouco interferem no metabolismo dessas células (**Tabela 8**).

Tabela 8 – Leucograma de camundongos BALB/c fêmeas portadores de carcinoma mamário tratados via intumoral com Rh₂(H₂cit)₄, Magh-Rh₂(H₂cit)₄ e Magh-Cit.

Parâmetros	Sadio	Controle com tumor	Rh ₂ (H ₂ cit) ₄	Magh-Rh ₂ Cit	Magh-Cit
Leucócitos totais (/mm ³)	2.405,0 ± 432,0	3.091,8 ± 449,7	16.666,6**± 3958,7	3.540,0 ± 18160,8	33.520,0** ± 10098,9
Linfócitos (%)	40,29 ± 2,11	54,81 ± 3,1	41,22 ± 2,39	43,03 ± 3,34	46,02 ± 2,29
Bastonetes (%)	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
Eosinófilos (%)	5,62 ± 1,27	5,43 ± 0,95	5,23 ± 0,72	4,04 ± 0,40	4,92 ± 0,32
Neutrófilos + Monócitos (%)	48,32 ± 4,6	46,9 ± 4,2	47,76 ± 2	80** ± 12,8	52,3 ± 6,9
Basófilos (%)	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0

Os dados correspondem à média e ao erro padrão da média (EPM). Os asteriscos indicam que a média difere estatisticamente do grupo controle sem tumor. Diferenças significativas *p<0,05 ou altamente significativas **p<0,01.

5.2.2. Testes bioquímicos

A análise de creatinina demonstrou que os animais portadores de tumor sem tratamento, assim como os animais com tratamento, mantiveram valores parecidos com os animais do controle sadio, não apresentando alterações significativas. Isto sugere que os tratamentos utilizados não induziram nefrotoxicidade nos animais (**Figura 25**).

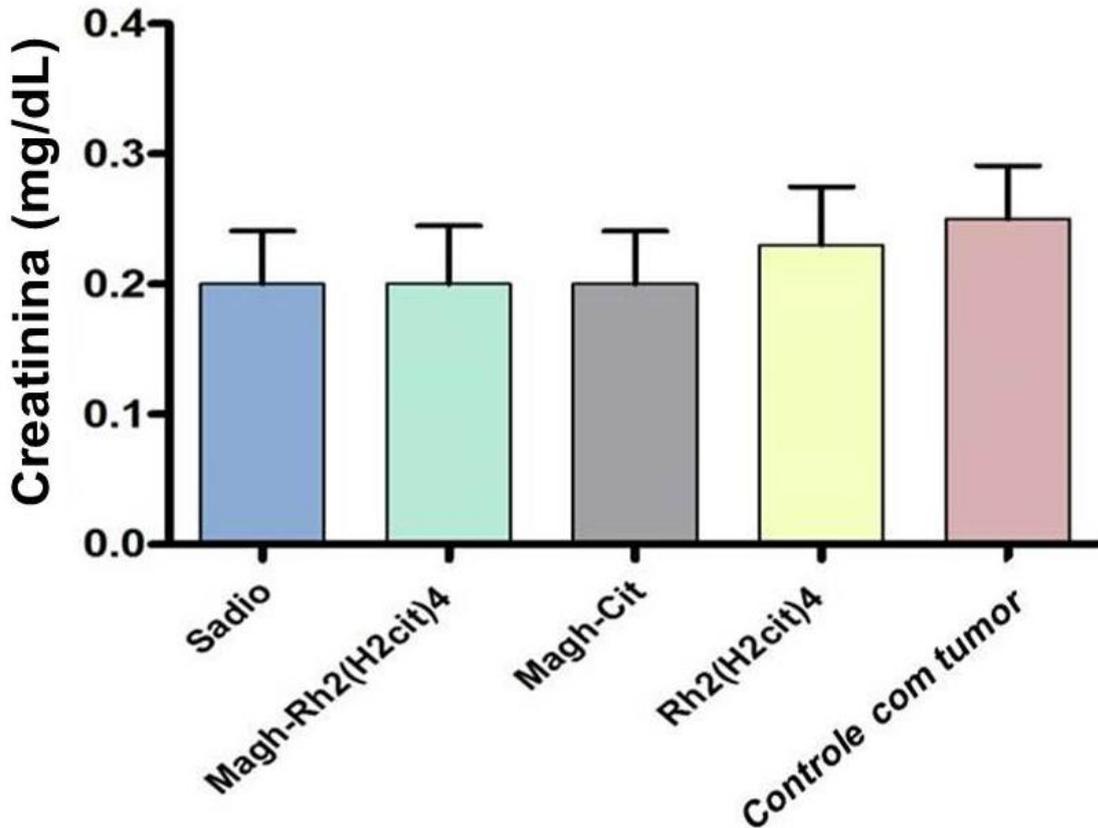


Figura 25 – Valores bioquímicos da creatinina dosada no soro de camundongos sadios e portadores de carcinoma mamário tratados com Rh₂(H₂cit)₄, Magh-Cit e Magh-Rh₂(H₂cit)₄. Dados correspondem a valores da média ± desvio padrão (n = 6).

O grupo controle com tumor (salina) e o grupo Magh-Rh₂(H₂cit)₄ apresentaram redução com diferença significativa de transaminase pirúvica quando comparado ao grupo sadio. Os valores de transaminase pirúvica são avaliados como indicadores de hepatotoxicidade quando possui índices elevados, no caso, os resultados demonstraram uma diminuição desta enzima. Foi observada uma redução significativa no grupo controle com tumor, que não recebeu tratamento, demonstrando que esta redução pode estar relacionada a presença do tumor e não com os tratamentos utilizados (**Figura 26**).

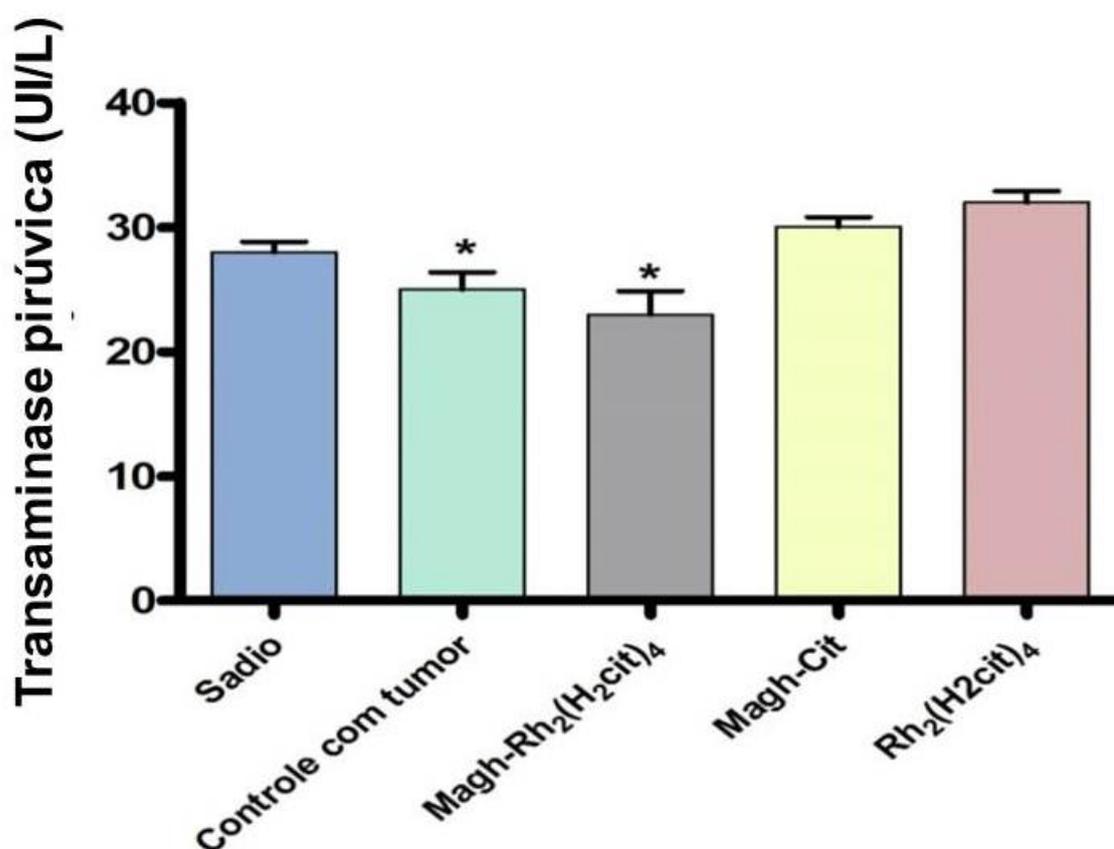


Figura 26 – Valores bioquímicos de transaminase pirúvica dosada no soro de camundongos portadores de carcinoma mamário tratados com Rh₂(H₂cit)₄, Magh-Cit e Magh-Rh₂(H₂cit)₄. Dados correspondem a valores da média ± desvio padrão (n = 6). Diferenças significativas (*p<0,05).

5.3. Análises histopatológicas

A análise histopatológica do tumor permitiu constatar que todos os animais apresentaram implantação adequada das células 4T1 no tecido mamário, mostrando a eficiência da técnica utilizada para a indução do tumor ortotópico.

O tecido mamário dos camundongos sadios (sem transplante de células tumorais) apresentou parênquima e estroma característicos. Na figura 27 observa-se um ducto que é formado por uma camada interna de células epiteliais cúbicas e na parte externa possui uma camada de células mioepiteliais, tecido muscular liso, um vaso sanguíneo próximo ao tecido adiposo e um linfonodo.

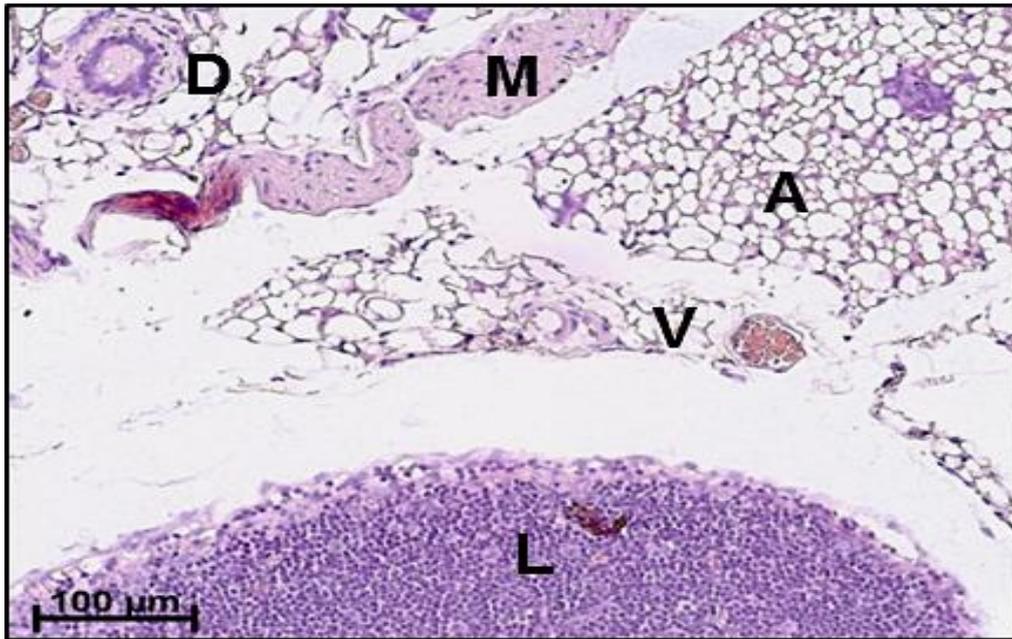


Figura 27 - Fotomicrografia de tecido mamário de camundongo fêmea BALB/c. Parênquima e estroma do tecido mamário normal. **Legenda:** A: tecido adiposo; D: ducto; L: linfonodo; M: tecido muscular liso; V: vaso sanguíneo. Coloração H&E.

De forma geral, os tumores observados apresentaram características de tumores malignos, parênquima com pouca diferenciação, células pleomórficas (tamanho e formas diferentes), desorganização tecidual e células com morfologia distinta do parênquima da mama normal. Presença de pontos indicativos de hemorragia, linfócitos e núcleos picnóticos, que ocorrem quando a cromatina está extremamente condensada, causada por um evento patológico, ou cariorrexe, que são núcleos picnóticos fragmentados que ocorrem quando a cromatina adquire uma distribuição irregular, podendo se acumular em grânulos. Foram encontradas células neoplásicas com delimitação celular imprecisa e amorfa.

Na figura 28 é demonstrado a comparação dos grupos tratados e controle com tumor sem tratamento. Pode-se observar a presença de nanopartículas no tecido tumoral (**Figura 28 A**). Alta proliferação celular com várias figuras mitóticas (**Figura 28 B**), células tumorais invadindo o tecido adiposo e muscular (**Figura 28 C**) e a presença de infiltrado inflamatório na região tumoral (**Figura 28 D**).

Em camundongos tratados com Magh-Rh₂(H₂cit)₄ pode-se observar, a presença de células tumorais próximas ao tecido muscular (**Figura 29 A**). Nanopartículas infiltradas na região central (**Figura 29 B e D**) e na periferia do tumor (**Figura 29 A e**

C), evidenciadas por marcações em marron. Já no grupo tratado com $Rh_2(H_2cit)_4$ mostra grande número de mitoses e núcleos picnóticos com aumento do crescimento desordenado das células sobre o parênquima mamário. É possível visualizar as células indiferenciadas do tecido tumoral (**Figura 30**).

O grupo tratado com Magh-Cit revelou regiões com hemorragia, presença de nanopartículas na região central do tumor, presença de figuras mitóticas, núcleos picnóticos e células tumorais invadindo o tecido muscular (**Figura 31**). No grupo controle com tumor, sem tratamento, é possível visualizar a presença de células neoplásicas indiferenciadas, células tumorais próximas ao tecido muscular e células em mitose. O aumento das figuras mitóticas deve-se a elevada proliferação tumoral (**Figura 32**).

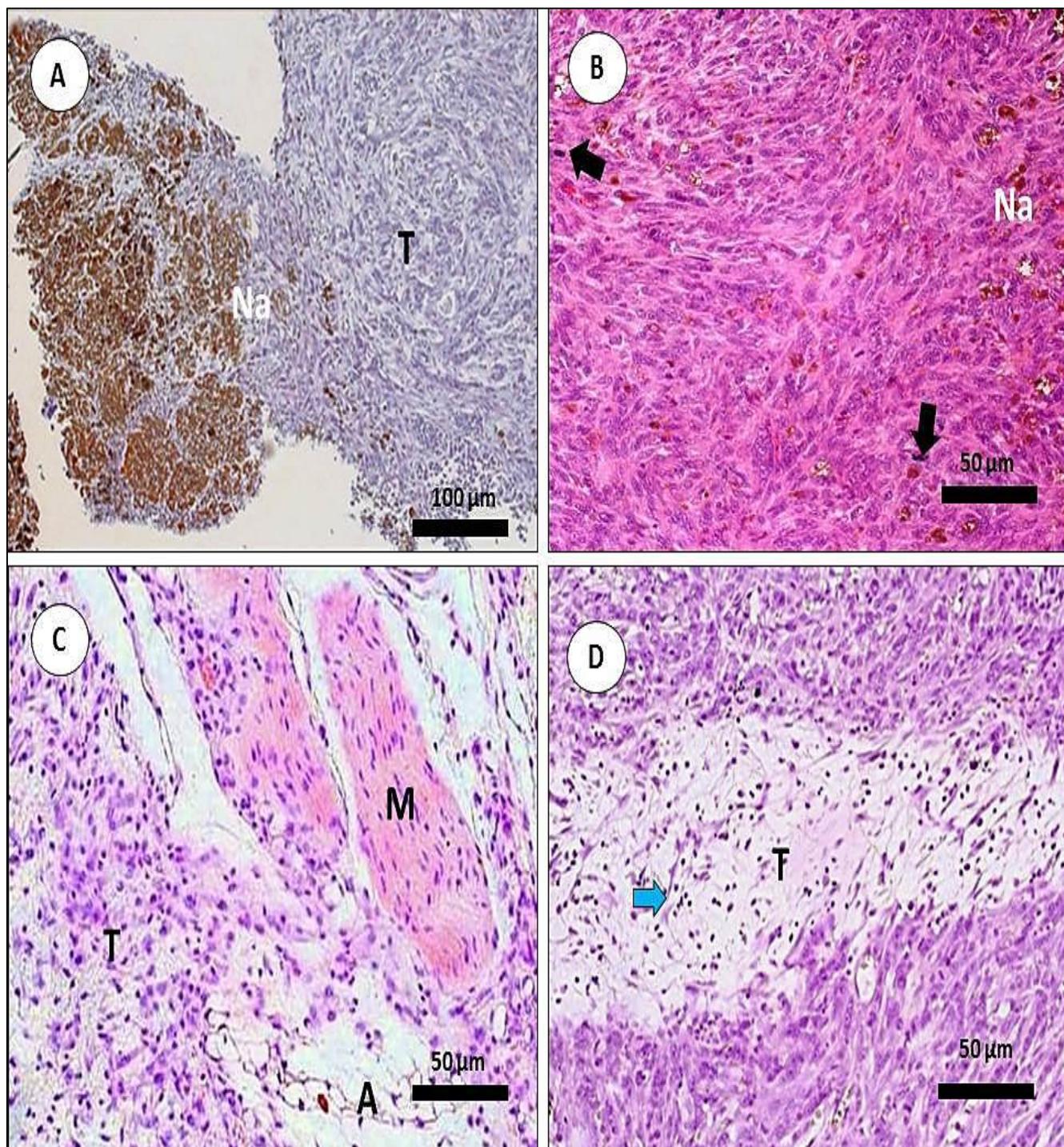


Figura 28 Fotomicrografias comparativas de tecido mamário de camundongo fêmea BALB/c. (A) animais tratados com Magh-Rh₂(H₂cit)₄; (B) animais tratados com Mahg-Cit; (C) tratados com Rh₂(H₂cit)₄; (D) Controle com tumor sem tratamento. Tratados com 216 mg de ferro por kg de peso corpóreo e 8 mg de citrato de ródio por kg peso corpóreo. **Legenda:** A: tecido adiposo; L: linfócitos; M: tecido muscular; T: tumor; Na: Nanopartículas. Coloração H&E.

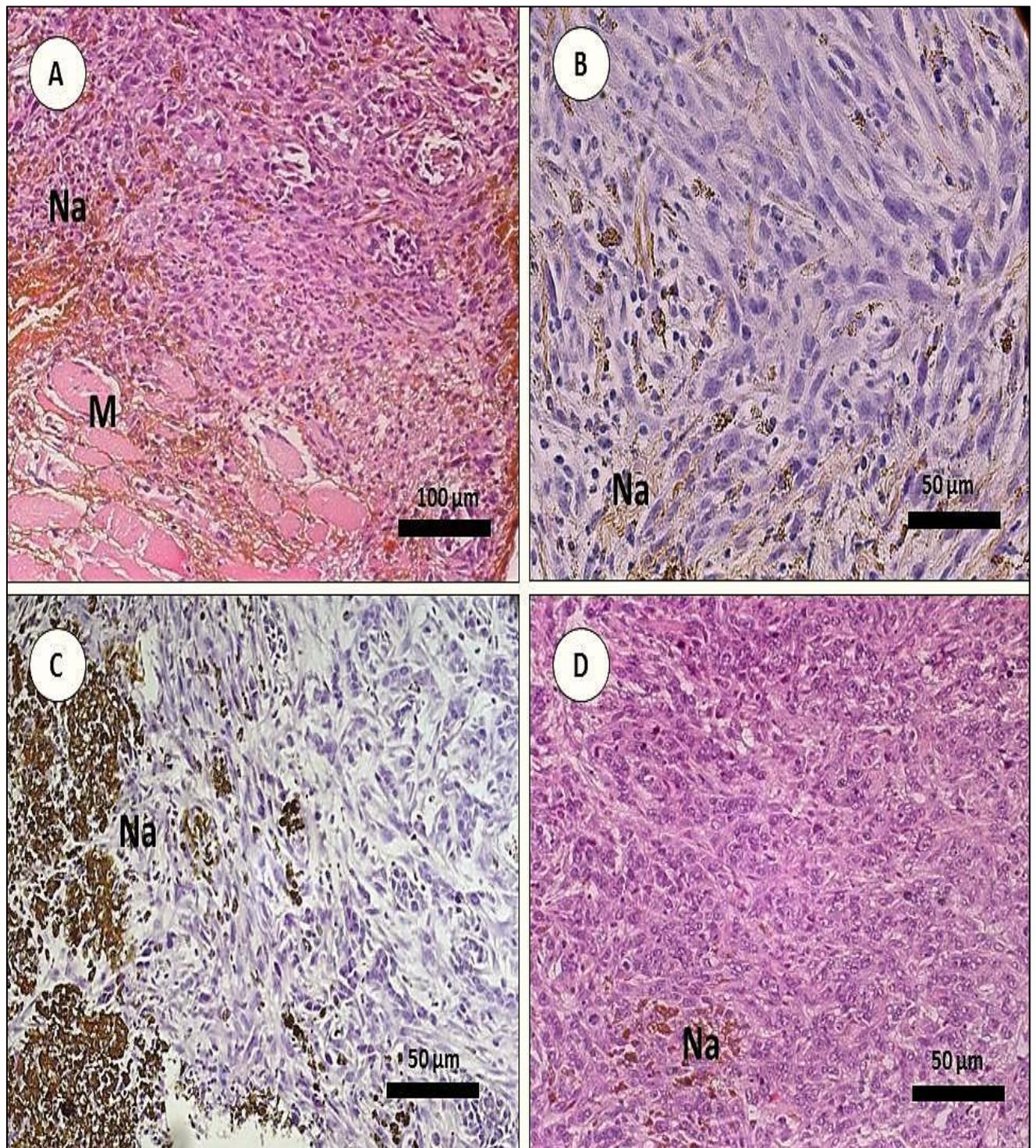


Figura 29 - Fotomicrografias da histologia de carcinoma mamário de camundongos fêmeas BALB/c tratados com $\text{Magh-Rh}_2(\text{H}_2\text{cit})_4$. Tecido dos animais submetidos ao tratamento com nanopartículas de maghemita associadas ao citrato de ródio (II) [$\text{Magh-Rh}_2(\text{H}_2\text{cit})_4$]. (A) Células tumorais invadindo o tecido muscular e presença de nanopartículas. (A-D) Presença de nanopartículas na região central e periférica do tumor. Tratados com 216 mg de ferro por kg de peso corpóreo e 8 mg de citrato de ródio por kg peso corpóreo. **Legenda:** M: Tecido muscular; Na: Nanopartículas. Coloração H&E.

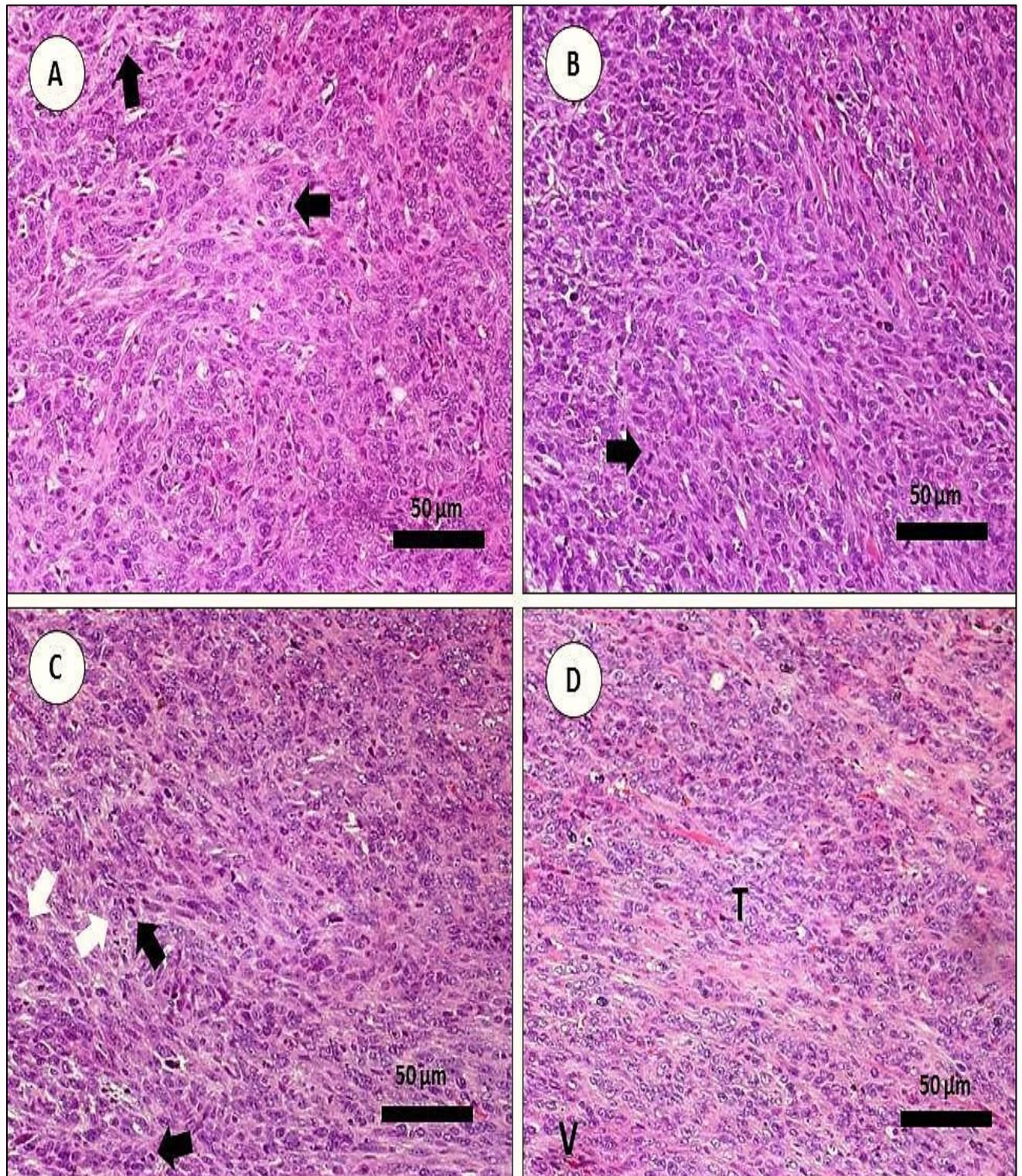


Figura 30 - Fotomicrografias da histologia de carcinoma mamário de camundongos fêmeas BALB/c tratados com $Rh_2(H_2cit)_4$. (A – D) Alta proliferação de células tumorais com várias figuras mitóticas (seta preta) e núcleos picnóticos em cariorrexe (seta branca). Tratados com 8 mg de citrato de ródio por kg peso corpóreo. **Legenda:** T = tumor; V: vaso sanguíneo. Coloração H&E.

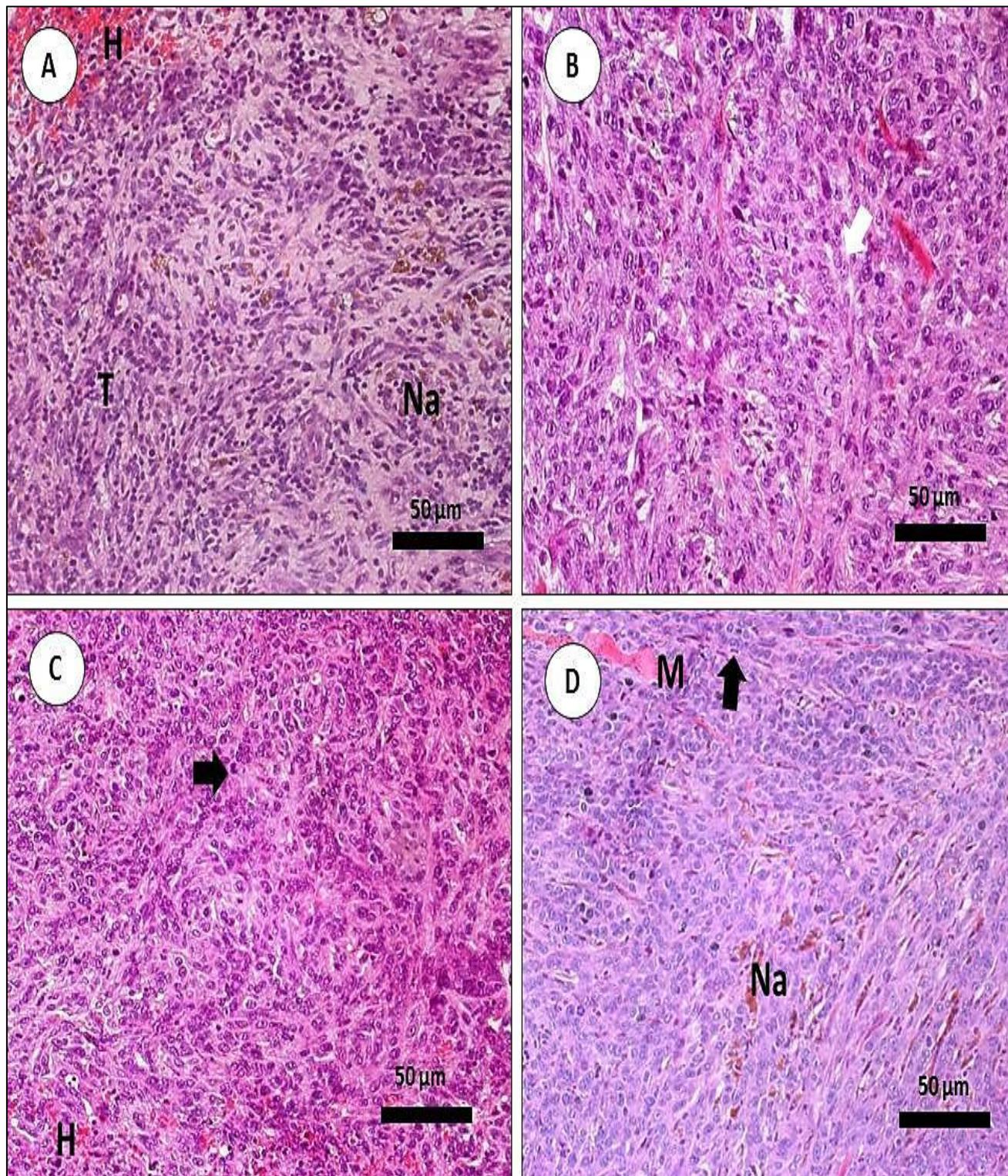


Figura 31 - Fotomicrografias da histologia de carcinoma mamário de camundongos fêmeas BALB/c tratados com Magh-Cit. (A) Presença de nanopartículas de maghemita no tecido tumoral e hemorragia. (B) Núcleo picnótico em cariorrexe (seta branca). (C) Figuras mitóticas (seta preta) e regiões com hemorragia. (D) Figuras mitóticas (setas pretas), presença de nanopartículas e células tumorais invadindo o tecido muscular. Tratados com 216 mg de ferro por kg de peso corpóreo. **Legenda:** M: Tecido muscular; Na = Nanopartículas; H = hemorragia; T = tumor. Coloração H&E.

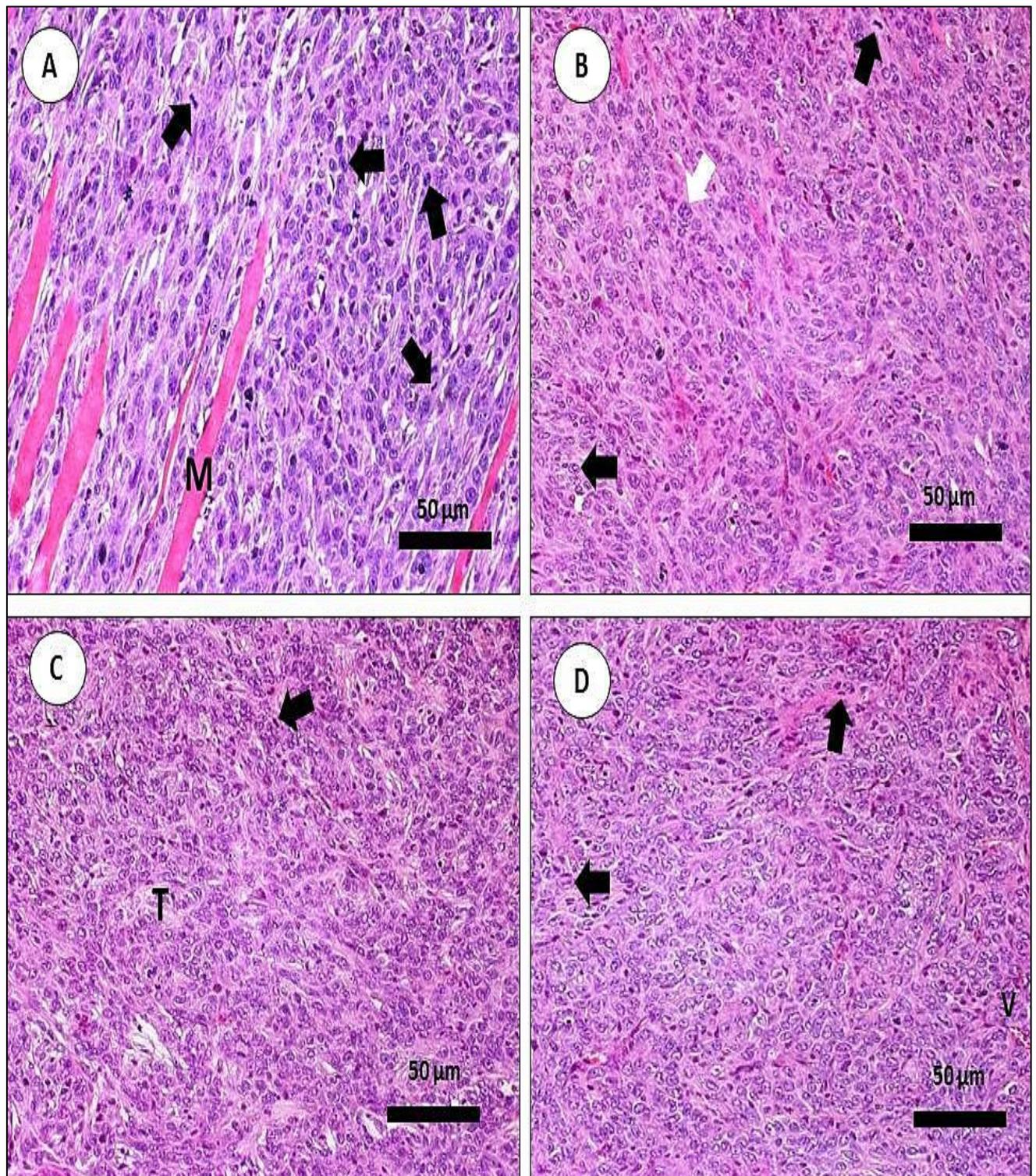


Figura 32 - Fotomicrografias da histologia de carcinoma mamário de camundongos fêmeas BALB/c controle com tumor sem tratamento (salina). (A) Células tumorais invadindo o tecido muscular e presença de células em mitose (seta preta). (B - D) Figuras mitóticas (setas pretas) e núcleos picnóticos (seta branca). (cabeças de setas). **Legenda:** M = músculo; T = tumor. Coloração H&E.

5.4. Análises do ciclo celular e fragmentação de DNA de células da medula óssea

Após o término dos tratamentos, foram avaliados o perfil de distribuição das células de medula óssea nas fases do ciclo celular e o grau de fragmentação do DNA.

A análise do ciclo celular demonstrou que os animais que receberam tratamento não tiveram alterações no ciclo celular das células da medula óssea, sugerindo que o tratamento não provocou alterações no ciclo. Não houve diferença significativa entre os grupos (**Figura 33**).

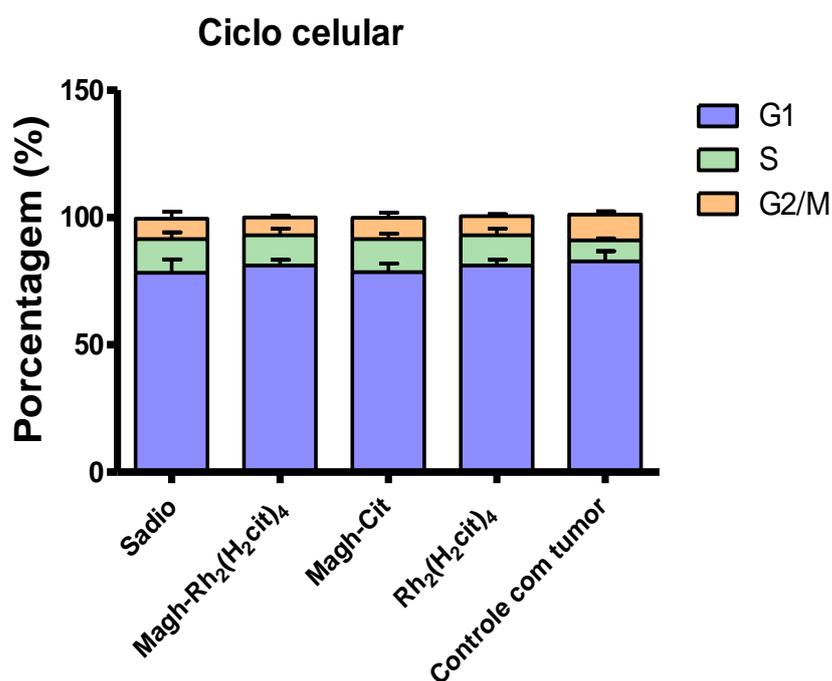


Figura 33 – Efeito dos tratamentos com Rh₂(H₂cit)₄, Magh-Rh₂(H₂cit)₄ e Magh-Cit no ciclo de células da medula óssea de camundongos. Os grupos controles utilizados foram animais sem tumor e animais com tumor sem tratamento. A análise foi feita por meio de citômetro de fluxo e marcação com iodeto de propídio (PI). Os resultados foram expressos como média ± erro padrão. (n = 6).

Na análise de fragmentação de DNA, foi detectado aumento significativo na porcentagem de fragmentação no grupo de animais controle com tumor (18, 96% ± 1, 90). Percebeu-se menor fragmentação de DNA nos animais com tumor que receberam tratamento. O percentual de DNA fragmentado do grupo tratado com Magh-Rh₂(H₂cit)₄ (9, 29% ± 1, 20) foi similar aos os valores do grupo controle sadio (9, 20% ± 1, 98) (**Figura 34**).

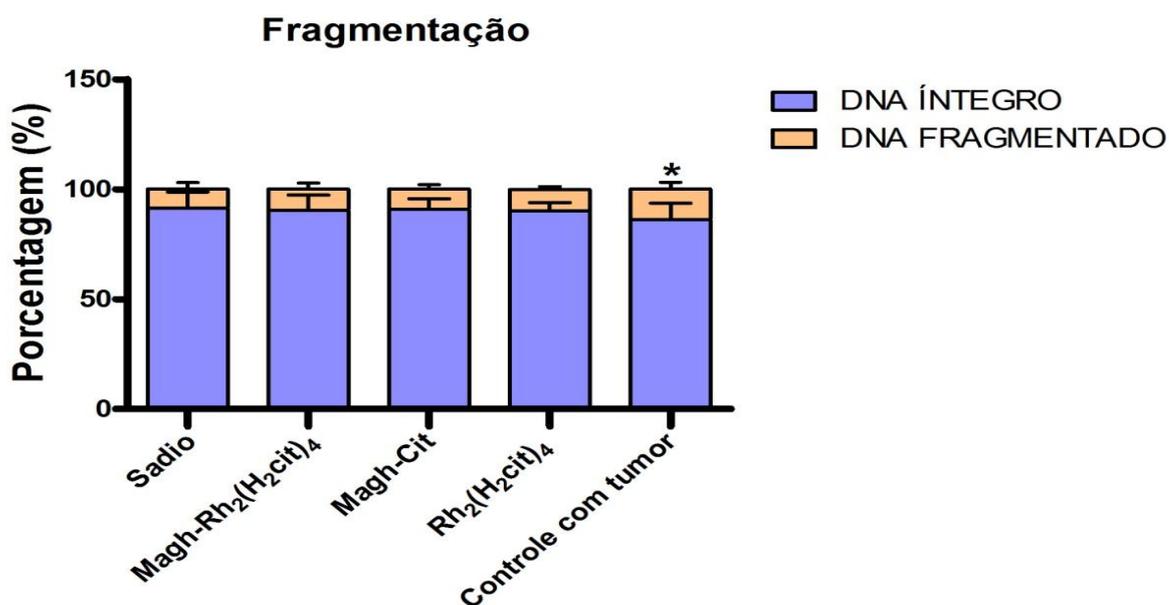


Figura 34 – Efeito dos tratamentos com Rh₂(H₂cit)₄, Magh-Rh₂(H₂cit)₄ e Magh-Cit sobre a fragmentação do DNA em células da medula óssea de camundongos. Os grupos controles utilizados foram animais sem tumor e animais com tumor sem tratamento. A análise foi feita por meio de citômetro de fluxo e marcação com iodeto de propídio (PI). Os resultados foram expressos como média ± erro padrão. (n = 6). * indica p < 0,05.

5.5. Imunohistoquímica

A imunohistoquímica foi utilizada para verificar se os tratamentos utilizados causam alguma diferença na expressão das proteínas fibronectina e laminina nos grupos experimentais. As imunomarcações de fibronectina e laminina em carcinoma mamário dos animais tratados com Magh-Cit, Magh-Rh₂(H₂cit)₄ e Rh₂(H₂cit)₄, com tumor sem tratamento ou controle sem tumor evidenciaram, como esperado, a presença das referidas proteínas na matriz extracelular e no interior de algumas células tumorais. Em todas as reações realizadas, foram utilizados controles de marcação positiva e negativa (**Figuras 35 e 38**).

A quantificação assistida por computador do percentual de células tumorais positivamente imunomarcadas em relação à fibronectina revelou que a expressão desta proteína não diferiu significativamente entre os animais tratados com Magh-Rh₂(H₂cit)₄, Magh-Cit, Rh₂(H₂cit)₄ ou portadores de tumor não-tratados (**Figura 36**). A análise do percentual de matriz extracelular com imunomarcação positiva conduziu a um resultado semelhante, em que não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos experimentais (**Figura 37**).

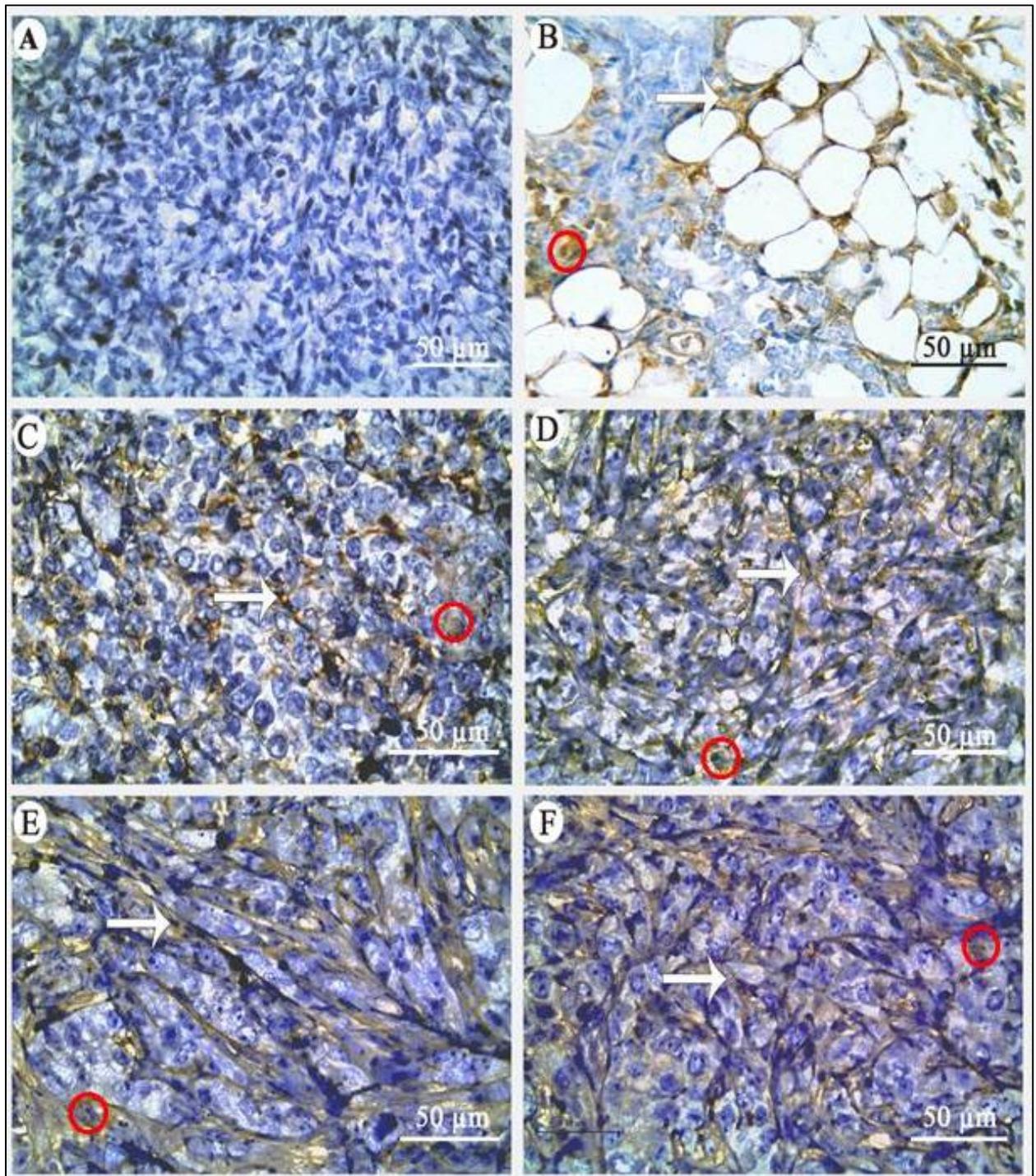


Figura 35 – Fotomicrografias de carcinoma mamário de camundongos BALB/C submetido a marcação imunohistoquímica para avaliação da expressão da proteína fibronectina. (A) Ausência de marcação no tecido tumoral utilizado como controle negativo, feito sem incubação com o anticorpo primário. (B) Controle da mama normal. (C) Animais tratados com Magh-Rh₂(H₂cit)₄. (D) Tratamento com Magh-Cit. (E) Tratamento com Rh₂(H₂cit)₄. (F) Controle com tumor sem tratamento (salina). A imunomarcação das proteínas foi identificada com diaminobenzidina (DAB) em marrom, sendo realizada contracoloração com hematoxilina de Mayer's. As setas indicam regiões positivamente marcadas em relação à presença da proteína na matriz extracelular. Os círculos vermelhos indicam as regiões positivamente marcadas em relação à presença da proteína na célula. (400X).

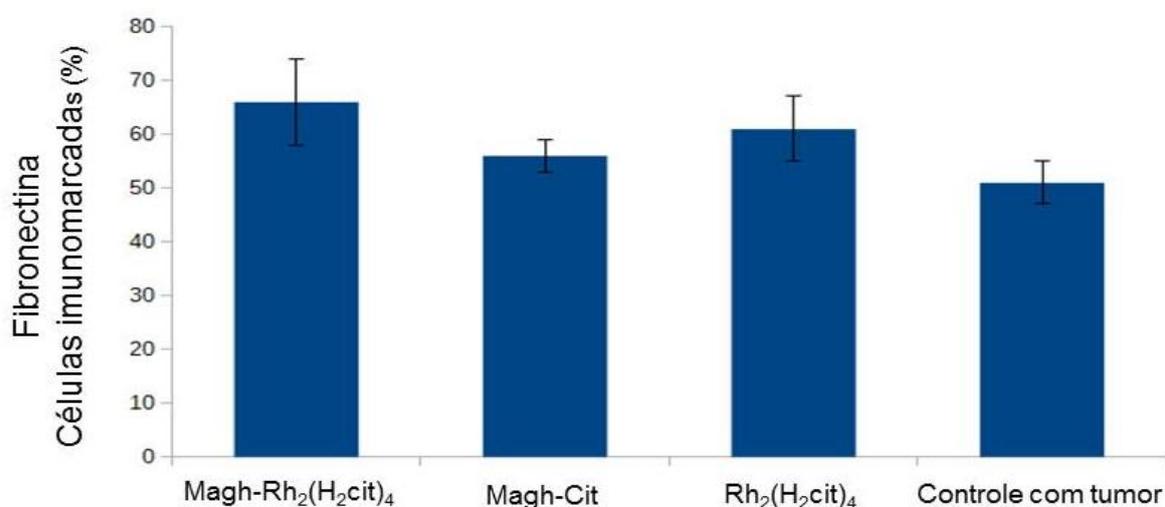


Figura 36 – Percentuais de células tumorais positivamente imunomarcadas para avaliação da expressão da proteína fibronectina em carcinoma mamário de camundongos BALB/C do grupo controle com tumor (salina) ou tratados com Magh-Rh₂(H₂cit)₄, Magh-Cit ou Rh₂(H₂cit)₄. As barras representam a média ± erro padrão.

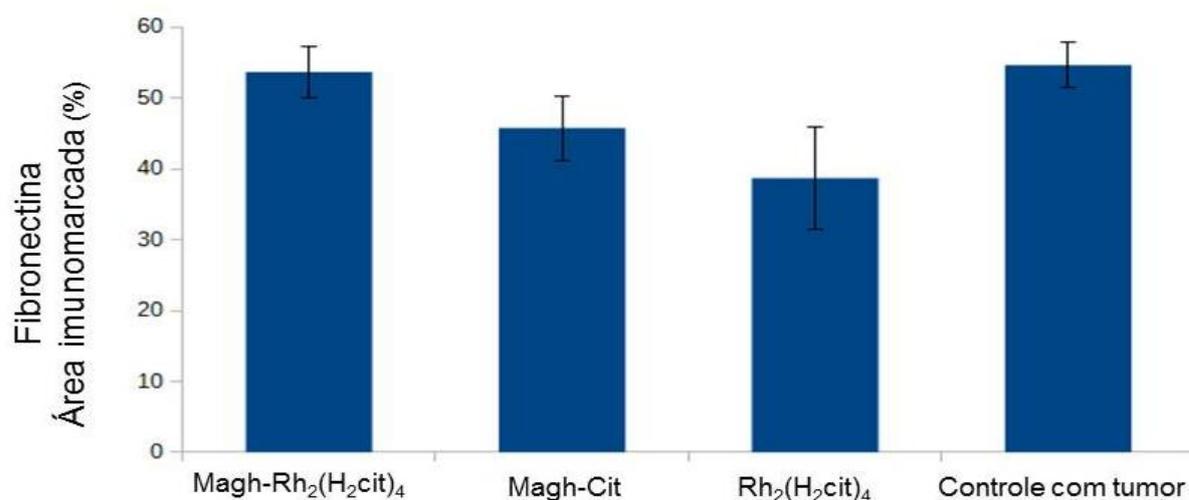


Figura 37 – Percentuais de área da matriz extracelular positivamente imunomarcada para avaliação da expressão da proteína fibronectina em carcinoma mamário de camundongos BALB/C do grupo controle com tumor (salina) ou tratados com Magh-Rh₂(H₂cit)₄, Magh-Cit ou Rh₂(H₂cit)₄. As barras representam a média ± erro padrão.

Em relação à laminina, a avaliação do percentual de células tumorais positivamente imunomarcadas indicou que a expressão desta proteína também não diferiu significativamente entre os animais tratados com Magh-Rh₂(H₂cit)₄, Magh-Cit, Rh₂(H₂cit)₄ ou portadores de tumor não-tratados (**Figura 39**). De forma semelhante, a análise do percentual de matriz extracelular com imunomarcagem positiva também demonstrou não haver diferença estatística entre os grupos experimentais (**Figura 40**).

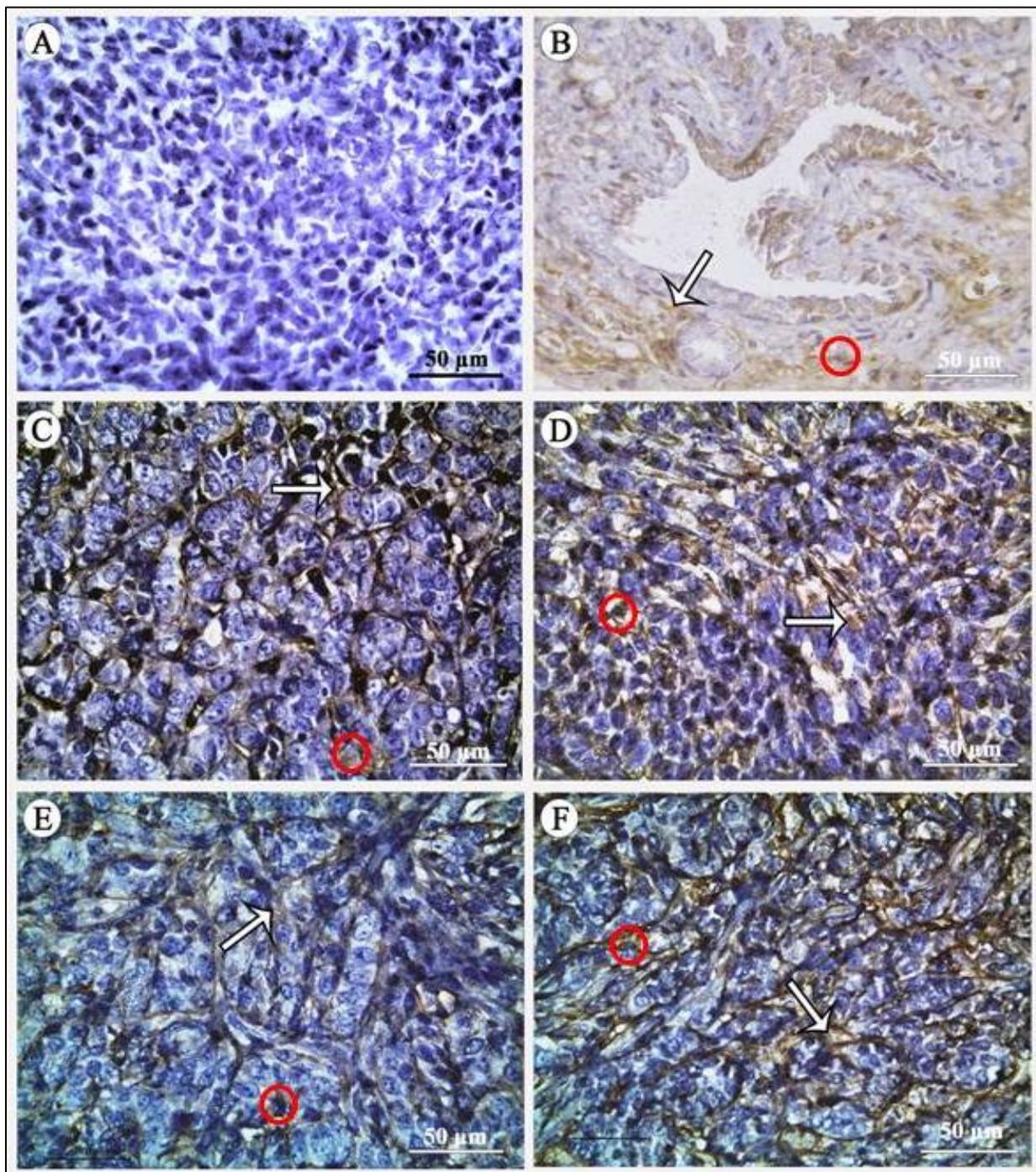


Figura 38 – Fotomicrografias de carcinoma mamário de camundongos BALB/C submetido a marcação imunohistoquímica para avaliação da expressão da proteína laminina. (A) Ausência de marcação no tecido mamário utilizado como controle negativo, feito sem incubação com o anticorpo primário. (B) Controle da mama normal. (C) Animais tratados com Magh-Rh₂(H₂cit)₄. (D) Tratamento com Magh-Cit. (E) Tratamento com Rh₂(H₂cit)₄. (F) Controle com tumor sem tratamento. A imunomarcação das proteínas foi identificada com diaminobenzidina (DAB) em marrom, sendo realizada contracoloração com hematoxilina de Mayer's. As setas indicam regiões positivamente marcadas em relação à presença da proteína na matriz extracelular. Os círculos vermelhos indicam as regiões positivamente marcadas em relação à presença da proteína na célula. (400X).

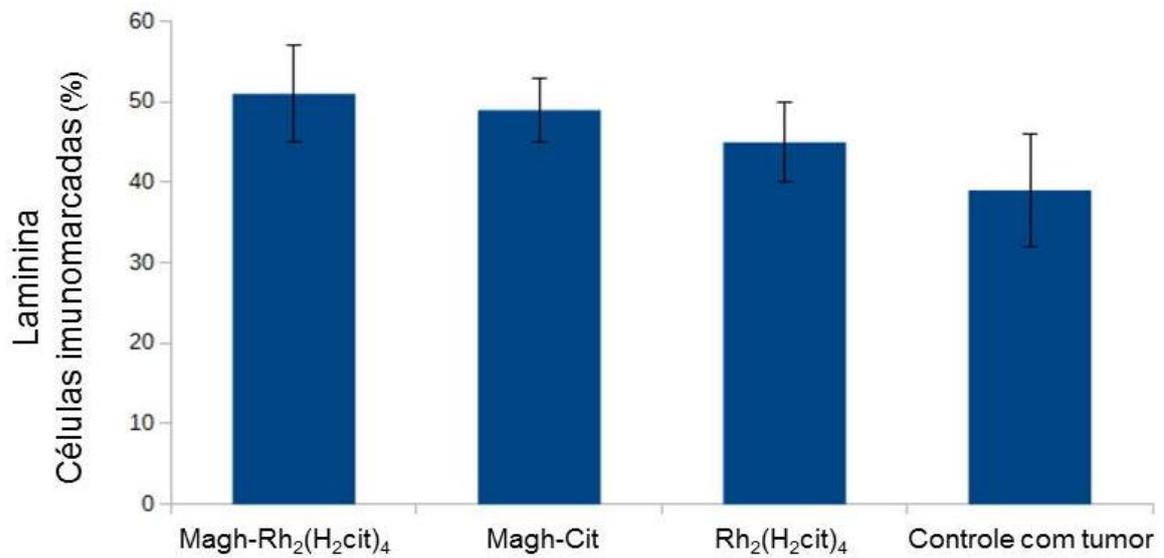


Figura 39 - Percentuais de células tumorais positivamente imunomarcadas para avaliação da expressão da proteína laminina em carcinoma mamário de camundongos BALB/C do grupo controle com tumor (salina) ou tratados com Magh-Rh₂(H₂cit)₄, Magh-Cit ou Rh₂(H₂cit)₄. As barras representam a média ± erro padrão.

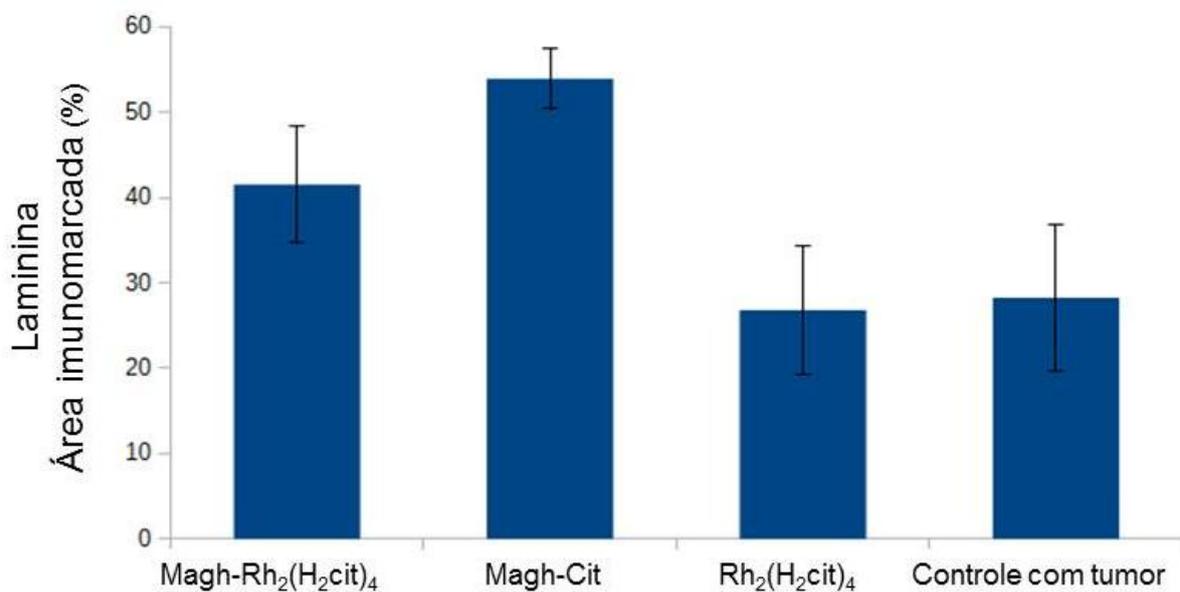


Figura 40 – Percentuais de área da matriz extracelular positivamente imunomarcada para avaliação da expressão da proteína laminina em carcinoma mamário de camundongos BALB/C do grupo controle com tumor (salina) ou tratados com Magh-Rh₂(H₂cit)₄, Magh-Cit ou Rh₂(H₂cit)₄. As barras representam a média ± erro padrão.

5.6. Reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real – RT q-PCR

A expressão dos genes *Laminina* e *Fibronectina* não foram detectadas por meio da técnica qPCR em tempo real, mesmo utilizando o cDNA sem qualquer diluição e aumentando a quantidade dos ciclos para 45. Portanto, nas condições experimentais realizadas houve uma quantidade extremamente baixa desses transcritos nas amostras. A integridade do RNA e a eficiência dos *primers* utilizados foram comprovados. O primer utilizado como controle endógeno o *RPS9* ribossomal mostrou amplificação normal nas condições experimentais realizadas, indicando a integridade do RNA extraído das amostras. As **figuras 41** e **42** mostram a curva de amplificação por RT-qPCR, onde o controle endógeno faz várias curvas de amplificação (em vermelho) no gráfico. Enquanto, os *primers* de *Laminina* e *Fibronectina* (em verde) se mantêm lineares mostrando que não houve amplificação. Provavelmente não houve amplificação dos genes de interesse por ter pouco RNA nas amostras impossibilitando a detecção dos transcritos.

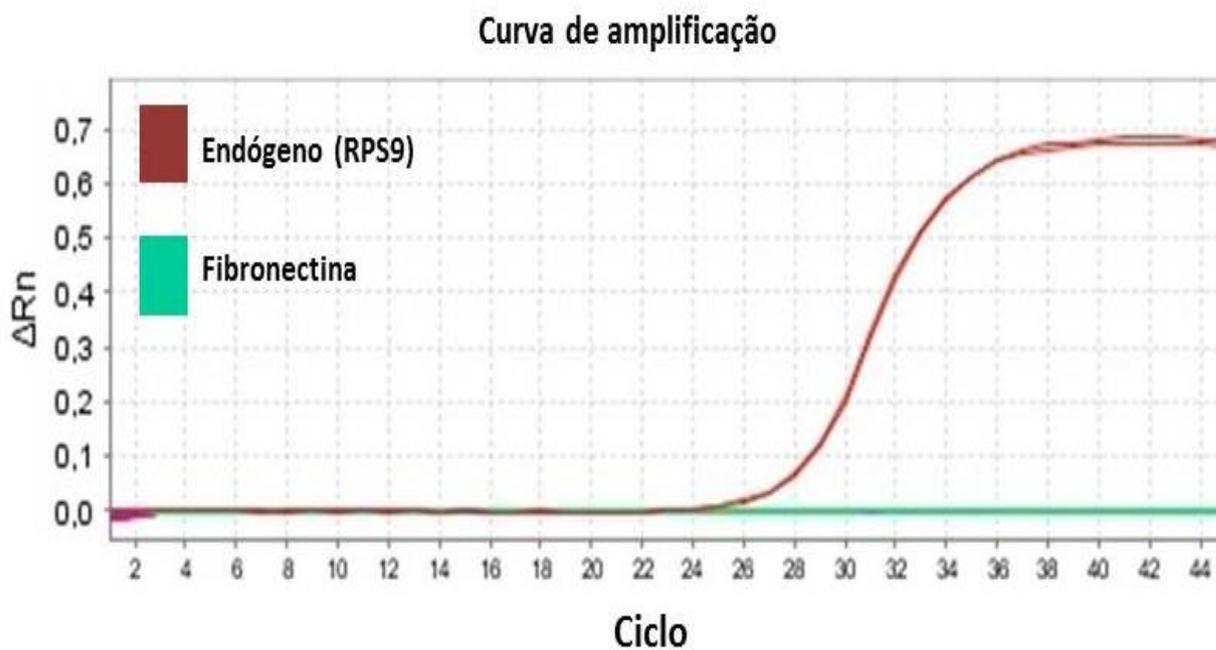


Figura 41 – Curva de amplificação dos *primers* de *Fibronectina* e *RPS9* por RT-qPCR. *Primer* de *Fibronectina* representado em verde e o *primer* do *RPS9* (controle endógeno) em vermelho. Foi observada amplificação apenas para o gene do controle endógeno.

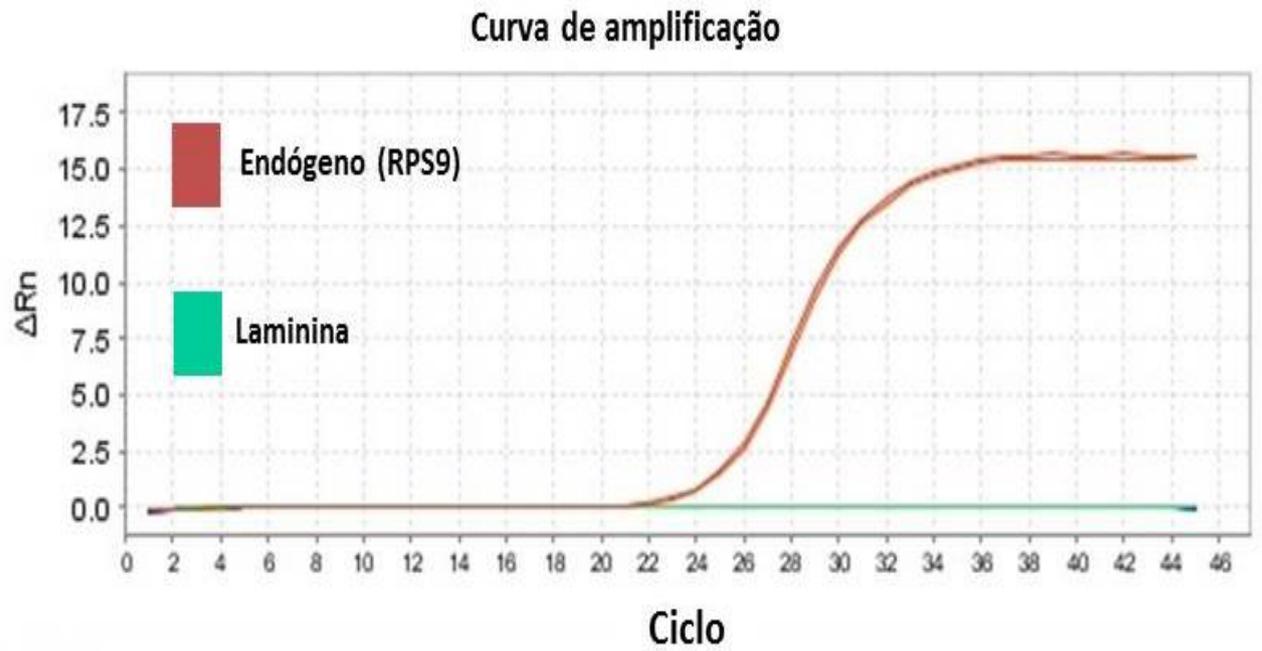


Figura 42 – Curva de amplificação dos *primers Laminina* e *RPS9* por RT-qPCR. *Primer de Lamina* representado em verde e *primer do RPS9* (controle endógeno) em vermelho. Foi observada amplificação apenas para o gene do controle endógeno.

6. Discussão

O câncer de mama é um dos mais incidentes no mundo e a degradação da matriz extracelular vem sendo indicada como um facilitador do processo de invasão e progressão desta doença (NELSON *et al.*, 2006; YAO *et al.*, 2007; NAM *et al.*, 2010). Células tumorais têm a habilidade de criar seu microambiente e obter as condições necessárias para crescer e sobreviver, promovendo processos como neoangiogênese e capacidade de remodelar ativamente a matriz extracelular (DALEY *et al.*, 2008). Diante disso, este estudo teve como objetivo verificar se os tratamentos com Rh₂(H₂cit)₄, Magh-Cit e Magh-Rh₂(H₂cit)₄ possuem alguma influência na modulação da expressão das proteínas da matriz extracelular laminina e fibronectina.

Nanopartículas associadas ao citrato de ródio (II) vem se destacando por apresentar atividade antitumoral em camundongos portadores de carcinoma mamário (ZYNGIER *et al.*, 1989; CARNEIRO, 2011). O citrato de ródio possui menor toxicidade quando comparado a outros complexos de ródio similares, o que o torna um promissor agente para o uso em tratamento anticâncer (KATSAROS & ANAGOSTOPOLOU, 2002).

Pelo método de coprecipitação de íons Fe⁺² e Fe⁺³ em meio alcalino, foram sintetizadas as nanopartículas de maghemita, utilizadas nesse estudo (MASSART, 1982). As nanopartículas apresentaram morfologia esférica com característica monodispersa, PDI de $0,118 \pm 0,013$, carga média do potencial zeta de $-57,6$ mV, diâmetro hidrodinâmico médio de $160,8 \pm 0,1$ nm e diâmetro modal de 9 nm. Valores semelhantes aos encontrados anteriormente em caracterizações de maghemita associada ao citrato (PATERNO *et al.*, 2009; CARNEIRO, 2011).

Experimentos com animais na pesquisa científica têm sido importante por contribuir para o desenvolvimento da ciência promovendo a descoberta de medidas profiláticas, ajudando a elucidar questões sobre o desenvolvimento de tumores e o mecanismo de ação dos compostos utilizados. Desde que foram introduzidos em laboratórios, no século XIX, os camundongos são um dos mais importantes animais experimentais, pois seu ciclo de vida é curto e possuem semelhanças fisiológicas com o ser humano (RANGARAJAN & WEINBERG, 2003; BRANCO *et al.*, 2011). Os testes foram realizados em camundongos da linhagem BALB/c que são utilizados pela facilidade na administração de fármacos e na coleta de sangue (CHORILLI *et al.*, 2007).

Para a indução do tumor, foram utilizadas células de adenocarcinoma mamário murino, linhagem 4T1, que foram transplantadas seguindo o protocolo estabelecido por Carneiro (2011) na implantação de um tumor ortotópico. As células da linhagem 4T1 foram escolhidas uma vez que são facilmente transplantáveis para a glândula mamária, por serem um dos modelos experimentais capazes de desenvolver metástases nos locais afetados pelo câncer de mama em humanos e permitirem a comparação entre os estudos *in vivo* e *in vitro* (PULASKI & OSTRAND-ROSENBERG, 2001).

A escolha da dose a ser utilizada nos testes biológicos com $Rh_2(H_2cit)_4$, foi baseada em estudos feitos previamente. Zyngier *et al.*, (1989) não observaram toxicidade aguda provocada por $Rh_2(H_2cit)_4$ em doses de até 260 mg/kg deste complexo em camundongos *Swiss* portadores do tumor ascítico de Ehrlich. Carneiro (2011) utilizou em seu estudo 2 mg/kg de doses totais de $Rh_2(H_2cit)_4$ e Peixoto (2012) usou 14, 1 mg/kg, e não observaram toxicidade aguda provocada por $Rh_2(H_2cit)_4$, em camundongos BALB/c portadores de carcinoma mamário induzidos por células 4T1. A fim de identificar uma dose adequada para os testes biológicos, a proposta foi trabalhar com doses em que não havia sido observada toxicidade em animais sadios e portadores de tumor, conforme relatado por esses autores. A dosagem de citrato de ródio utilizada no presente estudo foi de 8 mg/kg (40 mg/kg de dose total). Peixoto (2012), usou 22, 3 mg/kg de ferro (dose total) no tratamento dos animais, enquanto, nesse estudo foram utilizados 216 mg/kg de peso corpóreo/dia de ferro nos tratamentos de Magh-Cit e Magh- $Rh_2(H_2cit)$. Para garantir uma margem de segurança em humanos, estudos com animais devem sempre extrapolar a dose, a fim de obter uma dosagem mínima a ser utilizada para observar os efeitos adversos que este composto possa causar (ARCANJO, 2014).

O acompanhamento da massa corporal do animal é um importante indicador de avaliação da toxicidade do tratamento utilizado (COSTA *et al.*, 2012). Nesse sentido, os animais foram pesados antes de iniciar o tratamento e durante o mesmo. O peso dos animais não foi alterado pelos tratamentos quando comparados ao grupo controle (sadio), mostrando que as doses de Magh-Cit, Magh- $Rh_2(H_2cit)$ e $Rh_2(H_2cit)_4$ não apresentaram toxicidade nos animais tratados.

Quanto ao perfil bioquímico dos animais, os níveis de creatinina estão dentro dos valores de referência (animais sadios). Nos animais controle com tumor (salina) foi observado aumento em relação aos outros grupos, porém não apresentou diferenças significativas. A elevação nos níveis plasmáticos de creatinina é um indicativo de

sobrecarga renal, nefrotoxicidade, insuficiência renal aguda ou, ainda, de aumento no catabolismo proteico (VIJAYALAKSHMI *et al.*, 2000; STEVEN & SCOTT, 2002; ADEBAYO *et al.*, 2003). O aumento da creatinina ocorre quando se faz uso de um composto que pode causar toxicidade renal, comprometendo a eficiência da filtração glomerular e conseqüentemente a redução da excreção urinária da creatinina, causando aumento do seu nível no sangue (STEVEN & SCOTT, 2002). Neste estudo, os níveis de creatinina se mantiveram normais. Dessa forma pode-se sugerir que os tratamentos não causaram sobrecarga renal.

A enzima transaminase pirúvica (TGP) ou também chamada de alanina aminotransferase (ALT), é um importante indicador de lesão nas células hepáticas provocadas por drogas tóxicas ou por infecções (MARTIN *et al.*, 1981). As transaminases estão amplamente distribuídas nos tecidos, no caso da transaminase pirúvica encontra-se predominantemente no fígado, rim e coração. É considerada como um sensível indicador de dano hepatocelular e, dentro dos limites, pode fornecer uma avaliação quantitativa do grau de danos sofridos pelos hepatócitos (ALHABORI *et al.*, 2002). Na prática clínica de pequenos animais é comum a detecção de anormalidades nas atividades séricas das enzimas hepáticas. Muitos processos patológicos envolvendo o fígado podem causar elevações nas enzimas hepáticas uma vez que há à variação na distribuição de cada enzima específica no lóbulo hepático, bem como essas mudanças podem ser induzidas por agentes químicos exógenos, incluindo fármacos (COSTA *et al.*, 2012). O presente estudo sugere que os tratamentos utilizados podem não ser hepatotóxicos, uma vez que foi observada diminuição significativa da transaminase pirúvica nos grupos controle com tumor sem tratamento e tratados com Magh-Rh₂(H₂cit), sugerindo que este composto pode induzir efeito hepatoprotetor, ou ainda, que a redução tem relação com a presença do tumor e não com os tratamentos utilizados, já que houve redução também no grupo controle com tumor que não recebeu tratamento.

O hemograma é dividido em eritrograma, leucograma e plaquetograma, sendo um dos exames mais prescritos para diagnóstico de várias doenças. A toxicidade associada a terapias contra o câncer, frequentemente, resulta em um diagnóstico de anemia, risco de infecções, neutropenia (baixa contagem de neutrófilos), entre outros (DJAZAYERI *et al.*, 2005). Os parâmetros avaliados no eritrograma não tiveram diferença estatística quando comparado com o grupo controle sadio.

Houve uma intensa leucocitose em animais dos grupos Magh-Cit e Rh₂(H₂cit)₄, e este aumento provavelmente foi em decorrência da existência do tumor ou devido a processos inflamatórios envolvidos nesta doença. Estevanato (2012) também verificou intensa leucocitose em camundongos BALB/c com carcinoma mamário induzido por células 4T1, tratados com nanopartículas de maghemita revestidas de nanocápsulas de selol. Ocorreu aumento no número de monócitos e neutrófilos do grupo tratado com Magh-Rh₂(H₂cit). O mesmo foi observado por Portilho (2011) em camundongos portadores de carcinoma mamário de Ehrlich. Os linfócitos podem diminuir devido ao tratamento com quimioterápicos ou pelo aumento do estresse oxidativo, que ocorrem em uma grande variedade de tumores, em decorrência da diminuição de enzimas antioxidantes (DURSUN *et al.*, 2006). Os resultados obtidos não revelaram diferenças significativas de linfócitos. Para os bastonetes, eosinófilos e basiófilos não houve diferença significativa.

O volume plaquetário médio é o índice da média do diâmetro das plaquetas (COMAR & SILVA, 2009). Esses valores são importantes por serem encontrados em diversas patologias, no caso do aumento do VPM há ocorrência em doenças como: diabetes (HEKIMSOY *et al.*, 2004), doenças cardíacas (HUCZEK *et al.*, 2005), hipertireoidismo (DOW *et al.*, 1994), pré-eclâmpsia (SANTOS & FILHO, 2004), esplenectomia (BESSMAN, 1986), entre outras. Nesses casos, a medula óssea é hiperproliferativa, e as células resultantes são fenotipicamente anormais (COMAR & SILVA, 2009). O VPM diminuído pode ser encontrado em casos de: sepse (YAGUCHI *et al.*, 2004), quimioterapia (BESSMAN, 1986), colite ulcerativa (KAPSORITAKIS *et al.*, 2001), hipotireoidismo (COMAR & SILVA, 2009) e anemia megaloblástica (BESSMAN, 1986). A análise do VPM neste estudo, revelou leve diminuição nos animais dos grupos Magh-Rh₂(H₂cit) e Magh-Cit, porém não significativa. O valor do VPM diminuído é comumente encontrado em pacientes que fazem uso de quimioterápicos (COMAR & SILVA, 2009).

De forma geral, os quimioterápicos interagem com o material genético das células provocando danos, principalmente nas células em proliferação celular, sejam elas tumorais ou normais, como por exemplo, as células da medula óssea (ESTEVANATO, 2012). Na avaliação de um composto químico em sistemas biológicos, a mielotoxicidade deve ser um fator considerado importante, já que as células da medula óssea apresentam altos índices mitóticos, sendo suscetíveis a compostos capazes de realizar ligações com o DNA, como os carboxilatos de ródio (II)

(CARNEIRO, 2011). Para investigar o potencial genotóxico dos tratamentos utilizados neste estudo, o percentual de fragmentação do DNA e as fases do ciclo celular foram avaliados em células da medula óssea. Ainda que a análise de ciclo celular não tenha apresentado diferença significativa entre os tratamentos, foi observado aumento de células na fase G1 (>80%) do ciclo celular de camundongos do grupo controle com tumor. Nos resultados de fragmentação do DNA o grupo controle com tumor apresentou altos índices de fragmentação e os grupos tratados não mostraram diferença significativa quando comparados ao grupo sadio. Os percentuais de fragmentação de DNA apresentados pelo grupo Magh-Rh₂(H₂cit)₄ foram baixos, próximos aos do grupo controle sadio. Possivelmente, a presença de fragmentação do DNA nas células de medula óssea dos camundongos é explicada pelo aumento da produção de radicais livres durante a evolução do tumor. Nossas células estão expostas diariamente a agentes oxidantes, radicais livres de todos os tipos, portanto é normal que as células sofram fragmentação de DNA. Entretanto mecanismos de reparo e enzimas antioxidantes agem continuamente para manter o equilíbrio (TONINI, 2008). Nossos resultados mostraram que os camundongos controle (sadios) e que receberam tratamento não apresentaram níveis elevados de fragmentação de DNA nas células de medula óssea. Provavelmente essas células da medula óssea são afetadas somente pelos radicais livres circulantes, quando estes estão com nível muito aumentado pela presença de uma doença como, por exemplo, o câncer de mama. Portanto, os animais saudáveis e tratados deste estudo possivelmente foram capazes de manter um equilíbrio entre os radicais livres e o sistema de reparo antioxidante. O aumento da fragmentação de DNA no grupo controle com tumor, pode ser em decorrência do aumento de radicais livres durante a evolução da doença e de um estágio avançado do tumor onde induz um maior estímulo da medula óssea para tentar manter a homeostase no organismo.

Obtendo as médias do volume do tumor de cada grupo, os tratamentos com Magh-Rh₂(H₂cit)₄ e Rh₂(H₂cit)₄ (8 mg de citrato de ródio II por kg de peso corpóreo) tiveram uma redução não significativa de 55% e 46% respectivamente, em relação ao grupo controle sem tratamento. Esses resultados estão em conformidade com os experimentos de Peixoto (2012), que utilizou as mesmas condições experimentais deste trabalho, quando também foi observada uma redução tumoral não significativa dos grupos tratados com Magh-Rh₂(H₂cit)₄ de 58,4% e Rh₂(H₂cit)₄ de 44,9% (2,0 mg/kg em sete aplicações). Essa redução na média do volume tumoral, mesmo que não significativa, pode ter relevância biológica e sugere que os compostos utilizados podem

ter atividade antitumoral em camundongos BALB/c. A redução do volume tumoral no grupo tratado com nanopartículas associadas ao citrato de ródio provavelmente deve-se ao fato dessas terem sido direcionadas de forma passiva para a região tumor, pelo efeito EPR, já que na região tumoral observa-se uma fraca drenagem linfática e uma vascularização heterogênea, com vasos mais largos que permitem a passagem com facilidade das nanopartículas e sua retenção no tumor (SARFATI *et al.*, 2011).

O peso do tumor é uma forma de avaliação direta do estado clínico do animal utilizado como um parâmetro para avaliar efeitos anti-neoplásicos. Esta forma de mensuração é considerada mais apropriada do que a mensuração do tumor por volume, embora esta seja a mais utilizada em estudos de câncer (KUKOWSKA-LATALLO *et al.*, 2005; TRISDALE, 2010). Os animais tratados somente com Magh-Cit mostraram um aumento não significativo no peso do tumor, que pode ocorrer devido à presença de edema inflamatório, em decorrência do tumor. O mesmo foi observado por Estevanato (2012) que também verificou o aumento do volume tumoral de camundongos portadores de carcinoma mamário, tratados com nanocápsulas magnéticas de selol. Os tratamentos com Magh-Cit e $Rh_2(H_2cit)_4$ mostraram um peso e volume do tumor maiores que o grupo tratado com nanopartículas associadas ao citrato de ródio. Nesse sentido, a associação do citrato de ródio se mostrou com um efeito antitumoral maior nos camundongos, possivelmente influenciado pelo tamanho reduzido das partículas que facilitaram o direcionamento deste composto para a região do tumor.

Como esperado, as análises histológicas dos tumores mostraram acúmulo de aglomerados de nanopartículas de maghemita decorrente do tratamento. Estes acúmulos de nanopartículas puderam ser observados na região central do tumor e na periferia. De forma geral, as células neoplásicas apresentam metabolismo mais rápido do que as células normais, demandando maior quantidade de nutrientes, como ferro (KWOK & RICHARDSON, 2002). Nanopartículas magnéticas são mais captadas pelas células tumorais do que as células normais, como mostrado por Carneiro (2011) através da análise de microscopia de luz, após coloração de Perls. As membranas das células tumorais também são mais permeáveis, o que permite a internalização das nanopartículas pelas mesmas. Nos tumores foram encontradas regiões com hemorragia, células com figuras mitóticas (fato que pode estar relacionado a um aumento da proliferação celular no tumor), área com infiltrado inflamatório intenso, (indicando uma resposta ao tumor, que pode ser decorrente da proliferação). A apoptose é uma forma de morte celular controlada. É desencadeada por excesso ou falta de estímulos de

crescimento, proliferação e dano celular. A célula em apoptose tem característica de ter tamanho reduzido, condensação da cromatina e fragmentação do DNA, levando ao aparecimento de núcleo picnótico (como encontrado neste estudo), formação de vacúolos autofágicos, dilatação de organelas citoplasmáticas como mitocôndria e complexo de Golgi (BRAS *et al.*, 2005; BOZETO, 2011).

A MEC tem efeitos sobre o comportamento celular e pode facilitar a progressão tumoral (NELSON *et al.*, 2006). Além disso, alterações da expressão de componentes específicos da MEC como a fibronectina e laminina têm sido associados a um pior prognóstico em pacientes com câncer de mama (YAO *et al.*, 2007).

É importante a identificação de marcadores que possam elucidar o comportamento do tumor e, especialmente em câncer de mama devido, à variabilidade na progressão clínica da doença (BAE *et al.*, 2013). Diante disso, a marcação das proteínas fibronectina e laminina foi realizada por imunohistoquímica para compreender se os tratamentos utilizados possuem alguma influência na expressão dessas proteínas. As marcações dessas proteínas nos tumores tratados foram estatisticamente semelhantes quando comparadas com as marcações dos animais não tratados. Foram analisadas as marcações das proteínas fibronectina e laminina na matriz extracelular, também chamada de estromal (CHRISTENSEN *et al.*, 1988; IOACHIM *et al.*, 2002; HAN *et al.*, 2006; BAE *et al.*, 2013), que embora seja a marcação mais estudada, ainda demonstra resultados inconsistentes quanto ao significado clínico da expressão. A marcação celular, ou também chamada de epitelial, tem sido investigada no câncer de mama, no entanto ainda não tem sido relatado o seu significado clínico (RYU *et al.*, 1998; IOACHIM *et al.*, 2002; ROWINSKY, 2004; BAE *et al.*, 2013).

Quanto as marcações da fibronectina celular, os resultados mostraram uma maior expressão dessa proteína nos grupos tratados com Magh-Rh₂(H₂cit)₄ e Rh₂(H₂cit)₄. Entretanto, na análise referente à marcação da fibronectina na matriz extracelular o grupo que não recebeu tratamento se manteve com níveis semelhantes ao tratado com Magh-Rh₂(H₂cit)₄, porém as diferenças observadas não foram significativas. A perda de fibronectina vem sendo estudada no processo de carcinogênese e os autores sugerem que esta proteína pode estar envolvida na livre migração das células neoplásicas (KOSMEHL *et al.*, 1999; ARMSTRONG & ARMSTRONG, 2000; LYONS *et al.*, 2001).

Chaves *et al.*, (2012) demonstraram que a proteína fibronectina tinha uma expressão reduzida após o tratamento por terapia gênica com endostatina em carcinoma

renal metastático. Por outro lado, o estudo realizado com 259 pacientes com câncer de mama, acompanhadas por 8 anos, demonstrou que as pacientes que apresentavam uma maior expressão dos receptores integrinas também apresentavam um aumento da expressão da fibronectina e este aumento estava relacionado com a maior sobrevivência dos pacientes, mostrando que a expressão da fibronectina tem um papel importante na progressão tumoral (KOSMEHL, *et al.*, 1999).

Nas análises referentes às marcações na célula (epitelial) e na matriz extracelular (estromal), pode-se observar, mesmo sem diferença significativa, uma maior expressão de laminina nos tratamentos com Magh-Rh₂(H₂cit)₄ e Magh-Cit, quando comparado com o grupo que não recebeu tratamento. A perda da laminina segundo Garcia *et al.*, (2006), pode ocorrer de forma gradual, à medida em que uma lesão aumenta o seu grau de malignidade. Estudos demonstram que em carcinomas epidermóides orais ocorre pronunciada perda de expressão da laminina e de seus receptores integrinas (BERNDT, *et al.*, 2001). Tosios *et al* (1998), evidenciaram uma tendência a perda da laminina durante o aumento gradativo de displasias e em áreas de invasão. Iwamoto, *et al* (1987), realizaram tratamentos com injeção de laminina em ratos portadores de carcinoma mamário, na qual, promoveu um aumento da formação de metástase no pulmão.

Provavelmente, estes resultados podem estar relacionados ao fato dos tratamentos não terem reduzido significativamente os tumores ou o mecanismo de ação das nanopartículas associadas ao citrato de ródio II não inclui alterações na MEC. Como ainda não haviam sido realizados estudos, nestas condições, que compara a expressão das proteínas fibronectina e laminina após o tratamento com Magh-Rh₂(H₂cit)₄, Magh-Cit e Rh₂(H₂cit)₄ em camundongos com câncer de mama, entende-se que ainda precisam ser feitos ajustes nos tempos e tratamentos para melhor elucidar este processo. Ainda, a eutanásia dos camundongos foi realizada seguida ao final dos tratamentos, talvez não houve tempo hábil para o tratamento modular as proteínas. Foi observado um alto desvio padrão nas quantificações das imunohistoquímicas, apesar de ter sido utilizada uma quantidade de fotos maior do que habitualmente utiliza-se na literatura. Talvez, se fosse aumentada a quantidade de fotos a serem analisadas reduziria o desvio padrão podendo obter um resultado significativo.

Nesse estudo, não foi possível determinar, por meio da PCR quantitativa em tempo real, o nível da expressão dos genes *Laminina* e *Fibronectina* em tecidos de tumores tratados ou não com Magh-Rh₂(H₂cit)₄, Magh-Cit e Rh₂(H₂cit)₄ e mama normal de camundongos BALB/c. Isso pode ter ocorrido, devido a expressão desses genes ser

extremamente baixa nessas condições experimentais, possuindo níveis de transcritos tão baixos que não foram detectáveis pela técnica de PCR quantitativo em tempo real utilizando SyBR Green. A extração do RNA também pode ser um fator que dificultou a detecção dos transcritos pela técnica de RT-qPCR, pois a eficiência da extração depende da homogeneização adequada dos tecidos, que pode ter sido dificultada, pelo fato das amostras de tumor ter uma característica de tecido mais fibroso (STEPHEN *et al.*, 2009).

Chandler *et al* (2011), mostraram a regulação da expressão do gene *Fibronectina* analisado em células 3T3-L1 por RT-PCR em tempo real, após serem expostas a fatores solúveis (fator de crescimento) secretados pelas células do tumor de mama. A clivagem proteolítica é um evento que ocorre durante a evolução tumoral que cliva componentes da lâmina basal, como as lamininas. A clivagem expõe sítios bioativos e muitos peptídeos derivados da clivagem da laminina, que já foram identificados como agentes de progressão tumoral. Santos (2011) mostrou que o peptídeo C16, é expresso na linhagem MDA-MB-231 de carcinoma invasivo de mama e mostrou que este atua na regulação da expressão de 11 genes promotores de invasão nesta linhagem, avaliados por RTq-PCR.

De maneira geral, os genes superexpressos em tumores primários envolvidos na degradação da matriz extracelular, possuem potencial metastático e aumentam a capacidade de disseminação das células tumorais, diferentemente de sítios de metástases onde os genes com superexpressão atuam na transição, transdução de sinal e resposta imune, proporcionando vantagens proliferativas e de sobrevivência celular (ELLSWORTH *et al.*, 2009).

7. Conclusões e Perspectivas

Diante do exposto, o objetivo geral deste estudo consistiu em analisar o efeito dos tratamentos Magh-Rh₂(H₂cit)₄, Magh-Cit e Rh₂(H₂cit)₄ na expressão das proteínas da matriz extracelular, laminina e fibronectina.

Com base nos resultados obtidos, é possível concluir que:

- Os tratamentos, na dosagem de 8 mg/kg de citrato de rádio e 216 mg/kg de ferro de peso corpóreo, administrado por via intratumoral em camundongos BALB/c portadores de carcinoma mamário, não produziu redução significativa do volume do tumor.
- A expressão dos componentes da matriz extracelular, fibronectina e laminina parecem aumentar sua deposição quando recebem o tratamento com as nanopartículas associadas ao citrato de rádio, embora não tenha sido significativo nas condições experimentais executadas. Portanto, mais estudos devem ser realizados para elucidar esta questão.
- Não foi possível detectar o efeito dos tratamentos sobre a expressão dos genes *Laminina* e *Fibronectina* por meio da PCR quantitativa em tempo real.
- Os tratamentos não induziram toxicidade nos animais tratados com Magh-Rh₂(H₂cit)₄, Magh-Cit e Rh₂(H₂cit)₄.
- Os tratamentos não induziram danos às células da medula óssea.

Os resultados obtidos nesse estudo podem ser somados aos outros da literatura e assim contribuir para o desenvolvimento de estratégias que possibilitem verificar a expressão das proteínas laminina e fibronectina no carcinoma mamário e sua importância na progressão da doença. Nesse sentido, mais estudos devem ser realizados de modo a correlacionar e elucidar os resultados desta pesquisa.

8. Referências Bibliográficas

ADEBAYO, J. O.; YAKUBU, M. T.; EGWIM, E. C.; OWOYELE, V. B.; ENAIBE, B. U. Effect of ethanolic extract of *Khaya senegalensis* on some biochemical parameters of rat kidney. **J Ethnopharmacol.** v. 88, n. 1, p. 69-72, 2003.

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. *Biologia molecular da célula*. 5ª ed. **Artmed.** p. 1065-1126, 2010.

AL-HABORI, M.; AL-AGHBARI, A.; AL-MAMARY, M.; BAKER, M. Toxicological evaluation of *Catha edulis* leaves: a long term feeding experiment in animals. **J Ethnopharmacol.** v. 83, n. 3, p. 209-17, 2002.

American Cancer Society. *Cancer Facts & Figures 2014*. Atlanta: **American Cancer Society**, 2014.

ARAÚJO, T. G. **Implicações clínicas de um anticorpo recombinante (Fab) construído e selecionado por Phage Display e avaliação do papel das citoqueratinas no Câncer de mama**. Universidade Federal de Uberlândia. Dissertação, 2012.

ARCANJO, R. B. **Efeito do nonilfenol na reprodução de fêmeas de camundongo**. Universidade de Brasília. Dissertação, 2014.

ARMSTRONG, P. B.; ARMSTRONG, M. T. Intracellular invasions and the organizational stability of tissues a role for fibronectin. **Biotech et biophys Acta**, v. 1470, p. 90-20, 2000.

AXELROD, R., AXELROD, D. E.; PIENTA, K. J. Evolution of cooperatiion among tumor cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 103, n. 36, p. 13474-13479, 2006.

BAE, Y. K.; KIM, A.; KIM, K. MIN.; CHOI, E. J.; KANG, H. S.; SOO, J, L. Fibronectin expression in carcinoma cells correlates with tumor aggressiveness and poor clinical outcome in patients with invasive breast cancer. **Hum Pathol.** v. 44, p.2028-2037, 2013.

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

BERNDT, A.; BORSI, L.; HYCLEL, P.; KOSMEHL, H. Fibrillary co-deposition of laminin-5 and large unspliced tenascin-C in the invasive front of oral squamous cell carcinoma in vivo and in vitro. **Journal of Cancer Res Clin Oncol**, v. 127 n. 5, p. 286-92, 2001.

BLUM, J. L.; ZEIGLER, M. E.; WICHA, M. S. Regulation of mammary differentiation by the extracellular matrix. **Environ. Health Perspect.**, v. 80, p. 71-83, 1989.

BOSMAN, F. T.; STAMENKOVIC, I. Functional structure and composition of the extracellular matrix. **J. Pathol.**, v. 200, n. 4, p. 423-428, 2003.

BOZETO, J. M. B. **Efeito antitumoral, genotóxico e mutagênico de nitensidina A em camundongos nude BALB/c com implante tumoral xenográfico de células imortalizadas com HPV-16 (SiHa)**. Universidade Estadual Paulista. Dissertação, 2011.

BRADFORD, M. M., A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRANCO, C. S. C. A.; DINIZ, M. F. F. M.; ALMEIDA, N. R.; SANTOS, B. H.; OLIVEIRA, M. K.; RAMALHO, A. J.; DANTAS, G. J. Parâmetros bioquímicos e hematológicos de ratos Wistar e camundongos Swiss do Biotério Professor Thomas George. **R bras ci Saude**. v. 15, n. 2, p. 209-214, 2011.

BRAS, M.; QUEENAN, B.; SUSIN, S. A. Programmed cell death via mitochondria: different modes of dying. **Biochemistry**. v. 70, p. 231-239, 2005.

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

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

CARNEIRO, M. L.B.; PEIXOTO, R. C. A.; JOANITTI, G. A.; OLIVEIRA, R. G. S.; TELLES, L. A. M.; VIVELA-MIRANDA, A. L.; BOCCA, A. L.; VIANNA, L. M. S.; SILVA, I. C. R.; SOUZA, A. R.; LAVACA, Z. G. M.; 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. Nanotechnol**. v. 11, n. 4, p. 2-13, 2013.

CARVALHO, A. A. **Estudo do potencial antimetastático da biflorina**. Universidade do Ceará. Dissertação, 2011.

CHAFFER, C. L.; WENBER, R. A. A Perspective on Cancer Cell Metastasis. **Science** 331, 1559, 2011.

CHANDLER, E. M.; SAUNDERS, M. P.; YOON, J. C.; GOURDON, D.; FISCHBACH, C.; Adipose progenitor cells increase fibronectin matrix strain and unfolding in breast tumors. **Phys. Biol**. v.8, 2011.

CHAVES, K. C.; TURAÇA, L. T.; PESQUERO, J. B.; MENNECIER, G.; CHAMMAS, R.; SCHOR, N.; BELINI, M. H. Fibronectin expression is decreased in metastatic renal cell carcinoma following endostatin gene therapy. **Biomed Pharmacother**. v. 66, n. 6, 2012.

CHAVES, L N. **Estudo de morte celular em células MCF-7 tratadas com citrato de ródio associado a nanopartículas de maghemita**. Dissertação. Universidade de Brasília. p.21, 2013.

CHIA, J.; KUSUMA, N.; ANDERSON, R.; PARKER, B.; ZAMURS, L.; NICE, E.; POULIOT, N. Evidence for a role of tumor-derived laminin-511 in the metastatic progression of breast cancer. **Am. J. Pathol.**, v. 170, n. 6, p. 2135-2148, 2007.

CHIDAMBARAM, M.; MANAVALAN. R.; KATHIRESAN. K. Nanotherapeutics to overcome conventional cancer chemotherapy limitations. **Journal of Pharmacology Science**, 14(1): p. 67-77, 2012.

CHO, K. J.; WANG, X.; NIE, S. M.; CHEN, Z.; SHIN, D. M. Therapeutic nanoparticles for drug delivery in cancer. **Clin Cancer Res**. V. 14, p. 1310- 1316, 2008.

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

CHRISTENSEN, L.; NIELSEN, M.; ANDERSON, J.; CLEMMENSEN, I. FN staining pattern and metastasizing ability of human breast carcinoma. **Cancer Res**. n. 48, p. 6227-6233, 1988.

CICHON, M A; DEGNIM C, A; VISSCHER, W D; RADISKY, C D. Microenvironmental influences that drive progression from benign breast disease to invasive breast cancer. **J. Mamary Gland Biol. Neoplaseia.**, v, 15, n. 4, p. 389-397, 2010.

COMAR, S. R.; SILVA, P. H. Determinação laboratorial e aplicação clínica dos parâmetros de volume plaquetário. **RBAC**, v. 41, n. 4, p. 257-265, 2009.

COSTA, P. J.; LOURENÇO, V. N.; SANTOS. P. M. C. C.; TOMÉ, R. A.; SOUSA, F. G.; SOUSA, P. D.; ALMEIDA, N. R.; FREITAS, M.R. Avaliação da toxicidade aguda e das alterações histopatológicas em camundongos tratados com fitol. **Rev. Cienc. Farm. Básica**. v. 33, n.3, p. 421-428, 2012.

COUVREUR, P.; VAUTHIER, C. Nanotechnology: Intelligent Design to Treat Complex Disease. **Pharmaceutical Research**, v. 23, n. 7, p. 1417-1450, 2006.

CTSU (Clinical Trail Service Unit), Radcliffe Infirmary (RI). Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. **Lancet**. v. 365, p. 1687-1717, 2005.

DALEY, W. P.; PETERS, S. B.; LARSEN, M. Extracellular matrix dynamics in development and regenerative medicine. **J. Cell Sci**. v. 121, p. 255-264, 2008.

DHANKHAR, R.; VYAS, S. P.; JAIN, A. K.; ARORA, S.; RATH, G.; GOYAL, A. K. Advances in novel drug delivery strategies for breast cancer therapy. **Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol**, v. 38, n. 5, p. 230-49, 2010.

DJAZAYERI, K.; SZILVÁSSY, Z.; PEITL, B.; PEITL, B.; NÉMETH, J.; NAGY, L.; KISS, A.; SZABÓ, B.; BENKO, I. Accelerated recovery of 5-fluorouracil-damaged bone marrow after rosiglitazone treatment. **European Journal of Pharmacology**, v. 522, p. 122–129, 2005.

DIERSSEN, J. W., MIRANDA, N. F.; MULDER, A.; VAN P. M., VERDUYN, W., CLAAS, F. H. High-resolution analysis of HLA class I alterations in colorectal cancer. **BMC Cancer**. P. 6: 233, 2006.

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

ELLSWORTH, R.E.; SEEBACH, J.; FIELD, L.A.; HECKMAN, C.; KANE, J.; HOOKE, J.A.; LOVE, B.; SHRIVER, C.D. A gene expression signature that defines breast cancer metastases. **Clin Exp Metastasis**. v. 26, p. 205-213, 2009.

ENGBRING, J A.; HOSSAIN, R.; VANOSDOL, S J.; KPLAN-SINGER, B.; WU, M.; HIBINO, S.; KOBLINSKI, J E. The laminin alpha-1 chain derived peptide, AG73, increases fibronectin levels in breast and melanoma cancer cells. **Clin. Exp. Metastasis**, v. 25, n. 3, p. 241-252, 2008.

ESTEVANATO, C. L. L. **Nanocápsulas magnéticas de selol para tratamento do câncer de mama experimental: avaliação in vitro e in vivo**. Tese. Universidade de Brasília, 2012.

FALQUEIRO, M. A; **Nanocápsulas contendo selol e fluido magnético: preparação, caracterização e avaliação da atividade antitumoral in vitro**. Dissertação. Universidade de São Paulo, 2011.

GARCIA, A. S.; HERNÁNDEZ, M. M. A.; SÁNCHEZ, E. F.; GONZALEZ, R. J.; VILLARDÓN, P. G.; HERNÁNDEZ, J. J. C.; SOPELANA, A. B. E-cadherin, laminin and colagem IV expression. In the evolution from dysplasia to oral squamous cell carcinoma. **Med Oral Patol Oral Cir Bucal**. v. 11, p. 100-105, 2006.

GAUMET, M.; VARGAS, A.; GURNY, R.; DELIE, F. Nanoparticles for drug delivery: The need for precision in reporting particle size parameters. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**. v. 69, p. 1-9, 2008.

GIANCOTTI, F. G.; RUOSLAHTI, E. Integrin signaling. **Science**, v. 285, n. 5430, p. 1028-1032, 1999.

GOELBERT, C.F.D.; LACERDA. L. L.; ALMEIDA, G. L; SANTANA. C. E.; OLIVEIRA. R. A.; MUNDSTEIN. S. A.; SAVINO.W.; VASCONCELOS. R. T. A. Laminin database: a tool to retrieve high-throughput and curated data for studies on laminins. **Nucleic Acids Research**, v. 39, 2011.

GOTO, H.; INOKO, A.; INAGAKI, M. Cell cycle progression by repression of primary cilia formation in proliferating cells. **Cell Mol Life Sci.**, v. 70, n. 20, p. 3893-3900, 2013.

GRAVINA, A.P. **Biomimetização de diferentes superfícies de titânio com fibronectina**. Instituto militar de engenharia. Dissertação, 2010.

GRAVITZ, L. Chemoprevention first line of defence, combinations of drugs are showing some promise as therapeutic agents that stop cancer before it starts. **Nature**. v. 471, 2011.

GRIEF, A. D.; RICHARDSON, G. Mathematical modelling of magnetically targeted drug delivery. **J Magn. Mater.** V. 293, p. 455-463, 2005.

GU, F. X.; KARNIK, R.; WANG, A. Z.; ALEXIS, F.; LEVY-NISSENBAUM, E.; HONG, S.; LANGER, R. S.; FAROKHZAD, O. C. Targeted nanoparticles for cancer therapy. **Nano Today**, v. 2, n. 3, p. 14-21, 2007.

GUDJONSSON, T.; ADRIANCE, M. C.; STERNLICHT, M. D.; PETERSEN, O. W.; BISSELL, M.; Myoepithelial cells: their origin and function in breast morphogenesis and neoplasia. **J. Mammary Gland Biol Neoplasia.**, v. 10, n. 3, p. 261-272, 2005.

HAN, S.; KHURI, F. R.; ROMAN, J. FN stimulates non-small cell lung carcinoma cell growth through activation of akt/mammalian target of rapamycin/S6 kinase and inactivation of LKB1/AMP-activated protein kinase signal pathways. **Cancer Res**. v. 66 p. 315-323, 2006.

HANAHAN, D & WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, p. 646-674, 2011.

HEGERFELDT, Y.; TUSCH, M.; BROCKER, E. B.; FRIEDL, P. Collective cell movement in primary melanoma explants. **Cancer Research**. v. 62, n. 7, p. 2125-2130, 2002.

HOHENESTER, E.; ENGEL, J. Domain structure and organization in extracellular matrix proteins. **Matrix Biol.**, v. 21, n. 2, p. 115-128, 2002.

HYNES, R. O. Targeted mutations in cell adhesion genes: what have we learned from them? **Dev. Biol.**, v. 180, n. 2, p. 402- 412, 1996.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. ABC do câncer: abordagens básicas para o controle do câncer (versão eletrônica). Rio de Janeiro: **INCA**. p. 21, 2011.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. Incidência de câncer no Brasil (versão eletrônica). Rio de Janeiro: **INCA**- <http://www.inca.gov.br>, 2014.

IOACHIM, E.; CHARCHANTI, A.; BRIASOULIS, E.; KARAVASULIS, V.; TSANOU, A.; ARVANITIS, D.; AGNANTIS, N. J.; PAVLIDIS, N. Immunohistochemical expression of extracellular matrix components tenascin, fibronectin, collagen type IV and laminin in breast cancer: their prognostic value and role in tumour invasion and progression. **Pergamon. European Journal of cancer**, v. 38, n. 18, p. 2362-70, 2002.

IWAMOTO, Y.; ROBEY, F. A.; GRAF, J.; SASAKI, M.; KLEINMAN, H. K.; YAMADA, Y.; MARTIN, G. R. YIGSR, a synthetic laminin pentapeptide, inhibits experimental metastasis formation. **Science**, v. 238, n. 4830, p. 1132-11334, 1987.

JAHKOLA, T.; TOIVONEN, T.; SMITTEN, V. K.; VIRTANEN, L.; WASENIUS, V-M.; BLOMQVIST, C. Cathepsin-D, urokinase plasminogen activator and type-1 plasminogen activator inhibitor in early breast cancer: an immunohistochemical study of prognostic value and relations to tenascin-C and other factors. **British Journal of Cancer**. v. 80, p. 167-174, 1999.

JOHNSEN, M.; LUND, R L.; ROMER, J.; ALMHOLT, K.; DANO, K. Cancer invasion and tissue remodeling: common themes in proteolytic matrix degradation. **Curr. Opin. Cell. Biol.** v. 10, n.5, p. 667-671, 1998.

JUNQUEIRA, L L & CARNEIRO, J. Histologia Básica. 12^a ed. Rio de Janeiro. Editora **Guanabara Koogan S. A.** p. 67-110, 2013.

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

KAVISLIA, U. A.; KORGUNA E. T.; AKKOYUNLUA G.; ARICIB, A.; DEMIRA, R. Expression of integrin $\alpha 5$ and integrin $\beta 4$ and their extracellular ligands fibronectin and laminin in human decidua during early pregnancy and its sex steroid-mediated regulation. **Elsevier**. v. 107, n. 3, p. 173-185, 2005.

KIERSZENBAUM, A. L & TRES, L. Histologia e Biologia Celular- Uma Introdução à Paologia. 3^a ed. **Elsevier/ Medicina Nacionais**. p. 122-124, 2012.

KLEIN, G.; LANGEGGER, M.; TIMPL, R.; EKBLÖM, P. Role of laminin A chain in the development of epithelial cell polarity. **Cell.**, v. 55, n. 2, p. 331-3341, 1988.

KOBLINSKI, J. E.; AHRAM, M.; SLOANE, B. F. Unraveling the role of proteases in cancer. *Clin Chim Acta*. v. 291, p. 113-135, 2000.

KOCBEK, P.; KRALJ, S.; KREFT, E. M.; KRISTL, J. Targeting intracellular compartments by magnetic polymeric nanoparticles. **Eur J Pharm Sci**. v. 50, p. 130-138, 2013.

KOSMEHL, H.; BERNDT, A.; STRASBURGER, S.; BORSI, L.; ROUSSELLE, P.; MANDEL, U.; Distribution of laminin and fibronectin isoforms in oral mucosa and oral squamous cell carcinoma. **Br J Cancer**. v, 81. p, 1071-1079, 1999.

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

KULKAMP, C. I.; PAESE, K.; GUTERRES, S.; POHLMANN, A. R. Estabilização do ácido lipoico via encapsulação em nanocápsulas poliméricas planejadas para aplicação cutânea. **Quím. Nova** [online]. v. 32, n. 8, p. 2078-2084, 2009.

KUNZ-SCHUGHART, L.A.; HEYDER, P.; SCHROLDER, J.; KNURCHEL, R. A. heterologous 3 D coculture model of breast tumor cells and fibroblast to study tumor associated fibroblast differentiation. **Experimen. Cell. Res.** v. 66, p. 74-80, 2001.

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

LODISH, H.; BERK, A.; KAISER, A. K.; MONTY, K.; BRESTCHER, A.; PLOEGH, H.; AMON, A. Biologia Celular e molecular. 7ª ed. **Artmed.** p. 930-935, 2014.

LUO, J.; SOLIMINI, N. L.; ELLEDGE, S. J. Principles of cancer therapy: oncogene and non-oncogene addiction. **Cell.** v. 136, p. 823-837, 2009.

LYONS, A. J.; BATEMAN, A. C.; SPEDDING, A.; PRIMROSE, J. N.; MANDEL, U. Oncofetal fibronectin and oral squamous cell carcinoma. **Br J oral Maxillofac Surg.** v. 36, n. 5, p. 471-477, 2001.

MALINDA, K. M & KLEINMAN, H. K. The laminins. **J. Biochem Cell Biol.**, v. 28, n. 9, p. 957-959, 1996.

MANABE, R.; OHE, N.; MAEDA, T.; FUKUDA, K.; SEKIGUCHI. Modulation of cell-adhesive activity of fibronectin by the alternatively spliced EDA segment. **J Cell Biol.** v, 139. P. 295-307, 1997.

MARCHAL, J. A., RODRIGUEZ-SERRANO. F., CAMPOS, J., MADEDDU, R., BOAULAIZ, H., MARTINEZ-AMAT, A. Differentiation: an encouraging approach to anticancer therapy. **Ital J. Anat Embryol.** V. 111, p. 45-64, 2006.

MARSDEN, M. J.; WRIGHT, L.; CARRIER, K.; MOROZ, R.; POCHAMPALLY, B. G.; ROWAN, A. A novel in vivo model for the study of human breast cancer metastasis using primary breast tumor-initiating cells from patient biopsies. **BMC Cancer.** v.12, n. 10, 2012.

MARTIN, D. W.; MAYES, P. A.; RODWELL, Y. W. HARPER'S Review of Biochemistry. **Lange Medical.** p. 688, 1981.

MASSART, R.; Magnetic fluids and process for obtaining them. Agence Nationale De Valorisation De La Recherche (Anvar). **US Patente** 4, 329, 241, 1982.

MCPHERSON, K.; STEEL, C. M.; DIXON, J. M. ABC of breast diseases Breast cancer-epidemiology, risk factors, and genetics. **B.M.J.**, v. 321, n. 7261, p 624-628, 2000.

MIRANDA, J. L. **Expressão de proteínas da matriz extracelular em carcinoma epidermóide de lábio inferior e língua.** 119f. Tese. Departamento de Odontologia da UFRN, Natal-RN, 2002.

MOHRI, H. Fibronectin and integrins interactions. **J Invest Med.** v, 44. p, 429-441, 1996.

MOSCATELLI, D.; JOSEPH-SILVERSTEIN, J.; PRESTA, M.; RIFKIN, D. B. Multiple forms of an angiogenesis factor: basic fibroblast growth factor. **Biochimie.**, v. 70, n. 1, p. 83-87, 1998.

NAM, J. M.; ONODERA, Y.; BISSELL, M. J.; CATHERINE, C. P.; Enhanced radioresponse after coordinate targeting of integrin $\alpha 5\beta 1$ and Fibronectin. **Cancer Res.** v.70, n. 30, p. 5238-5247, 2010.

NARDIN, J. M.; **Atividades biológicas da uleína.** Dissertação. Universidade Federal do Paraná, 2006.

NELSON, C. M.; VANDUIJIN, M. M.; INMAN, J. L.; FLETCHER, D. A.; BISSELL, M.J. Tissue geometry determines sites of mammary branching morphogenesis in organotypic cultures. **Science.** v. 314. P. 298-300, 2006.

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

NOTHENBERG, M. S.; SOUZA, R. A.; MATOS, R. J. Synthesis and physicochemical characterization of rhodium sulfosalicylate. **Polyhedron.** v. 19, p. 1305- 1309, 2000.

NUNES, E. S.; SOUZA, A. R.; CARNEIRO, M. L. B.; PEIXOTO, R. C. A.; LACAVA, Z. M. G.; BÁO, S. N.; MORAIS, P. C. Colloid preparation of maghemite nanoparticles functionalized with dirhodium (II) citrate. **8th International Conference on the Scientific and Clinical Applications of Magnetic Carriers.** p. 143, 2010.

PASETTO, L. M.; D'ANDREA, M. R.; BRANDES, A. A.; ROSSI, E.; MONFARDINI, S. The development of platinum compounds and their possible combination. **Crit Rev Oncol Hematol**, v. 60, n. 1, p. 59-75, 2006.

PATARROYO, M.; TRYGGVASON, K.; VIRTANEN, I. Laminin isoforms in tumor invasion, angiogenesis and metastasis. **Semin. Cancer Biol.**, v. 12, n. 3, p. 197-207, 2002.

PATERNO, L. G.; SOLER, G. A. M.; FONSECA, J. F.; SINNECKER, P. J.; SINNECKER, P. C. H. E.; LIMA, D. C. E.; NOVAK, A. M.; MORAIS, C. P. Layer-by-Layer Assembly of Bifunctional Nanofilms: Surface-Functionalized Maghemite Hosted in Polyaniline. **J. Phys. Chem. C.** v.133, n. 13, p. 5087-5095, 2009.

PEER, D.; KARP, J. M.; HONG, S.; FAROKHZAD, O. C.; MARGALIT, R.; LANGER, R. Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy. **Nat Nanotechnol.** v. 2, p. 751 – 760, 2007.

PEIXOTO, R. **Avaliação toxicológica e antitumoral do tratamento sistêmico com citrato de ródio (II) livre e associado a nanopartículas de maghemita em modelo experimental de câncer de mama.** 106f. Dissertação. Universidade de Brasília, 2012.

PEREIRA, L.A.; VERAS, S. S. L.; SILVEIRA, J. D. E.; SEABRA, F. R. G.; PINTO, L. P; SOUZA, L. B; FREITAS, R. A. The role of extracellular proteins matrix and the metalloproteinases in head and neck carcinomas: an update review. **Rev Bras Otorrinolaringol.** v.71, n.1, p. 81-6, 2005.

PLACE, A. E.; JIN HUH, K.; POLYAK, K. The microenvironment in breast cancer progression: biology and implications for treatment, **Breast Cancer**, 2011.

POLYAK, K & KALLURI, R. The role of the microenvironment in mammary gland development and cancer, **Cold Spring Harb Perspect Biol**, 2010.

PORTILHO, F. A. **O uso de nanoesferas de albumina na terapia fotodinâmica e magnetohipertermia do tumor de Ehrlich.** Tese. Universidade de Brasília, 2011.

POTTS, J. R.; CAMPBELL, I. D. Structure and functions of fibronectin modules. **Matrix Biol.** v. 15, p. 313-20, 1996.

PULASKI, B. A & OSTRAND-ROSENBERG, S. Mouse 4T1 Breast Tumor Model. **Current Protocols in Immunology**, cap. 20.2, 2001.

RASBAND, W. S. ImageJ. U. S. N. **National Institutes of Health**, Bethesda, Maryland, USA, 1997-2014.

REIBSCHEID, E. M.; ZYNGIER, S.; MARIA, D. A.; MISTRONE, R. J.; SINISTERRA, R. D.; COUTO, L. G.; NAJJAR, R. Antitumor effects of rhodium (II) complexes on mice bearing Ehrlich tumors. **Braz J Med Biol Res.** v. 27, n. 1, p. 91-4, 1994.

RIETHDORF, S.; WIKMAN, H.; PANTEL, K. Biological relevance of disseminated tumor cell in cancer patients. **Int J. Cancer.** v. 123, p. 1991-2006, 2008

ROBBINS, S. L. & COTRAN, R. S. **Patologia – Bases Patológicas das Doenças.** 8ª. Rio de Janeiro: **Elsevier.** p. 1065 - 1098, 2010.

ROWINKSY, E. K. Targeting the molecular target of rapamycin (mTOR). **Curr Opin Oncol.** v. 16, p. 564-575, 2004.

RUOSLAHTI, E & MORLA, A. A fibronectin self-assembly site involved in fibronectin matrix assembly: reconstruction in a synthetic peptide. **J. of Cell Biol.** v. 118, n. 2, p. 421- 429, 1992.

RYU, S.; JIMI, S.; EURA, Y.; KATO, T.; TAKEBAYASHI, S. Retention of intracellular FN expression in primary and metastatic thyroid carcinoma: an immunohistochemical study. **Cancer Lett.** v. 133, p. 215-222, 1998.

SAFARI, J & ZARNEGAR, Z. Advanced drug delivery systems: nanotechnology of health design A Review. **J. Saudi Chem. Soc.** v. 18, p. 85-99, 2014.

SANTOS, E. S; **Análise por microarray de genes diferencialmente expressos em linhagem celular de câncer de mama (MDA-MB-231) tratada com peptídeo bioativo da laminina c16.** Dissertação. Universidade de São Paulo, 2011.

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

SCHIMITT, F & GOBBI, H. Mama. In: Brasileiro-filho, G. (Ed). Bogliolo: Patologia. **Guanabara Koogan.** p. 613-643, 2006.

SHI, X & WU, C. A suppressive role of mitoge inducible Gene-2 in mesenchymal câncer cell invasion. **Mol Cancer Res.** v. 6, n. 5, p. 715-724, 2008.

STEPHEN, A.; BUSTIN, V. B.; JEREMY, A.; The MiqE Guidelines: Minimum information for publication of Quantitative Real-Time PCR experiments. **Clin Chem.** v. 55, p. 611-122, 2009.

STOCKHOFE, K.; POSTEMA, J. M.; SCHIEFERSTEIN, H.; ROSS, L.T.; Radiolabeling of Nanoparticles and Polymers for PET imaging. **Pharm.** v. 7, n. 4, p. 392-418, 2014.

SINGH, R., LILLARD JR, J. W. Nanoparticle-based targetet drug delivery. **Exp. Mol. Pathol.** v. 86, p. 215-223, 2009.

SIU, K.Y. M.; WILL, M. LEE.; YAN CHENG. The interplay of collagen IV, tumor necrosis factor inhibitor of matalloproteases-1 in the basal laminina regulates Sertoli cell-tight junction dynamics in the rat testis. **Endocrinology.** v. 144, 1z:371–387, 2003.

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

STEVEN, L. S & SCOTT, M. Urinary system. In: Fundamentals of veterinary clinical pathology. **Iowa State.** p. 277-336, 2002.

STREULI, C. H.; SCHMIDHAUSER, N. B.; YURCHENCO, A. P.; SKUBITZ, A. P.; ROSKELLEY, C.; BISSELL, M. J. Laminin mediates tissue-specific gene expression in mammary epithelial. **J. Cell Biol.** v. 129, n. 3, p. 591-603, 1995.

TAYLOR, C. R.; LEVENSON R. M. Quantification of immunohistochemistry – Issues concerning methods, utility and semiquantitative assessment II. **Histopathology.** v 49, n. 4, p. 441-424, 2006.

THIERY, J. P & SLEEMAN, J. P. Complex networks orchestrate epithelial-mesenquimal transitions. **Nat Rev Mol cell bio.** v. 7, p. 131-142, 2006.

THORCHILIN, V. Tumor delivery of macromolecular drugs based on the EPR effect. **Elsevier**, Northeastern University, Boston, USA, 2011.

THORUP, A. K.; REIBEL, J.; SCHIODT, M.; STERNERSEN, T. C.; THERKILDSEN, M. H.; CARTER, W. G. Can alterations in integrin and lamin-5 expression be used as markers of malignancy? **APMIS**. v. 106, p. 1170-80, 1998.

TONINI, C. L. **Análise Temporal do número e genotoxicidade de células-tronco de medula óssea de camundongos ateroscleróticos**. Universidade Federal do Espírito Santo. Dissertação, 2008.

TOSIOS, K. I.; KAPRANOS, N.; PAPANICOLAOU, S. I. Loss of basement membrane components laminin and type IV collagen parallels the progression of oral epithelial neoplasia. **Histopathol**. v. 33, n. 3, p. 261-268, 1998.

TRISDALE, M. J. Cancer cachexia. **Curr Opin Gastroenterol**. v. 26, n. 2, p. 146-151, 2010.

TRICHOPOULOS, D.; ADAMI, H.; EKBOM, A.; HSIEH, C.; LAGIOU, P. Early life events and conditions and breast cancer risk: from epidemiology to etiology. **Int. J. Cancer**, v. 122, n. 3, p. 481-485, 2008.

VALASTYAN, S.; WENBERG, R. A. Tumor metastasis: Molecular insights and evolving paradigms. **Cell**, v. 147, n. 14, p.275, 2011.

VIJAYALAKSHMI, T.; MUTHULAKSHMI, V. S. P.; SACHDANANDAM, P. Toxic studies on biochemical parameters carried out in rats with serankottai nei, a siddha drug-milk extract of *Semecarpus anacardium* nut. **J Ethnopharmacol**. v. 69, n. 1, p. 9-15, 2000.

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

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

WOESSNER, J. R.; J. F. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. **FASEB J**. v. 5, n. 8, p. 2145-2154, 1991.

YAGUCHI, A.; LOBO, F. L.; VICENT, J. L.; PRADIER, O. Platelet function in sepsis. **J Thromb Haemost**. v. 2, p. 2096-102, 2004.

YAO, E. S.; ZHANG, H.; CHEN, Y.Y. Increased $\beta 1$ integrin is associated with decreased survival in invasive breast cancer. **Cancer Res**. v. 67. P. 659-664, 2007.

ZHANG, C. X. & S. J. LIPPARD. New metal complexes as potential therapeutics. **Curr Opin Chem Biol**. n. 7, v. 4, p. 481-489, 2003.

ZHAO, G.; LIN, H. Metal complexes with aromatic N-containing ligands as potential agents in cancer treatment. **Curr Med Chem Anticancer Agents**. v. 5, n. 2, p. 137-47, 2005.

ZHAO, J.; LU, B.; XU, H.; TONG, X.; WU, G.; ZHANG, X.; LIANG, A.; CONG, W.; DAI, J.; WANG, H.; WU, M.; GUO, Y. Thirty-kilodalton Tat-interacting protein suppress tumor metastasis by inhibition of osteopontin transcription in human hepatocellular carcinoma. **Hepatology**. v. 48, n. 1, p. 265-275, 2008.

ZIOBER, B. L.; LIN, C.S.; KRAMER, R. H. Laminin-binding integrins in tumor progression and metastasis. *Semin. Cancer Biol.* v. 7, n. 3, p. 119-128, 1996.

ZYNGIER, S; KIMURA, E; NAJJAR, R. Antitumor effects of rhodium (II) citrate in mice Bering Ehrlich tumors. **Braz J Med Bio Res**. v. 22, n. 3, p. 397-401, 1989.

9. Anexo



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

Brasília, 16 de julho de 2013.

DECLARAÇÃO



Declaramos que o projeto intitulado "**APOIO A LABORATÓRIOS DE BIOFÁRMACOS (PROGRAMA NACIONAL DE PÓS-DOCTORADO - PNPD INSTITUCIONAL/CAPEIS)**", UnBDOC n.º 32978/2013, sob responsabilidade da Professora Marcella Lemos Bretas Carneiro foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília.


 Prof. Fernando Pacheco Rodrigues
 Coordenador da CEUA

