



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

ELIS REGINA LIMA SIQUEIRA

**Nanoestruturas magnéticas revestidas com ouro como agente
indutor de magneto-hipertermia para tratamento de câncer de
mama**

Brasília – DF

2019

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

ELIS REGINA LIMA SIQUEIRA

Nanoestruturas magnéticas revestidas com ouro como agente indutor de magneto-hipertermia para tratamento *in vivo* de câncer de mama

Tese apresentada ao Programa de PósGraduação em Nanociência e Nanobiotecnologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília como requisito para obtenção do título de Doutora em Nanociência e Nanobiotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Paulo César de Moraes

Co-orientador: Prof. Dr. Ricardo Bentes de Azevedo

Brasília, DF

2019

ELIS REGINA LIMA SIQUEIRA

NANOESTRUTURAS MAGNÉTICAS REVESTIDAS COM OURO
COMO AGENTE INDUTOR DE MAGNETO-HIPERTERMIA PARA
TRATAMENTO DE CÂNCER DE MAMA

Tese apresentada ao Programa de PósGraduação em Nanociência e Nanobiotecnologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília como requisito para obtenção do título de Doutora em Nanociência e Nanobiotecnologia.

MEMBROS COMPONENTES DA BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Paulo César de Moraes
(Presidente)

Prof. Dr. Ricardo Bentes de Azevedo
(Membro Titular)

Prof. Dra. Maria de Fátima Menezes Almeida Santos
(Membro Titular)

Profª. Dra. Rosângela Vieira de Andrade
(Membro Externo)

Prof. Dr. Marcelo Henrique Sousa
(Suplente)

Brasília, 21 de março de 2019

*Dedico este trabalho a
minha mãe, Maria do
Socorro Ferreira Lima*

AGRADECIMENTOS

“Não te olvides do valor da gratidão nos passos da vida. A cada instante estás chamado ao reconhecimento pelas concessões que te enriquecem em experiências, em iluminação, em saúde, em paz e não apenas ante os valores transitórios das moedas e dos títulos que muito se disputam na Terra. ”

(Joanna de Ângelis)

Aos meus pais, José Siqueira e Maria Lima, pelo apoio desde o início.

Ao meu irmão caçula, Paulo Ricardo que foi minha maior motivação.

Aos meus irmãos Glaucia Campos e Marcos Paulo que são meus companheiros leais.

Ao David, que sutilmente me encorajou a enfrentar as dificuldades.

Ao meu orientador, Paulo César de Moraes, que acreditou no potencial do projeto e permitiu que eu evoluísse como profissional.

Ao professor Ricardo Bentes, pela credibilidade e disponibilidade do Laboratório.

Ao professor Marcelo Sousa pela parceria profissional e concessão das amostras.

Aos meus amigos que contribuíram para o desenvolvimento desse trabalho: Débora Costa; Daniela; Alicia.

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

RESUMO

O câncer de mama representa 25% do total de todas as neoplasias no mundo com alta taxa de mortalidade e morbidade. Apesar das melhorias no tratamento por radioterapia, esta modalidade terapêutica ainda pode atingir células normais, induzindo aos efeitos colaterais tardios que se manifestam por atrofias e fibroses e, além disso, os efeitos colaterais imediatos que diminuem a qualidade de vida do paciente. A terapêutica pelos métodos convencionais, como cirurgias, quimioterapias e radioterapias são dificultadas quando o diagnóstico do carcinoma, encontra-se em estados mais adiantados. No sentido de suprir a demanda por tratamento de câncer de mama, o uso da Terapia por Magnetohipertermia para o tratamento de patologias, já vem sendo utilizada pela empresa alemã Magforce, cujo procedimento consiste no aumento de temperatura em uma região do corpo que esteja afetada pela neoplasia, com o objetivo de causar a lise celular. As nanopartículas magnéticas têm sido utilizadas experimentalmente em um número considerável de aplicações como agentes de contraste por Imageamento por Ressonância Magnética (IRM), hipertermia e entrega de drogas. Essas aplicações utilizam, geralmente, fluidos magnéticos que contêm nanopartículas de óxido de ferro, baseados em ferritas: óxidos de ferro, que possuem aprovação para uso clínico graças a sua biocompatibilidade e biodegradabilidade. Nesse sentido, as nanopartículas magnéticas, inserem-se no esforço multidisciplinar internacional que objetiva combater o câncer: a segunda maior causa de morte no mundo. Neste trabalho, uma nova amostra de fluidos magnéticos, composta de nanopartículas de maghemita revestidas com ouro foi testada quanto ao seu potencial para tratamento do câncer de mama com magnetohipertermia (MHT). Usando ambos: óxido de ferro e ouro, um sistema que explora a química da superfície do ouro, mantendo as características magnéticas do óxido de ferro. A avaliação *in vivo* demonstra a eficácia da amostra como indutor térmico em magnetohipertermia para tratamento de câncer de mama uma vez que foi possível uma redução de 62% do volume tumoral em um regime de tratamento de um ciclo de 5 dias consecutivos de exposição ao campo magnético alternado com frequência de 333,8 kHz.

Palavras-chave: nanopartículas magnéticas, ouro, magnetohipertermia, câncer de mama

ABSTRACT

Breast cancer accounts for 25% of all neoplasms in the world with a high rate of mortality and morbidity. Despite improvements in radiotherapy treatment, this therapeutic modality can still reach normal cells, inducing late side effects that are manifested by atrophies and fibrosis and, in addition, the immediate side effects that decrease the patient's quality of life. Conventional methods such as surgeries, chemotherapies and radiotherapies are difficult when the diagnosis of carcinoma is found in earlier states. In order to meet the demand for treatment of breast cancer, the use of magnetohyperthermia therapy for the treatment of pathologies, has been used by the German company Magforce whose procedure consists in the increase of temperature in a region of the body that is affected by the neoplasm, with the aim of causing cellular lysis, which is the process of rupture or dissolution of the plasma membrane, resulting in cellular necrosis. These applications generally use magnetic fluids that contain iron oxide nanoparticles, based on ferrites: iron oxides, which are approved for clinical use thanks to their biocompatibility and biodegradability. In this sense, magnetic nanoparticles are inserted into the international multidisciplinary effort that aims to combat cancer: the second leading cause of death in the world. In this work, a new sample of magnetic fluids, consisting of gold-coated maghemite nanoparticles was tested for their potential for breast cancer treatment with magnetohyperthermia (MHT). Using both: iron oxide and gold, a system that explores the chemistry of the gold surface, maintaining the magnetic characteristics of iron oxide. In vivo evaluation demonstrated that the thermal magnetohyperthermia inducer therapy for breast cancer treatment was once there was a 62% reduction of tumor volume in a treatment regimen of a cycle of 5 consecutive days of magnetic field exposure alternating with a frequency of 333.8 kHz.

Keywords: magnetic nanoparticles, gold, magnetic hyperthermia, breast cancer

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Equipamento gerador de campo magnético de frequência alternada (MagneTherm, NanoTherics). À esquerda, osciloscópio; ao centro, a fonte de tensão; e à direita a bobina geradora do campo magnético.	14
Figura 2. Esquema das nanopartículas de maghemita cobertas com ouro. MNP@Au representa as nanopartículas contendo ouro e MNP as nanopartículas sem a adição de ouro.....	33
Figura 3. Variação dos fluidos MNP, MNP@Au1 e MNP@Au2 em função do pH Para as amostras MNP, MNP@Au1 e MNP@Au2 quando colocadas no equipamento gerador de CMA na frequência de 111,2 kHz, tensão de 27 V, corrente de 11,7 A e campo magnético de 25 mT.	38
Figura 5. Variação da temperatura em função do tempo de medição. Para as amostras MNP, MNP@Au1 e MNP@Au2 quando colocadas no equipamento gerador de CMA na frequência de 167 kHz, tensão de 21,8 V, corrente de 7,6 A e campo magnético de 17 mT.....	38
Figura 6. Variação da temperatura em função do tempo de medição Para as amostras MNP, MNP@Au1 e MNP@Au2 quando colocadas no equipamento gerador de CMA na frequência de 631 kHz, tensão de 21 V, corrente de 4,6 A e campo magnético de 9 mT.	39
Figura 7. Variação da temperatura em função do tempo de medição. Para as amostras MNP, MNP@Au1 e MNP@Au2 quando colocadas no equipamento gerador de CMA na frequência de 333,8 kHz, tensão de 32,1 V, corrente de 8,2 A e campo magnético de 17 mT.....	39
Figura 8. Variação da temperatura em função do tempo de medição para as amostras MNP, MNP@Au1 e MNP@Au2 quando colocadas no equipamento gerador de CMA na frequência de 472,6 kHz, tensão de 26 V, corrente de 6,3 A e campo magnético de 11 mT.....	39
Figura 9. Análise da viabilidade das células de adenocarcinoma mamário murino (4T1- <i>luciferase</i>), submetidas ao tratamento com MNP em diferentes concentrações, por um período de 24 e 48 horas.....	41
Figura 10. Análise da viabilidade das células de adenocarcinoma mamário murino (4T1- <i>luciferase</i>), submetidas ao tratamento com MNP@Au1 em diferentes concentrações, por um período de 24 e 48 horas.....	42

Figura 11. Fotomicrografia de células de adenocarcinoma mamário 4T1 - <i>luciferase</i> incubadas ou não com nanopartículas magnéticas. (A e B) Células controle, as quais não tiveram contato com nanopartículas. (C e D) Células incubadas com fluido MNP. (E e F) Células incubadas com fluido MNP@Au1. Setas vermelhas indicam as nanopartículas magnéticas.	43
Figura 12. Peso corporal de camundongos (n=5) acompanhados durante o tratamento, ciclo de 5 dias e, após 7 dias do tratamento. GO corresponde ao grupo saudável; G1, grupo sem tratamento; G2, grupo tratado com MNP; G3, grupo tratado com MNP@Au1.	44
Figura 13. Monitoração do desenvolvimento do adenocarcinoma mamário murino durante 12 dias.....	45
Figura 14. (A) Seção histológica da mama normal, grupo saudável. (B) Seção histológica da mama do grupo controle, detalhe mostrando tumor (*) e necrose isquêmica (*).....	46
Figura 15 (A) Seção histológica do fígado do camundongo sem tumor, sem fluido magnético. (B) Seção histológica do fígado do camundongo do grupo controle, nota-se degeneração hidrópica (seta laranja). (C) Seção histológica do fígado do camundongo tratado com fluido MNP, nota-se Hematopoiese (*). (D) Seção histológica do fígado do camundongo do grupo tratado com MNP@Au1, * vermelho indicando hematopoiese (HE, 200X).	47
Figura 16 (A) Seção histológica do baço do camundongo sem tumor, sem fluido magnético, nota-se hematopoiese, indicado com seta laranja. (B) Seção histológica do baço do camundongo do grupo controle, * vermelho, hiperplasia linfoide. (C) Seção histológica do baço do camundongo com fluido MNP aplicado no tumor, a seta laranja é um indicativo de hematopoiese, * vermelho, hiperplasia linfoide. (D) Seção histológica do baço, seta laranja indicando hematopoiese e * vermelho, hiperplasia linfoide. (HE, 100X).....	48
Figura 17. Seções histológicas dos pulmões dos camundongos 11 dias após a injeção dos fluidos magnéticos no tumor. (A) Seção histológica do pulmão do camundongo sem tumor, sem fluido magnético, nota-se congestão (Seta laranja). (B) Seção histológica do pulmão do camundongo do grupo controle, * verde é um indicativo de hemorragia. (C) Seção histológica do pulmão do camundongo tratado com fluido MNP, * verde é um indicativo de hemorragia. (D) Seção histológica do pulmão com indicativo em amarelo de metástase, no camundongo tratado com MNP@Au1. (HE, 100X).....	49

Figura 18. Seções histológicas dos rins dos camundongos 11 dias após a injeção dos fluidos magnéticos no tumor. Camundongos que não tiveram fluido magnético aplicado no tumor serviram como controle. (A) Seção histológica do rim do camundongo saudável, sem tumor, sem fluido magnético. (B) Seção histológica do rim do camundongo do grupo controle. (C) Seção histológica do rim do camundongo com fluido MNP aplicado no tumor. (D) Seção histológica do rim do camundongo com fluido MNP@Au1 aplicado no tumor..... 50

Figura 19. Seções histológicas do cérebro dos camundongos 12 dias após a injeção dos fluidos magnéticos no tumor. Camundongos que não tiveram fluido magnético aplicado no tumor serviram como controle. (A) Seção histológica do cérebro do camundongo saudável, sem tumor, sem fluido magnético. (B) Seção histológica do cérebro do camundongo do grupo controle. (C) Seção histológica do cérebro do camundongo com fluido MNP aplicado no tumor. (D) Seção histológica do cérebro do camundongo com fluido MNP@Au1 aplicado no tumor 51

Figura 20. Pesos do fígado e baço de camundongos com adenocarcinoma mamário murino que foram eutanaziados 7 dias após injeção intratumoral de MNP e MNP@Au1. Camundongos sem tumor foram utilizados como controle negativo, enquanto os animais com tumor sem tratamento, controle positivo. 52

Figura 21. Peso corporal dos camundongos acompanhados por 7 dias após um ciclo de 5 dias de tratamento tumoral com magnetohipertemia..... 53

Figura 22. Aumento do volume tumoral dos camundongos acompanhados por 11 dias após o início de um ciclo de tratamento do adenocarcinoma mamário murino com magnetohipertermia 54

Figura 23. Peso dos tumores dos camundongos em diferentes grupos após 1 dia e 7 dias do tratamento tumoral com magnetohipertermia..... 55

Figura 24. Porcentagem de necrose nos tumores dos camundongos em diferentes grupos após 1 dia do tratamento tumoral com magnetohipertermia. 56

Figura 25. (A) Microscopia da mama normal (*) do grupo controle negativo, camundongos sem tumor. (B) Mama com tumor (*) do grupo controle positivo, com tumor e sem tratamento, necrose isquêmica (*). (C) Mama do grupo tratado com MNP, nota-se necrose pós-tratamento (*). (D) Mama do grupo tratado com MNP@Au1, nota-se necrose pós-tratamento (*), necrose isquêmica (*) e tumor (*)**Erro! Indicador não definido.**57

Figura 26 (A) Seção histológica da mama do camundongo do Grupo controle negativo, nota-se a glândula normal (*). (B) Transição necrose isquêmica(*)-tumor(*) da mama do grupo controle positivo. (C) necrose pós-tratamento do grupo tratado com MNP nota-se a presença de ferro (*). (D) Presença de hemossiderofagia (seta laranja) no grupo tratado com MNP@Au1. HE, 100X..... 58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Dados quantitativos do conteúdo dos poços	30
Tabela 2. Caracterização dos fluidos magnéticos MNP, MNP@Au1 e MNP@Au2 feita pelo grupo do Prof. Marcelo Henrique Sousa	34
Tabela 3. Valores da estabilidade das amostras MNP, MNP@Au1 e MNP@Au2 obtida através da medida do potencial zeta ao longo do tempo.	34
Tabela 4. Valores de tensão, corrente e campo magnético obtidos para o aquecimento dos fluidos magnéticos	36

Sumário

1. INTRODUÇÃO	16
1.1. CÂNCER DE MAMA	16
1.1.1 Diagnóstico do câncer de mama	17
1.1.2 Terapêutica do câncer de mama	18
1.1.3 Hipertermia Magnética	18
1.2 NANOESTRUTURAS MAGNÉTICAS	19
1.2.1 Recobrimento de nanoestruturas magnéticas	21
1.3 NANOESTRUTURAS DE OURO	22
1.4 NANOESTRUTURAS DO TIPO NÚCLEO – CAMADA (CORE-SHELL)	23
2. OBJETIVOS	26
2.1 OBJETIVO GERAL	26
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	26
3. METODOLOGIA	27
3.1 SÍNTESE DOS FLUIDOS MAGNÉTICOS	27
3.2. MEDIDA DO POTENCIAL ZETA	28
3.3 MAGNETOHIPERTERMIA.....	28
3.4 EXPERIMENTOS <i>IN VITRO</i>	30
3.4.1 Viabilidade celular por MTT	30
3.4.2 Interiorização celular das nanopartículas magnéticas por MET	31
3.5 ENSAIOS <i>IN VIVO</i>	31
3.5.1 Indução dos Tumores Subcutâneos	31
3.5.2 Avaliação histopatológica	32
3.5.3 Magnetohipertermia	32
3.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	32
4. RESULTADOS	34
4.1 CARACTERIZAÇÃO PRÉVIA DOS FLUIDOS MAGNÉTICOS	34
4.2 AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DAS SUSPENSÕES COLOIDAIIS	35
4.3 VARIAÇÃO DO POTENCIAL ZETA EM FUNÇÃO DO pH	36
4.4 AQUECIMENTO DOS FLUIDOS MAGNÉTICOS POR INDUÇÃO DO CAMPO MAGNÉTICO DE CORRENTE ALTERNADA.....	37

4.5 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DOS FLUIDOS MNP e MNP@Au1 .	41
4.6 INTERIORIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS	43
4.7 ENSAIOS <i>IN VIVO</i>	45
4.7.1 Estudo do modelo animal	45
4.7.2 Avaliação histopatológica	47
4.7.3 Magnetohipertermia	53
5. DISCUSSÃO	60
6. CONCLUSÕES	66
REFERENCIAL TEÓRICO	67
ANEXOS	79

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CLI – Carcinoma Lobular Invasivo

INCA – Instituto Nacional de Câncer

RM - Ressonância magnética

MHT - Magnetohipertermia

CMA – Campo magnético alternado

NPMs - Nanopartículas magnéticas

NPs – Nanopartículas

AuNPs – Nanopartículas de ouro

Micro-TC - Tomografia Micro-computadorizada

NH₄OH - hidróxido de amônio

HNO₃ - ácido nítrico

MNP – Fluido magnético com nanoestruturas de maghemita

MNP@Au1 – Fluido magnético com nanoestruturas de maghemita revestidas com ouro

MNP@Au2 – Fluido magnético com nanoestruturas de maghemita revestidas com 2X ouro

NaBH₄ - borohidreto de sódio

HAuCl₄ - ácido cloroáurico

ICPAES.- Espectroscopia de Emissão Atômica com Plasma Indutivamente Acoplado

MTT - brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium]

HE - Hematoxilina/Eosina

IRM - Imageamento por Ressonância Magnética

1. INTRODUÇÃO

1.1 CÂNCER DE MAMA

O Câncer de mama representa 25% do total de neoplasias no mundo, sendo o segundo tipo de câncer mais incidente em mulheres na faixa etária de 40 a 59 anos com múltiplos fatores de risco associados: fatores genéticos, ambientais e endócrinos, caracterizando-se pelo crescimento desordenado das células epiteliais mamárias [1]. As características anormais (células dos lóbulos, produtores do leite, ou dos ductos, por onde é drenado o leite), são causadas por uma ou mais mutações no material genético de uma célula destas estruturas [2].

A maioria deste tipo de câncer acomete as células dos ductos das mama, Carcinoma ductal. Este pode ser “in situ”, quando não passa das primeiras camadas de célula dos ductos; ou invasor, quando invade os tecidos adjacentes; e/ou metástase. Cerca de 80% dos casos de câncer de mama são ductal invasivo [3] [4].

Os que acometem os lóbulos da mama, denominados, Carcinoma Lobular são menos frequentes e, geralmente afetam as duas mamas. É classificado como não invasivo, no entanto as mulheres tendem a desenvolver câncer de mama invasivo. O carcinoma lobular invasivo (CLI) é a segunda neoplasia maligna de mama mais comum e detêm características histológicas típicas, como o crescimento infiltrativo e baixa desmoplasia [5]

As causas do Câncer de mama estão relacionadas com diferentes fatores de risco que podem aumentar a probabilidade de desenvolver a doença [6] [7]:

- Sexo: é mais frequente no sexo feminino, menos de 1% nos homens.
- Hereditariedade: Mulheres com parentes de 1º grau (mãe ou irmã) que tiveram a doença antes dos 50 anos podem ser mais vulneráveis. O risco absoluto para doentes com um forte histórico familiar de câncer da mama foi de 2,0% e o risco relativo para a detecção do câncer de mama dada uma história pessoal foi de 1,42 [8].
- Menarca precoce (antes dos 12 anos) e menopausa tardia (depois dos 55): longo período de tempo com a exposição a estrogénio aumenta risco.
- História reprodutiva: a nuliparidade e a primeira gravidez depois dos 30 anos aumenta o risco de ter câncer da mama

- Densidade da mama: mulheres com tecido mamário denso têm maior probabilidade de desenvolver câncer da mama.
- Terapêutica hormonal de substituição: a toma de terapêutica hormonal de substituição durante cinco ou mais anos aumenta o risco [9].
- Obesidade depois da menopausa/ Dieta rica em gorduras: a ingestão de alimentos ricos em gordura animal e laticínios ricos em gordura foi associado com um aumento de 33-36% no risco do câncer da mama [10].
- Sedentarismo: a atividade física reduz o risco do câncer em 10-25%. [11]
- Bebidas alcoólicas: o álcool é um fator de risco, provavelmente por aumentar os níveis de estrógeno endógeno [10].

Os sinais e sintomas do estágio inicial do câncer da mama podem variar, e pode ser assintomático. Em algumas situações pode causar alterações visíveis [12]. De qualquer maneira, é recomendável avaliar cuidadosamente a presença de nódulos perto da mama ou na zona axilar, mudança no tamanho ou forma da mama, inchaço (edema) da pele, refração do mamilo (mamilo invertido), espessamento ou retração da pele em uma determinada área da mama [13], INCA 2018 Iygia. Pode ainda ocorrer sinais como secreção de líquido pelo mamilo com característica sanguinolenta, unicanalicular e espontânea [14].

O carcinoma mamário murino 4T1 é um modelo experimental muito utilizado na avaliação e melhor compreensão da biologia dos tumores. Trata-se de uma linhagem celular altamente tumorigênica e invasiva, onde são observadas metástases em diversos órgãos

1.1.1 Diagnóstico do câncer de mama

O exame clínico da mama é parte fundamental do diagnóstico de câncer. Deve ser realizado como parte do exame ginecológico, e constitui a base para a solicitação dos exames complementares [15].

Para o diagnóstico do câncer da mama utiliza-se exames complementares de diagnóstico, recorrendo a imagiologia, como a mamografia bilateral, ecografia mamária e axilar e a ressonância magnética [16]

A mamografia consiste no estudo radiológico da mama realizado com baixa dose de raios X. Permite o diagnóstico precoce desta doença. Este exame é capaz de identificar tumores

menores que 1(um) cm e imperceptíveis ao toque, fase da doença que as chances de cura chegam a 95%. [17]

A ecografia mamária pode servir como complemento à mamografia, pois ajuda a diferenciar cistos (conteúdo líquido, raramente canceroso) de nódulos [17].

Ressonância magnética (RM) consiste na utilização de um íman, com ondas rádio e um computador que transmite imagens de áreas do corpo [18] A ressonância magnética é o método mais sensível na detecção do câncer da mama, utilizado em doentes de alto risco, definido com base em história familiar ou genética, a recomendação é iniciar o rastreamento aos 30 anos de idade [17]

Neste mesmo enquadramento realizam-se análises clínicas de modo a caracterizar repercussões do câncer da mama, nomeadamente o hemograma, bioquímica e pesquisa de marcadores tumorais como CEA e CA 15.3 [19].

Se na avaliação se encontrar nódulos, deve-se fazer uma biópsia (retirada de um fragmento da mama para análise por um patologista), fazendo o diagnóstico por microbiopsia ou biópsia assistida por vácuo [18].

1.1.2 Terapêutica do câncer de mama

Atualmente, as modalidades terapêuticas disponíveis são a cirúrgica, quimioterapia para o tratamento sistêmico, radioterapia para o tratamento loco-regional, hormônio-terapia ou a combinação destas modalidades [20]. As terapias atuais não são completamente seletivas no tratamento do câncer de mama primário e metastático [20]. Ademais a resistência à terapêutica é comum no tratamento de quaisquer subtipos do câncer de mama [21]; [22]; [23]. Nesse sentido, são almejadas terapias que possam auxiliar no tratamento deste tumor, de modo a destruir a propagação metastática. Com isso, um dos tratamentos que está em ascensão para o tratamento do câncer, é a magnetohipertermia, aprovada na Europa para o tratamento de tumores de cérebro[24]

1.1.3 Hipertermia Magnética

Hipertermia é um procedimento baseado no aumento da temperatura de uma determinada região do corpo que esteja afetada por algum tumor ou outros crescimentos não controlados. Esta técnica pode ser aplicada em conjunto com outros tratamentos para o câncer como, radioterapia ou quimioterapia. O princípio físico se baseia na lise das células tumorais a temperaturas em torno de 41-46°C [25] [26], preferencialmente 42 –

44°C [27] [28], visto que elas são, em geral, mais sensíveis ao calor do que células normais.

As nanopartículas magnéticas, como agentes de hipertermia alternativos para o aquecimento específico do alvo e assim, preservar os tecidos saudáveis. Quando as NPM são submetidas a um campo magnético alternado, seus domínios magnéticos se alinham com o campo aplicado e uma vez que esse campo possui frequência alternada, os domínios do material também se alternam com o campo. A constante mudança de orientação faz com que as nanopartículas dissipem energia na forma de calor, gerando assim o aquecimento necessário ao tratamento do tumor [29]. Nesses casos, o tratamento é chamado de magnetohipertermia (MHT).

Para induzir a hipertermia especificamente no alvo, as nanopartículas magnéticas são guiadas e retidas na região tumoral, após a administração, aplica-se, então um CMA, de frequência tal, que a magnetização das partículas seja continuamente revertida, gerando o calor necessário para causar a morte das células tumorais. Se a temperatura puder ser mantida preferencialmente entre 42 – 44°C por 30 min ou mais,[30] [31] o câncer pode ser destruído. O tratamento de cânceres diversos, aplicando a MHT representa um grande avanço, uma vez que, as terapias convencionais, como, quimio e radioterapia, podem causar a destruição de células saudáveis, devido a distribuição sistemática da droga administrada.[32],[33],[34],[35],[36],[37].

As primeiras investigações experimentais sobre o uso de nanopartículas de óxido de ferro para o tratamento contra o câncer por hipertermia, foram conduzidos em 1957, por Gilchrist e colaboradores, que aqueceram nanopartículas de maguemita, de 20 – 100 nm de diâmetro, expostas a um campo magnético de 1,2 MHz. A partir daí, numerosas publicações têm descrito uma variedade de sistemas envolvendo materiais magnéticos, intensidades e frequências de campo, diferentes metodologias e materiais de encapsulamento e de entrega de drogas [38]

1.2 NANOESTRUTURAS MAGNÉTICAS

As Nanopartículas magnéticas (NPMs) possuem propriedades físicas e químicas distintas das observadas em materiais em escala macroscópica, por encontrarem-se entre o estado molecular e atômico [39]. As NPMs são geralmente utilizadas na forma de fluidos magnéticos, suspensões coloidais compostas de NPMs dispersas em líquidos orgânicos ou inorgânicos [39]. Os fluidos magnéticos exibem um comportamento magnético,

superparamagnetismo, semelhante ao paramagnetismo, no qual materiais paramagnéticos apresentam a capacidade de se orientarem na mesma direção de um campo magnético externo aplicado e seu magnetismo cessa após a remoção deste campo. A distinção é que enquanto os materiais paramagnéticos possuem reduzida susceptibilidade magnética, os fluidos superparamagnéticos apresentam uma magnetização muito maior, mesmo quando submetidos a um pequeno campo magnético [41] [42].

As NPMs apresentam características significativas para a aplicação biomédica, como por exemplo, manipulação das nanopartículas para o tecido alvo e aquecimento favorável à hipertemia com auxílio de um campo magnético externo [43], agente de contraste em técnicas de imagem [44], interiorização pelo tecido alvo resultando em um tratamento efetivo com dose otimizada do fármaco, possibilitando a redução dos efeitos colaterais e facilidade de preparação em larga escala [45].

Para possuírem aplicabilidade clínica, as NPMs necessitam ser recobertas com produtos que as tornem biocompatíveis, estáveis e não tóxicas no meio fisiológico. Sabe-se que diferentes coberturas das NPM influenciam na sua nanotoxicidade e na interiorização pelas células [46] [47] [48]. A cobertura, a via de administração e o tamanho das NPMs são os parâmetros de influência na biodistribuição pelo organismo, influenciada pela associação das NPMs com componentes extracelulares ou com a membrana celular [49].

De acordo com as suas propriedades magnéticas, as NPMs podem ser divididas em metais puros (como cobalto, níquel, manganês e ferro), ligas e óxidos metálicos. No entanto, muitos são tóxicos ou ainda não foram testados quanto à sua toxicidade para o organismo, restringindo assim a aplicação biomédica [41]. As NPMs de óxido de ferro, magnetita e maghemita, estão entre as mais empregadas em estudos e aplicações biomédicas, pois possuem o uso aprovado pela agência americana FDA [50] [51]. Além disso, esse tipo de fluido possui um método de fácil preparo através da co-precipitação alcalina de Fe^{+2} e Fe^{+3} , possuem estabilidade química em condições fisiológicas e apresentam possibilidade de modificação química através da cobertura de seu núcleo de ferro com compostos biocompatíveis. Os óxidos de ferro ocorrem naturalmente no organismo, no coração, baço e fígado, indicativo que esses compostos não são tóxicos. Após a degradação das nanopartículas no organismo, os íons de ferro liberados são incorporados na hemoglobina dos eritrócitos e degradados no ciclo normal de reciclagem de ferro no organismo [52].

1.2.1 Recobrimento de nanoestruturas magnéticas

Classicamente, os tratamentos envolvendo os sistemas entregadores de drogas podem ser passivos e ativos. No tratamento passivo o agente terapêutico é incorporado dentro de uma macromolécula ou de nanopartículas, que circulam na corrente sanguínea e são acumuladas dentro do tumor através do efeito de permeabilidade e retenção aumentadas (EPR) (7,8). A vasculatura desorganizada e a ausência de drenagem linfática eficaz em tumores permitem à fuga das NPs de óxido de ferro da corrente sanguínea e acúmulo no tumor, através do efeito de EPR [53]

Para que as nanopartículas magnéticas circulem o tempo suficiente dentro do organismo elas devem ser biocompatíveis, ou seja, elas não podem ser reconhecidas como um “corpo estranho”. O recobrimento da superfície das nanopartículas é uma estratégia utilizada para reduzir ou eliminar alguns comportamentos indesejáveis nas aplicações biomédicas. O seu intuito é aumentar a biocompatibilidade das nanopartículas [54].

Muitos grupos de materiais têm sido utilizados para modificar a química de superfície de nanopartículas magnéticas, visando aplicações biomédicas:

- Polímeros biocompatíveis: dextrana, amido, quitosana, polietileno glicol, poliésteres alifáticos derivados de ácidos lático e glicólico;
- Surfactantes orgânicos: oleato de sódio, dodecilamina;
- Metais: ouro;
- Óxidos inorgânicos: sílica;
- Moléculas e estruturas bioativas: lipossomos, peptídeos, ligante/receptor.

No tratamento ativo, o agente terapêutico é conjugado com uma nanopartícula que possui um ligante (anticorpo) que reconhece especificamente os antígenos relacionados às células do câncer [55].

A liberação da droga no alvo específico ocorre em resposta a certos estímulos, que podem ser biológicos ou externos. Exemplos de estímulos são as variações de pH e de temperatura. O pH extracelular e intracelular são afetados por doenças. Em um tumor sólido O pH extracelular tende a ser mais ácido (6,5) do que o pH do sangue (7,4) a 37°C, além da diferença de pH, o revestimento das NPs serão expostos à várias enzimas de degradação [49], algumas são capazes de degradar quase todas as partículas biocompatíveis. Após a degradação das moléculas de revestimento, o ambiente ácido leva ao ataque das NPs, resultando na geração de radicais livres e na redução gradual do

diâmetro do núcleo. Além de uma perda completa da funcionalidade da nanopartícula os íons do metal lixiviado pode potencialmente afetar a homeostase celular.

Em vista disso, revestimentos de sistemas nanoestruturados magnéticos que sejam sensíveis à variações de pH são almejados para transporte, liberação da droga, agente indutor de aquecimento e de contraste em imagem de ressonância magnética e raios X no local específico. A temperatura é outro estímulo que pode ser utilizado para a liberação da droga em local específico, uma vez que podem ser desenvolvidas nanopartículas que liberem o agente terapêutico apenas em temperaturas superiores a 37 °C. A aplicação do estímulo hipertérmico irá ocorrer apenas na área do tumor, causando a liberação apenas nesta região [56].

1.3 NANOESTRUTURAS DE OURO

O ouro ocupa uma posição notável na história da ciência e da tecnologia. Seu uso como agente terapêutico é antigo, os egípcios faziam uso de ouro em suspensões para a formação do famoso “elixir da longa vida” (4.000 a. C.), consideravam o ouro capaz de estimular a mente e restaurar a juventude [57]. Soluções vermelhas de ouro coloidal são utilizadas até hoje na Índia como rejuvenescedores e revitalizantes [58].

Com o desenvolvimento da nanotecnologia, a utilização do ouro na medicina, principalmente em estudos envolvendo diagnósticos em terapia do câncer tem aumentado nos últimos anos. O uso de nanopartículas de ouro também cresce no setor cosmético com aplicações em tratamentos estéticos como rejuvenescimento e hidratação facial devido ao ouro ser um material que apresenta propriedades antioxidantes [59].

As principais vantagens do ouro são a biocompatibilidade, síntese relativamente simples, o controle do tamanho das nanopartículas, a facilidade de modificação química de sua superfície, facilidade de bioconjugação com outras células quando recobertas por marcadores específicos [60]. Devido ao seu elevado peso atômico, as AuNPs proporcionam um excelente contraste em imagens de raios X [61].

As AuNPs podem ser aplicadas a nível da terapia do câncer em hipertermia devido às suas propriedades ópticas. Essas AuNPs tem a capacidade de absorver a energia proveniente de laser infravermelho próximo, ondas de rádio, e convertem-na em calor, o que causa uma ablação das células tumorais, destruindo as membranas celulares [62] [63].

Uma das aplicações exploradas das AuNPs é a sua aplicação como veículo para a entrega de moléculas dentro das células [64] [65]. Para estas aplicações, normalmente as

moléculas são adsorvidas na superfície das nanopartículas. As células podem captar as nanopartículas por meio de um mecanismo específico, via receptor-ligante, ou não específico [65].

Estudos demonstraram que a forma oxidada maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) liga-se preferencialmente ao ouro em comparação com a forma magnetita e, além disso, é a forma mais estável e biocompatível de óxido de ferro [66] [67].

As nanopartículas de ouro com diferentes tamanhos e formas são comercializadas pela empresa americana Nanopartz produz nanoesferas e nanobastões de ouro (Gold NanobeadsTM, NanopartzTM) como agentes de contraste em diagnósticos e para tratamentos utilizando terapia hipertérmica [68].

1.4 NANOESTRUTURAS DO TIPO NÚCLEO – CAMADA (CORE-SHELL)

Nanocomposto núcleo camada é definido como uma nanopartícula com um único núcleo e completamente coberto por uma camada. Em contraposição com a estrutura núcleo-satélite, a superfície do núcleo é completamente coberta pela camada, diminuindo as propriedades do material nuclear [69].

Estruturas de compostos core-shell $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Au}$ podem ser obtidas pelo recobrimento de uma camada de ouro [70][71]. Além da reduzida toxicidade, a camada de ouro amplia a estabilidade coloidal, apresentando assim uma plataforma mais versátil para biconjugação [72]. Coelho; Siqueira et al [73], verificaram que os fluidos magnéticos constituídos por nanopartículas de maghemita recobertas com camada de ouro e concentração de ferro variando entre 6,25 – 100 $\mu\text{g/mL}$ não reduziram a viabilidade das linhagens de queratinócitos de humanos e fibroblasto de camundongo em mais de 30%, um indicativo da biocompatibilidade desses fluidos quando incubados por 24 horas nessas células em específico.

Além da reduzida toxicidade, a camada de ouro em escala nanométrica, apresenta superfície plasmônica, que resulta em uma absorção óptica significativa na região do visível e do infravermelho próximo (IVP), região espectral em que os tecidos são parcialmente transparentes [74]. Essas características fazem das nanopartículas de ouro potencial agente indutor de aquecimento para terapia fototérmica, onde o aquecimento é realizado através da irradiação de luz [75].

Diagnóstico por imagem de pequenos animais tem um papel fundamental para a obtenção de modelos para o estudo do desenvolvimento de doenças no organismo

humano, bem como o desenvolvimento de drogas e tratamento. Tomografia Micro-computadorizada (micro-TC) é uma modalidade de diagnóstico por imagem, apresenta baixo custo dos geradores de imagens, permite a visualização tridimensional de pequenos animais de laboratório [76], [77], [78]. Apesar da alta eficiência da TC e da micro-TC para a imagem da estrutura óssea estes scanners são limitados para geração de imagens de tecidos moles ou vasos sanguíneos. No entanto, existem soluções para melhorar o contraste entre tecidos moles, por exemplo, para aplicações que requerem a visualização da vasculatura tais como embolia pulmonar [79] ou caracterização do tumor [80] [81]. Neste caso, os agentes de contraste "convencionais", são utilizados clinicamente. Eles são feitos de compostos iodados hidrofílicos, com um baixo peso molecular e, portanto, sofrem eliminação muito rapidamente pelos rins. Por esta razão, eles não são adaptados para a pesquisa pré-clínica em micro-TC, pois são eliminados do corpo do animal antes do tempo de aquisição da imagem [82]. Novos agentes de contraste à base de nanopartículas (NPs) foram desenvolvidos para superar essas limitações. NPs inorgânicas têm recebido maior atenção nos últimos anos, pois apresentam como particularidade o longo tempo de residência na corrente sanguínea e/ou a capacidade de atingir órgãos ou lesões específicas. O número atômico do ouro (79) é muito superior que o do contraste atualmente utilizado para CT – iodo (53), e desta forma o ouro pode induzir uma forte atenuação de raios X [83].

Cunha; Siqueira et al [73], verificaram que fluidos magnéticos constituídos por nanoestruturas do tipo core-shell, com núcleo de maghemita recoberto com ouro apresentaram atenuação de raios X elevada o suficiente para aplicação como agente de contraste em micro – CT e, além disso, observou-se que quanto maior a espessura da camada de ouro maior foi a atenuação de raios X.

Os trabalhos que investigam os fluidos magnéticos como agente indutor de aquecimento em magnetohipertermia vêm crescendo nos últimos anos. Estudos para aplicação da técnica de MHT em seres humanos iniciaram-se com Jordan et al. [97], que apresentaram um novo sistema de aplicação de campo magnético para geração de hipertermia utilizando fluidos magnéticos para futuras aplicações no tratamento de glioblastomas e carcinoma de próstata. Enquanto, a aplicação pioneira da técnica em pacientes foi realizada por Maier-Hauff et al.[84], na qual foi avaliada em 14 pacientes a eficácia e tolerabilidade da hipertermia induzida por fluidos magnéticos associados à radioterapia no tratamento de glioblastoma multiforme recorrente. Cada paciente recebeu em média seis sessões de termoterapia. A MHT mostrou ser promissora como uma terapia

complementar associada às outras terapias clássicas, assim podendo contribuir para tornar mais efetivo o tratamento de tumores. Os resultados dessa modalidade terapêutica, levaram a aprovação na Europa para uso em humanos no tratamento de tumores do cérebro usando esta tecnologia. Nesse contexto, o presente trabalho associou ouro a nanopartículas de maghemita com a finalidade de potencializar o efeito antitumoral das nanopartículas magnéticas quando utilizadas para o tratamento do câncer de mama murino com magnetohipertermia. Usando ambos: óxido de ferro e ouro, um sistema que explora a química da superfície do ouro, mantendo as características magnéticas do óxido de ferro.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar os efeitos biológicos e potenciais aplicações do fluido magnético constituído de nanoestruturas de maghemita revestidas com ouro como agente indutor de aquecimento contra adenocarcinoma mamário murino.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Avaliar a estabilidade dos fluidos magnéticos ao longo de 24 meses
- 2) Avaliar a estabilidade coloidal dos fluidos magnéticos em pH ácido e básico;
- 3) Verificar o potencial de aquecimento dos fluidos magnéticos durante exposição ao campo magnético de frequência alternada;
- 4) Avaliar a toxicidade *in vitro* de diferentes concentrações dos fluidos magnéticos por meio da análise de viabilidade de células de adenocarcinoma mamário murino;
- 5) Analisar *in vitro* o processo de interiorização das nanopartículas dos fluidos magnéticos pelas células tumorais;
- 6) Analisar histopatologicamente os órgãos: fígado, baço, rins, pulmão e cérebro em função da aplicação de nanopartículas;
- 7) Realizar o tratamento *in vivo* com a aplicação da magnetohipertermia, analisando as possíveis atividades antitumorais dos fluidos magnéticos, em animais com de câncer de mama induzido experimentalmente.

3. METODOLOGIA

3.1 SÍNTESE DOS FLUIDOS MAGNÉTICOS

Os fluidos magnéticos compostos de nanopartículas de maghemita ($\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$) recobertas com citrato e ouro, foram preparadas pelo Breno Coelho, aluno de doutorado do Programa de Pós Graduação em Ciências e Tecnologias em Saúde da Universidade de Brasília, sob orientação do Prof. Dr. Marcelo Henrique Sousa.

De uma forma resumida, as nanopartículas de maghemita foram produzidas através do método de co-precipitação dos íons Fe^{2+} e Fe^{3+} ($0,1 \text{ mol. L}^{-1}$ e $0,2 \text{ mol.L}^{-1}$, respectivamente), em meio aquoso, onde foram misturados e diluídos em uma solução de 20 mL de ácido clorídrico concentrado e 1,5 L de água destilada. Essa solução foi colocada em um béquer e, sob agitação mecânica e temperatura ambiente 3 mols de hidróxido de amônio (NH_4OH), agente precipitante é adicionado. O precipitado negro formado foi mantido sob agitação por 30 minutos, em seguida, as partículas foram sedimentadas, com o auxílio de um ímã e o sobrenadante retirado e descartado. Para remoção dos contra- íons foi realizada a lavagem das nanopartículas por três vezes com água destilada. Para garantir a oxidação no sentido de formar $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$, foram adicionados 0,2 L de uma solução de ácido nítrico (HNO_3), mantido sob agitação, aquecida até o refluxo durante 30 minutos. Após esse tempo, o sistema foi lavado com acetona por cinco vezes, no sentido de retirar sais que aumentam a força iônica na mistura, resultando em um coloide mais estável. Após a lavagem, a acetona foi descartada e o coloide aquecido a 40°C , sob agitação, para evaporação da acetona residual. Para funcionalização com revestimento de citrato, para produção da amostra MNP e posteriormente atrair o cátion de ouro mais próximo da superfície para produzir MNP@Au1 e MNP@Au2 , foi introduzido um excesso de citrato de sódio ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$), produzindo uma mistura com um volume total de 80 mL. A mistura foi mantida sob sonicação por 10 minutos.

Para preparar a amostra MNP@Au1 , 0,6 mL de borohidreto de sódio (NaBH_4) e 0,7 mL de ácido cloroáurico (HAuCl_4) foram adicionados a 70 mL da amostra MNP, enquanto que para produzir a amostra MNP@Au2 foram adicionados 1,2 mL de NaBH_4 e 1,4 mL de HAuCl_4 a 70 mL da amostra MNP. Ambas soluções foram mantidas sob agitação por 48 horas. Após esse prazo, as suspensões denominadas MNP@Au1 e MNP@Au2 foram esterilizadas utilizando uma membrana de $0,22 \mu\text{m}$.

O grupo do prof. Marcelo Sousa realizou a caracterização dos fluidos MNP, MNP@Au1 e MNP@Au2 quanto ao diâmetro físico utilizando a técnica de difração de raios X e microscopia eletrônica de transmissão. A quantidade de ferro e de ouro das amostras foram determinadas pela técnica de Espectroscopia de Emissão Atômica com Plasma Indutivamente Acoplado (ICPAES).

As amostras produzidas MNP, MNP@Au1 e MNP@Au2, foram armazenadas a temperatura ambiente antes da realização de cada experimento.

3.2. MEDIDA DO POTENCIAL ZETA

A medida do potencial zeta para determinar a carga de superfície das nanopartículas foram determinadas no equipamento Zetasizer. O valor do potencial zeta é referente à carga da bicamada elétrica, uma vez que, partículas em contato com um líquido adquirem carga elétrica em sua superfície. Esse valor é um indicativo da estabilidade coloidal, sendo que, quanto maior o valor das cargas em módulo, maior a repulsão das partículas umas às outras e essa força supera a tendência à agregação.

Para determinação do potencial zeta, as amostras MNP, MNP@Au1 e MNP@Au2, foram colocadas nas cubetas de policarbonato (DTS1060). As medidas foram feitas em triplicata e em temperatura ambiente, no intervalo de 0 – 24 meses após a síntese do produto final. Medidas do potencial zeta foram determinadas em função do pH, diluindo amostras dos fluidos MNP, MNP@Au1 e MNP@Au2 em quarenta vezes em meios com variação de pH no intervalo de 2 – 14 no Departamento de Genética e Morfologia do Instituto de Biologia da Universidade de Brasília.

3.3 MAGNETOHIPERTERMIA

O equipamento que promove a hipertermia magnética é a associação de vários equipamentos eletrônicos distintos, com um sistema de refrigeração fechado (Figura 1). O equipamento de indução térmica é o gerador de um campo magnético alternado através de uma bobina. Para mensurar a temperatura do corpo posicionado no interior da bobina é utilizado um pirômetro. A condição de ressonância no equipamento de hipertermia magnética é obtida via oscilador externo variável em frequência. O sistema de refrigeração retira todo o calor gerado pelo equipamento de indução térmica [92].

Para otimizar o aquecimento dos fluidos magnéticos submetidos a um campo magnético de frequência alternada (CMA), alíquotas de 1 mL das amostras MNP, MNP@Au1, MNP@Au2 e água (utilizadas como controle negativo) foram colocadas em microtubos posicionados no centro da bobina, gerador de CMA – Campo Magnético Alternado, equipamento Magnetherm, Nanotherics do laboratório de magnetometria e magneto transporte presente no Instituto de Física da UFG.

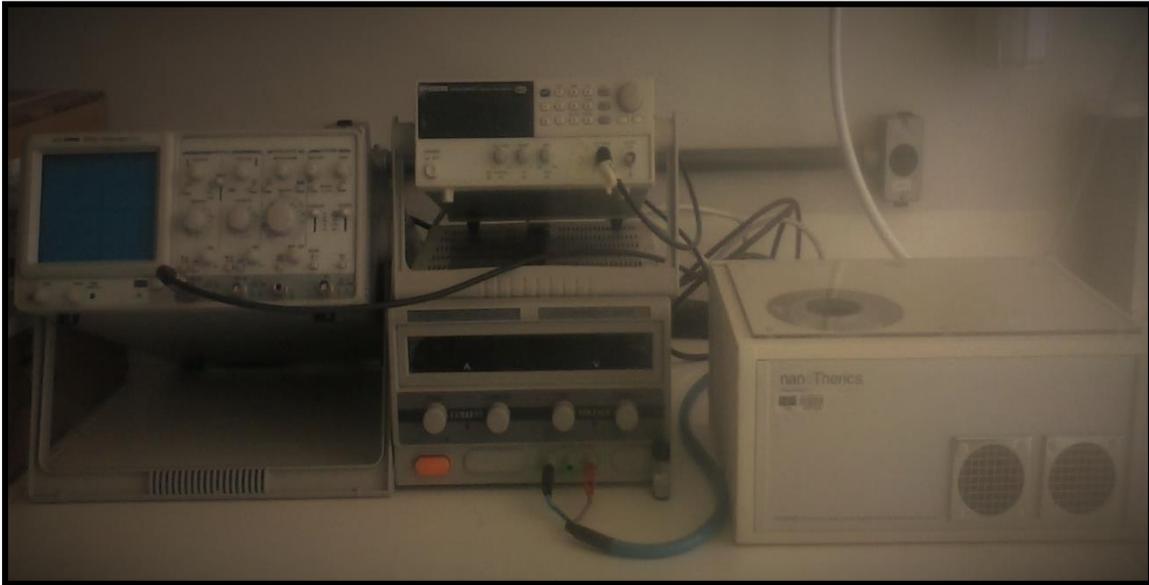


Figura1. Equipamento gerador de campo magnético de frequência alternada (MagneTherm, NanoTherics). À esquerda, osciloscópio; ao centro, a fonte de tensão; e à direita a bobina geradora do campo magnético.

Nesse experimento foram testadas cinco diferentes frequências de CMA: 110, 165, 330, 467 e 624 KHZ.

Para cada frequência testada, os tubos foram incubados por 30 minutos na bobina. O sinal gerado é uma grandeza analógica, na qual a intensidade é função da temperatura. A transformação desta grandeza analógica em uma grandeza digital é realizada em um circuito conversor A/D (analógico/digital). As medidas advindas do conversor A/D seguem para um microcomputador, onde o software dá o tratamento final aos dados da temperatura do corpo de prova.

3.4 EXPERIMENTOS *IN VITRO*

3.4.1 Viabilidade celular por MTT

Para verificar se os fluidos magnéticos induziam efeito citotóxico as células de adenocarcinoma mamário murino (4T1-luciferase) foram tratadas com as amostras MNP e MNP@Au1 no Departamento de Genética e Morfologia do Instituto de Biologia da Universidade de Brasília. O método MTT é baseado na absorção óptica e análise da diminuição da função celular que é detectável por produtos de enzimas mitocondriais que determinam atividades vitais. Para este experimento, 5×10^3 células 4T1-luciferase foram cultivadas em placas de poliestireno contendo 96 poços. O número de células foi determinado por contagem direta em câmara de Neubauer, utilizando o corante Azul de Tripán 0,4 (Sigma). A câmara de Neubauer apresenta uma área reticulada, com pequenos quadrados de superfície conhecida. O volume que fica acima de cada quadrado é de $1/4000 \text{ mm}^3$. O número de células foi determinado pela fórmula, conforme padrão do Laboratório:

$$\text{Número de células/mL} = (\text{número de células contadas/número de quadrantes contados}) \times \text{fator de diluição } 10 \times 10^4$$

Os volumes dos constituintes foram adicionados em triplicata, conforme Tabela 1

Tabela 1. Dados quantitativos do conteúdo dos poços

Grupos	Fluidos Magnéticos ($\mu\text{g/mL}$)	Fluidos Magnéticos (μL)	H ₂ O (μL)	Meio cultura (μL)
Controle	-	-	50	150
1	100	50	-	150
2	50	25	25	150
3	25	12,5	37,5	150
4	12,5	6,25	43,75	150
5	6,25	3,12	46,88	150

Após 24 horas em estufa a 37°C e 5% de CO_2 , o conteúdo das placas com meio de cultura e fluidos magnéticos foram removidos e substituídos por $150 \mu\text{L}$ de solução de MTT em cada poço, sendo $15 \mu\text{L}$ de MTT a 5 mg/mL diluído em $135 \mu\text{L}$ de meio DMEM. Essas placas foram introduzidas na estufa. Após duas horas, o conteúdo de $150 \mu\text{L}$ dos

poços foram retirados e 150 μ L de DMSO (dimetilsulfóxido) foram adicionados a cada poço, no sentido de solubilizar o formazan produzido. Esse padrão de metodologia e concentração foi mantido para análises das amostras, com meio de cultura, células e fluidos magnéticos após incubação por 48 horas.

Após solubilização do formazan, as placas foram levadas a um espectrofotômetro conjugado a uma leitora de microplacas (BioRad 3550-UV) para realização da quantificação do formazan através da medida da absorbância da solução dos poços, no comprimento de onda de 595 nm.

Por fim, a viabilidade celular foi determinada em porcentagem, de acordo com a equação abaixo:

$$\text{Viabilidade celular \%} = (A - B / C) \times 100$$

3.4.2 Interiorização celular das nanopartículas magnéticas por MET

A interiorização das nanopartículas magnéticas dos fluidos MNP e MNP@Au1 foi visualizada por MET. As células 4T1 luciferase foram plaqueadas em uma densidade de $1,5 \times 10^4$ células/ poço em placas de 6 poços. Os cortes foram visualizados e fotomicrografados em microscópio eletrônico JEOL JEM 1011 a 80 kV do Laboratório de Microscopia e Microanálise (LMM) do Instituto de Ciências Biológicas (IB) da Universidade de Brasília (UnB)

3.5 ENSAIOS *IN VIVO*

3.5.1 Indução dos Tumores Subcutâneos

Foram utilizados camundongos BALB/c portadores ou não de tumores subcutâneos após o transplante de células 4T1-*luciferase* (Células de Adenocarcinoma Murino, Linhagem ATCC-CRL-2539). Para implantação subcutânea, os animais foram submetidos à anestesia profunda com ketamina (80 mg/Kg) e xilazina (10 mg/Kg) intraperitoneal. Após a anestesia dos animais, foi injetado o equivalente 2×10^4 células 4T1 diluídas em 50 μ L de meio DMEM no tecido subcutâneo na região do flanco esquerdo dos camundongos BALB/c no Departamento de Genética e Morfologia do Instituto de Biologia da Universidade de Brasília.

3.5.2 Avaliação histopatológica

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

Para avaliar a toxicidade de MNP e MNP@Au1 em um regime de tratamento para câncer de mama, os camundongos tiveram o tumor induzido e as amostras foram injetadas dentro do tumor. Após 7 dias dessa injeção, os animais foram sacrificados e órgãos: fígado, baço, rins, pulmão e o cérebro foram coletados para análises.

3.5.3 Magnetohipertermia

Para o tratamento do adenocarcinoma mamário murino com magnetohipertermia, animais com tumor foram divididos em cinco grupos: [1] animais que foram injetados com PBS e que não tiveram nenhum tratamento (n=5), [2] animais injetados com MNP e submetidos ao CMA (n=5), [3] animais injetados com MNP@Au1 e submetidos ao CMA (n=5), [4] animais injetados com MNP (n=5), [5] animais injetados com MNP@Au1. Todas as injeções foram aplicadas intratumoral com o volume de 30 μ L, antecedidas pela anestesia profunda com ketamina (80 mg/Kg) e xilazina (10 mg/Kg) intraperitoneal e colocados no centro da bobina de 17 voltas do equipamento gerador de CMA por 30 minutos, na frequência de 472 kHz. Este regime de tratamento foi aplicado em 5 dias consecutivos e todos os animais foram pesados e tiveram seu tumor medido nesses dias. Todos os camundongos foram eutanasiados 7 dias após o término do ciclo de tratamento em Departamento de Genética e Morfologia do Instituto de Biologia da Universidade de Brasília.

3.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As análises estatísticas foram realizadas no programa SPSS versão 17.0. A normalidade das variáveis contínuas foi avaliada pelo teste de Shapiro-Wilk. Diferenças entre os grupos analisados foram investigadas através de ANOVA (para dados que seguiram a distribuição normal).

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

4. RESULTADOS

4.1 CARACTERIZAÇÃO PRÉVIA DOS FLUIDOS MAGNÉTICOS

As amostras de fluido magnético MNP, MNP@Au1 e MNP@Au2 foram preparadas e caracterizadas pelo grupo coordenado pelo Prof, Marcelo Henrique de Sousa do Programa de Pós Graduação em Ciências e Tecnologias em Saúde da Universidade de Brasília [62]. A amostra MNP é constituída de nanopartículas de maghemita cobertas com citrato e as amostras MNP@Au1 e MNP@Au2 são a amostra MNP acrescidas de ouro, conforme esquematizado na Figura 2.

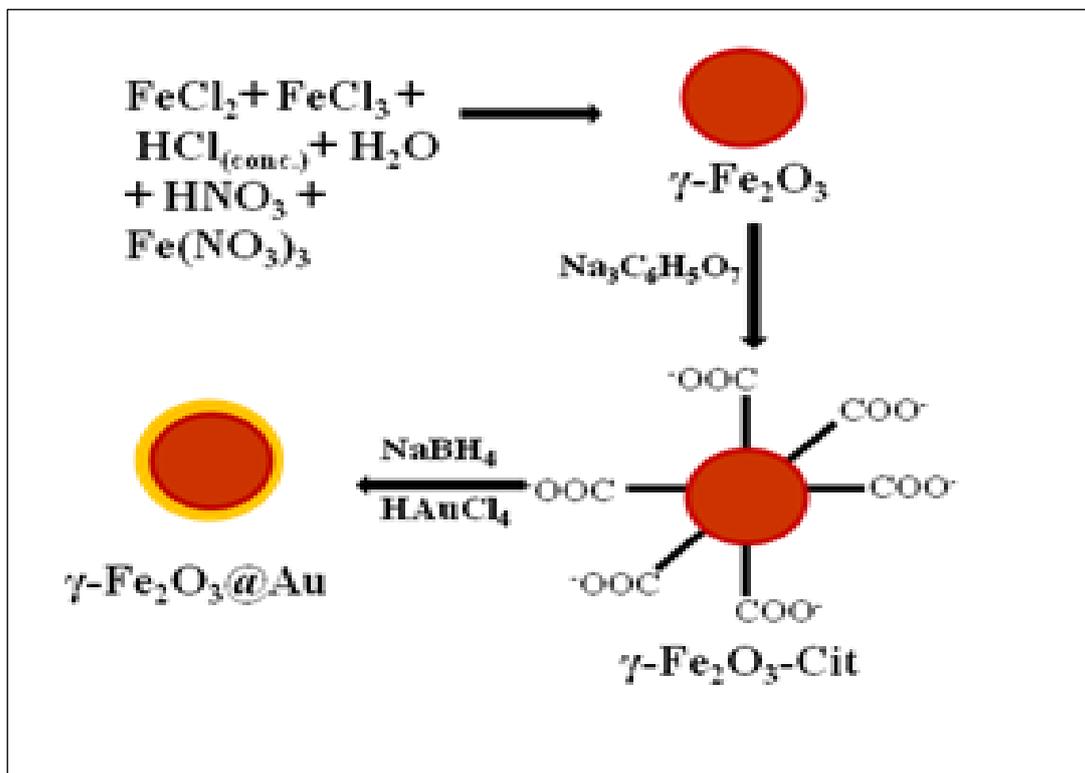


Figura 2. Esquema das nanopartículas de maghemita cobertas com ouro. MNP@Au representa as nanopartículas contendo ouro e MNP as nanopartículas sem a adição de ouro

Os três fluidos magnéticos foram entregues caracterizados quanto ao seu diâmetro físico e quantidade de ferro e ouro, como mostrado na Tabela 2.

Tabela 2. Caracterização dos fluidos magnéticos MNP, MNP@Au1 e MNP@Au2 feita pelo grupo do Prof. Marcelo Henrique Sousa

	MNP	MNP@Au1	MNP@Au2
Diâmetro físico das NPM (nm) Técnica: Difração de raios x	15,06	15,67	15,77
Diâmetro físico das NPM (nm) Técnica: MET	17,9	14	17,4
Concentração de ferro (mg/mL) Técnica: ICP-AES	40	40	40
Concentração de ouro (mg/mL) Técnica: ICP-AES		4,3	8,6

A concentração de ouro determinada para a amostra MNP@Au1 e MNP@Au2 foi de 4,3 e 8,6 mg/mL, o que dá um teor de 0,129 e 0,258 mg respectivamente, em 30 uL de dosagem desses fluidos.

4.2 AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DAS SUSPENSÕES COLOIDAIIS

Após 24 horas da síntese dos fluidos magnéticos foi realizada a avaliação da estabilidade das suspensões coloidais, a partir da determinação do potencial zeta de MNP, MNP@Au1 e MNP@Au2 à temperatura ambiente e pH 7,4 aproximadamente. A Tabela 3 apresenta os dados obtidos.

Tabela 3. Valores da estabilidade das amostras MNP, MNP@Au1 e MNP@Au2 obtida por meio da medida do potencial zeta ao longo do tempo.

	0	6 meses	12 meses	18 meses	24 meses
MNP	-41,8 ± 0,95	-40,3 ± 0,96	-39,06 ± 0,12	-36,86±0,76	-30,74 ± 1,10
MNP@Au1	-33,87 ± 0,15	-35,83 ± 0,90	-31,73 ± 0,75	-31,43±0,61	-35,23 ± 1,37
MNP@Au2	-42,73 ± 0,38	-38,90 ± 0,85	-41,40 ± 1,51	-37,13±0,71	-35,60 ± 0,53

Conforme resultado constatou-se que não houve diferença estatística ($p=0,05$) em relação ao potencial zeta de cada amostra ao longo do tempo.

Nota-se o aumento do valor absoluto do potencial zeta para a amostra MNP@Au2 em relação à MNP e MNP@Au1 nos tempos analisados, exceto após seis meses de síntese em relação à amostra MNP. Esses dados sugerem que a adição de ouro (recobrimento) às

nanopartículas pode conferir maior estabilidade ao fluido magnético, pelo menos quando as amostras se encontram a 25°C.

4.3 VARIAÇÃO DO POTENCIAL ZETA EM FUNÇÃO DO pH

Para verificação da estabilidade dos fluidos magnéticos submetidos a distintos potenciais hidrogeniônicos, foram realizadas análises de potencial de superfície das partículas em função do pH, obtendo os valores de potencial zeta cujos resultados encontram-se na Figura 3. O ponto isoelétrico das nanopartículas magnéticas é em torno do pH 6,8, desta forma, a superfície da partícula torna-se positiva ou negativa, dependendo do pH da solução [86]. Enquanto as nanopartículas de ouro apresentam ponto isoelétrico em valor de pH, aproximadamente 2 [87]. De acordo com a Figura 10, o valor de pH ponto isoelétrico medidos para MNP@Au1 e MNP@Au2, foi 2 para ambos fluidos, confirma que o processo de revestimento foi efetivo, uma vez que as propriedades de carga de superfície das nanopartículas magnéticas revestidas, MNP@Au1 e MNP@Au2, são próximas às do ouro. As curvas de potencial zeta para MNP mostram que a adição de citrato causa um deslocamento do ponto isoelétrico das nanopartículas magnéticas de 6,8 para 2, de tal forma que a carga superficial das partículas em potenciais hidrogeniônicos superiores passa a ser negativo. No pH sanguíneo (7,4), as nanopartículas revestidas com citrato e ouro apresentam carga negativa, causando uma repulsão eletrostática e evitando a formação de aglomerados.

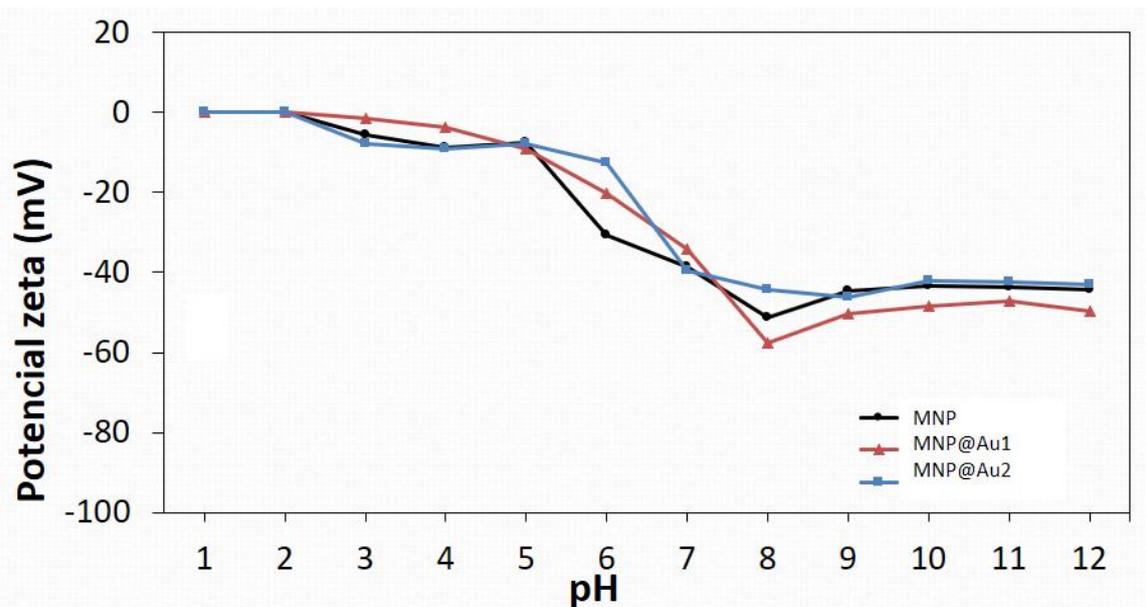


Figura 3. Variação dos fluidos MNP, MNP@Au1 e MNP@Au2 em função do pH

Nota-se que a amostra MNP mostra-se estável a partir do pH 6, apresentando máximo potencial zeta, em módulo, em pH 8: -51,36. Em contrapartida as amostras MNP@Au1 e MNP@Au2 apresentaram potencial zeta superior a 30, em módulo, a partir do pH 7, sendo o máximo, em módulo, em pH 8 para MNP@Au1: -57,7 e pH 9 para MNP@Au2: -46,13. As curvas apresentadas mostram a viabilidade, em termos de estabilidade, de aplicação desses fluidos *in vivo*, uma vez que em pH 7 (aproximadamente o pH sanguíneo), o valor do potencial zeta foi superior a 30, em módulo.

4.4 AQUECIMENTO DOS FLUIDOS MAGNÉTICOS POR INDUÇÃO DO CAMPO MAGNÉTICO DE CORRENTE ALTERNADA

Verificar a capacidade de aquecimento das nanopartículas magnéticas, antes de utiliza-las para hipertermia é de fundamental importância para otimizar a aplicação terapêutica destas. Nesse sentido, para escolher a melhor condição a ser utilizada nos experimentos *in vivo*, foram realizados testes preliminares com as amostras no equipamento de magnetohipertermia em cinco frequências distintas (Tabela 4). Os valores de tensão e corrente para cada frequência foram obtidos no equipamento após ajuste de acordo com o manual do instrumento. Os valores de campo magnético foram obtidos de acordo com o padrão do manual do instrumento.

Tabela 4. Valores de tensão, corrente e campo magnético obtidos para o aquecimento dos fluidos magnéticos

Frequência nominal	Tensão	Corrente	Campo Magnético
(kHz)	(V)	(A)	(mT)
111,2	27,0	11,7	25
167,0	21,8	7,6	17
333,8	32,1	8,2	17
472,6	26,0	6,3	11
631,0	21,0	4,6	9

kHz: quilohertz; V: volt; A: ampère; mT: militesla

As temperaturas mais reduzidas alcançadas por MNP, MNP@Au1 e MNP@Au2 foram obtidas a 111,2 (Figura 4) e 167 kHz (Figura 5). As temperaturas máximas alcançadas a 111,2 kHz por MNP, MNP@Au1 e MNP@Au2, foram respectivamente, 71, 24, 45,91 e 41,56 °C, sendo que o início da faixa preferencial de hipertermia, 42-44°C, [95] da amostra MNP foi alcançada após 3 minutos de aplicação do campo de 25 mT, enquanto que MNP@Au1 alcançou esta faixa de temperatura após 13 minutos de aplicação desse campo, em contrapartida MNP@Au2 não alcançou temperatura adequada a hipertermia terapêutica. As temperaturas máximas alcançadas a 167 kHz pelas amostras MNP, MNP@Au1 e MNP@Au2 foi 62,94, 43,39 e 41,61 °C, após 4 minutos de aplicação do campo de 17 mT a amostra MNP, alcançou a faixa de temperatura adequada a hipertermia terapêutica, em contrapartida a amostra MNP@Au1 alcançou essa faixa de temperatura apenas após 23 minutos de aplicação do campo magnético.

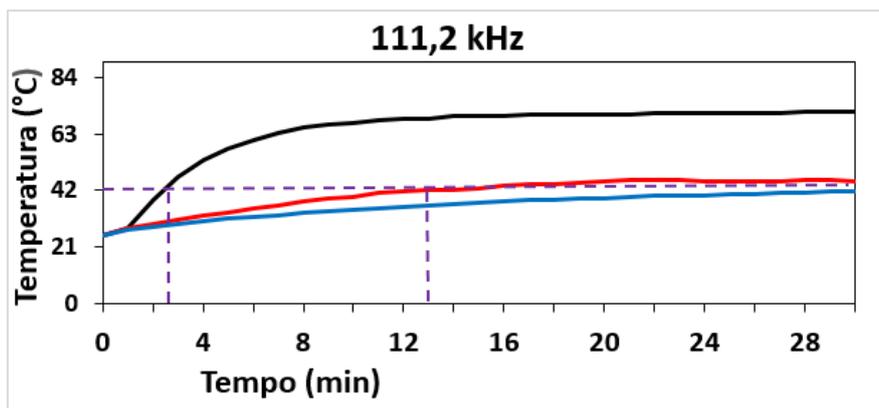


Figura 4. Variação da temperatura em função do tempo de medição Para as amostras MNP, MNP@Au1 e MNP@Au2 quando colocadas no equipamento gerador de CMA na frequência de 111,2 kHz, tensão de 27 V, corrente de 11,7 A e campo magnético de 25 mT.

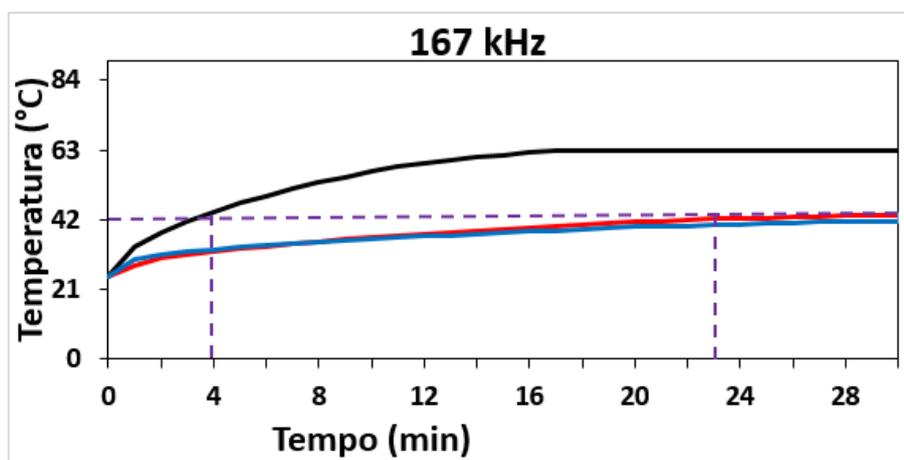


Figura 5. Variação da temperatura em função do tempo de medição Para as amostras MNP, MNP@Au1 e MNP@Au2 quando colocadas no equipamento gerador de CMA na frequência de 167 kHz, tensão de 21,8 V, corrente de 7,6 A e campo magnético de 17 mT.

Temperaturas intermediárias foram alcançadas pelos fluidos em estudo a 631 kHz (Figura 6), sendo que a faixa de temperatura adequada à hipertermia terapêutica foi alcançada após 3 e 13 minutos de aplicação do campo de 9 mT a MNP, MNP@Au1 e, respectivamente. Em contrapartida a amostra MNP@Au2 não alcançou a faixa de temperatura requerida.

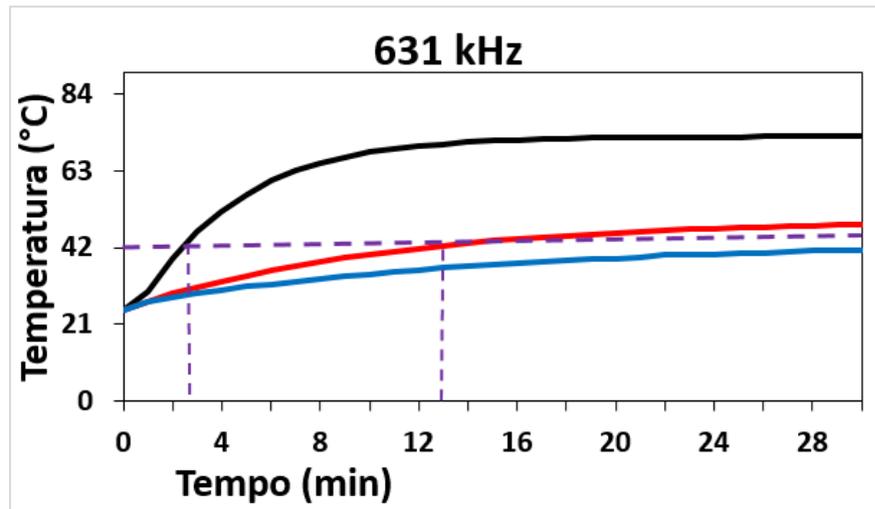


Figura 6. Variação da temperatura em função do tempo de medição Para as amostras MNP, MNP@Au1 e MNP@Au2 quando colocadas no equipamento gerador de CMA na frequência de 631 kHz, tensão de 21 V, corrente de 4,6 A e campo magnético de 9 mT.

Temperaturas superiores foram alcançadas pelos três fluidos em estudo, quando submetidos a 333,8 (Figura 7) e 472,6 (Figura 8) kHz. A temperatura máxima alcançada por MNP, MNP@Au1 e MNP@Au2, a 333,8 kHz foi 79,33, 56,74 e 47,3 °C, respectivamente, enquanto que a 472,6 kHz a temperatura máxima alcançada por estes, foi 72,61, 56,48 e 46,28°C, respectivamente. Após 1 minuto de aplicação do campo magnético a 333,8 e 472,6 kHz a amostra MNP alcançou temperatura superior a 42°C enquanto que MNP@Au1 alcançou temperatura preferencial à hipertermia após 6 minutos de aplicação do campo magnético. Em contrapartida MNP@Au2 alcançou temperatura superior a 42 °C após 14 e 17 minutos a 472 e 333,8 kHz, respectivamente. Nota-se aumentos de temperaturas maiores e mais estáveis a 333,8 kHz, portanto, a condição escolhida para realizar a magnetohipertermia *in vivo* foi nas condições de campo magnético de 17 mT, tensão 32,1 V, corrente 8,2 A e frequência 333,8 kHz fazendo uso dos fluidos MNP e MNP@Au1. O fluido MNP@Au2 não apresentou resultado satisfatório, uma vez que a temperatura requerida ao tratamento foi alcançada em após um longo intervalo de tempo, portanto não será utilizado para o tratamento *in vivo*.

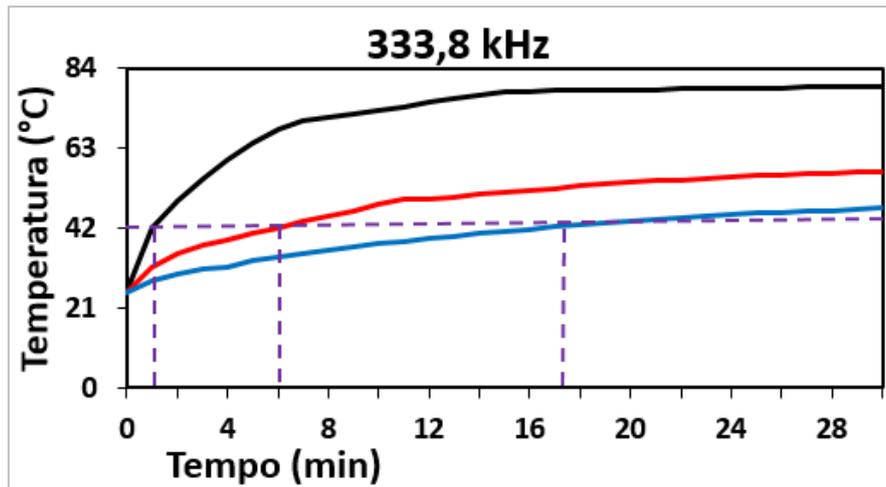


Figura 7. Variação da temperatura em função do tempo de medição. Para as amostras MNP, MNP@Au1 e MNP@Au2 quando colocadas no equipamento gerador de CMA na frequência de 333,8 kHz, tensão de 32,1 V, corrente de 8,2 A e campo magnético de 17 mT.

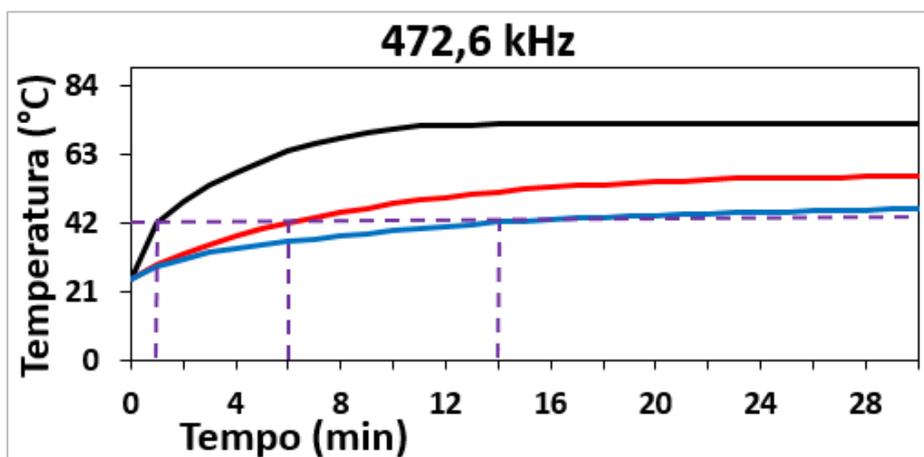


Figura 8. Variação da temperatura em função do tempo de medição para as amostras MNP, MNP@Au1 e MNP@Au2 quando colocadas no equipamento gerador de CMA na frequência de 472,6 kHz, tensão de 26 V, corrente de 6,3 A e campo magnético de 11 mT.

4.5 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DOS FLUIDOS MNP e MNP@Au1

O estudo da citotoxicidade celular causada pelos fluidos magnéticos foi realizado com base nos ensaios de MTT, nas células de adenocarcinoma mamário murino (4T1-*luciferase*). Foram analisadas as diferentes concentrações dos fluidos magnéticos MNP e MNP@Au1 por 24 e 48 horas e a viabilidade foi então medida. As análises estatísticas dos resultados mostraram que o fluido MNP não foi citotóxico nas concentrações testadas

até 12 ug Fe/mL, mantendo a viabilidade próxima de 100% (Figura 9). A amostra MNP@Au1 não foi citotóxica na concentração de 6,25 ug Fe/mL (Figura 10).

De acordo com os dados estatísticos, a amostra MNP apresentou toxicidade significativa ($p < 0,05$) a partir da concentração de 25 ug Fe/mL (Figura 9). A toxicidade de MNP@Au1 foi significativa a partir de 12,5 ug Fe/mL, sendo que a viabilidade celular inferior a 50% das células foi entre 25 e 100 ug Fe/mL em 48 horas de incubação (Figura 10). Para MNP a viabilidade mínima foi de 64,27% de células na concentração de 25 ug Fe/mL.

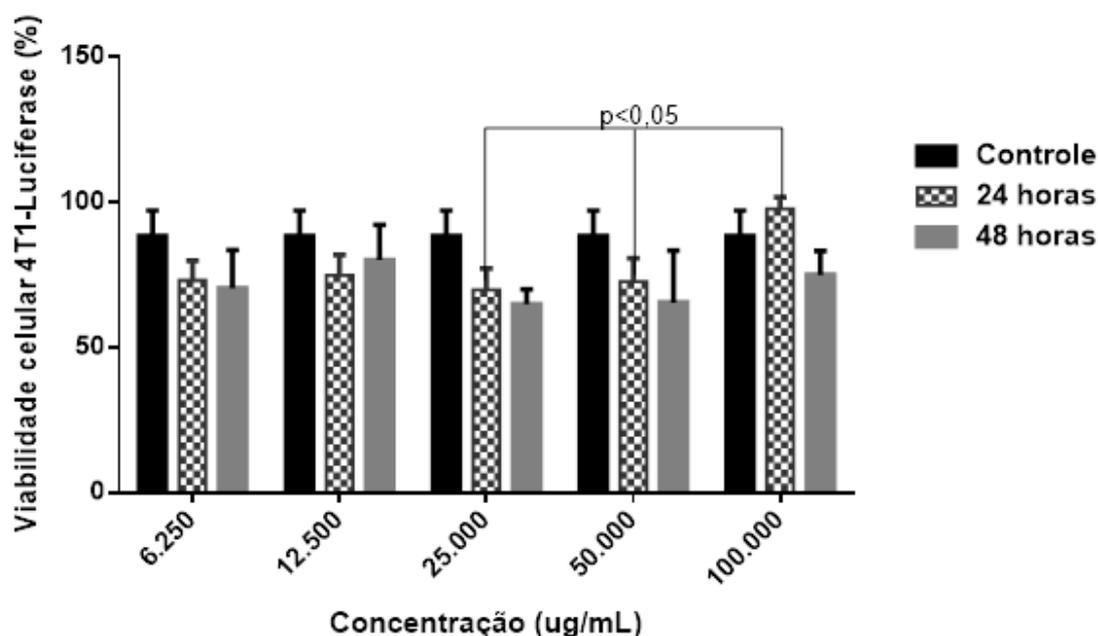


Figura 9. Análise da viabilidade das células de adenocarcinoma mamário murino (4T1-Luciferase), submetidas ao tratamento com MNP em diferentes concentrações, por um período de 24 e 48 horas e grupo controle positivo sem tratamento com o fluido magnético.

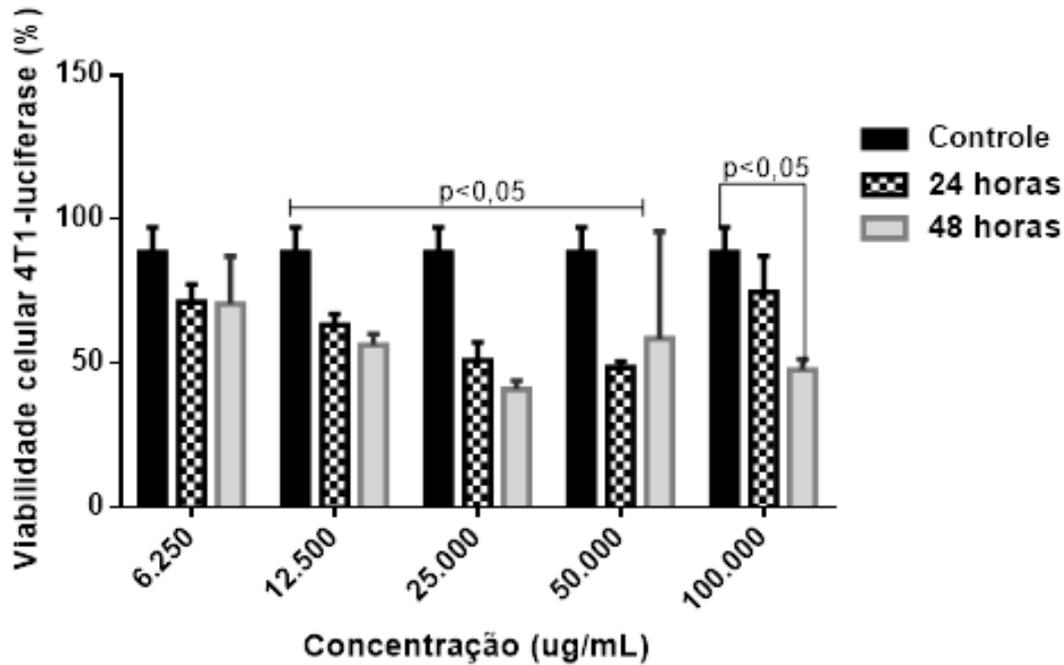


Figura 10. Análise da viabilidade das células de adenocarcinoma mamário murino (4T1-luciferase), submetidas ao tratamento com MNP@Au1 em diferentes concentrações, por um período de 24 e 48 horas e grupo controle positivo sem tratamento com o fluido magnético.

4.6 INTERIORIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS

A magnetohipertermia pode ser mais efetiva se as nanopartículas estiverem interiorizadas nas células tumorais por um tempo prolongado. Para avaliar se as células de 4T1 seriam capazes de interiorizar ou reter as nanopartículas magnéticas de MNP, MNP@Au1, foi realizada a MET. As células 4T1 foram tratadas com os fluidos magnéticos por 1 e 24 horas na concentração de 50 μg Fe/mL. De acordo com as fotomicrografias, as nanopartículas de MNP e MNP@Au1 localizam-se no citoplasma das células e dentro de estruturas semelhantes a vesículas, o que indica que as nanopartículas foram interiorizadas provavelmente a partir de um processo de endocitose (Figura 11). O fluido MNPAu2 não apresentou aquecimento significativo quando exposto ao campo magnético, sendo assim, nos demais ensaios *in vitro* e *in vivo* não foi utilizado esse fluido.

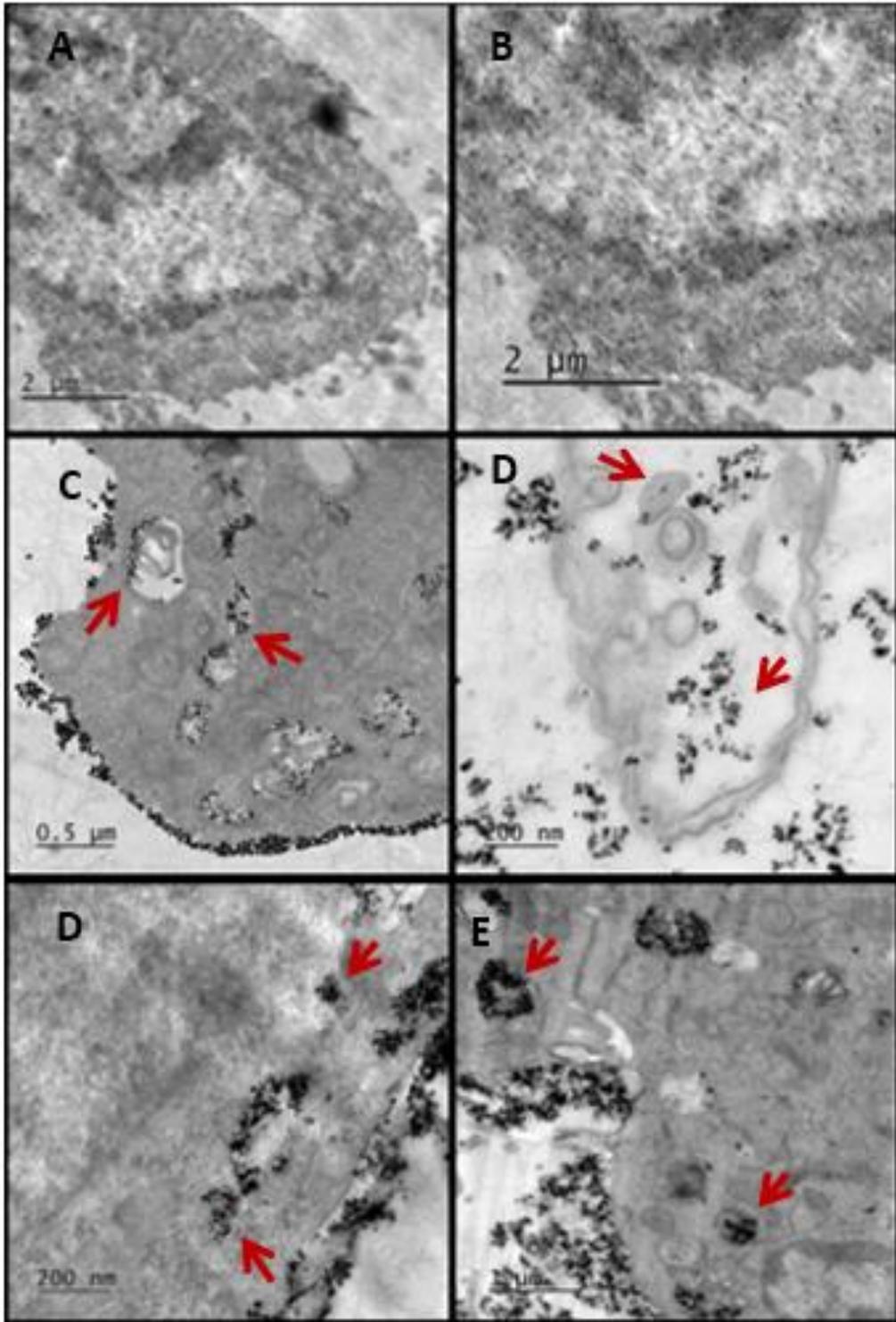


Figura 11. Fotomicrografia de células de adenocarcinoma mamário 4T1 - *luciferase* incubadas ou não com nanopartículas magnéticas. (A e B) Células controle, as quais não tiveram contato com nanopartículas. (C e D) Células incubadas com fluido MNP. (E e F) Células incubadas com fluido MNP@Au1. Setas vermelhas indicam as nanopartículas magnéticas.

4.7 ENSAIOS *IN VIVO*

4.7.1 Estudo do modelo animal

Os camundongos foram injetados subcutaneamente com células 4T1 – luciferase e foram acompanhados por 26 dias. O peso dos animais (Figura 12) e o aumento do volume tumoral (Figura 13) foram registrados a partir do aumento significativo do nódulo tumoral, no 14º dia. Como mostrado na Figura 12, não houve muita variação no peso dos animais ao longo do tratamento. Entretanto, o grupo de animais não tratados, G1, tiveram um aumento de peso no final do experimento, provavelmente provocado pela elevada massa tumoral que carregavam.

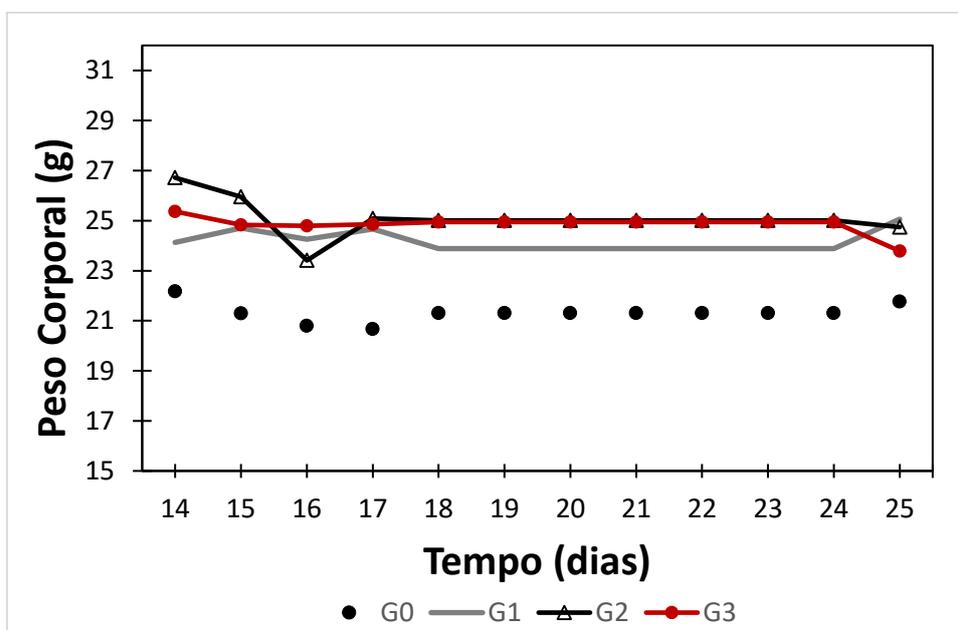


Figura 12. Peso corporal de camundongos (n=5) acompanhados durante o tratamento, ciclo de 5 dias e, após 7 dias do tratamento. G0 corresponde ao grupo saudável; G1, grupo sem tratamento; G2, grupo tratado com MNP; G3, grupo tratado com MNP@Au1.

Em relação ao tumor, observou-se que ele apresentou um crescimento elevado 7 dias após o tratamento, principalmente o grupo tratado com MNP + CMA, grupo G2, enquanto que o grupo tratado com MNP@Au1 + CMA, grupo G3, apresentou um aumento de aproximadamente 25 vezes, após 7 dias do tratamento, em comparação com o volume do tumor no primeiro dia do tratamento.

O grupo controle positivo (animais com tumor e não tratados) apresentou um aumento do volume tumoral inferior ao grupo G2 e G3, sendo que o aumento do volume tumoral foi de aproximadamente 15 vezes uma semana após o último dia de tratamento em comparação com o volume do tumor no primeiro dia de tratamento.

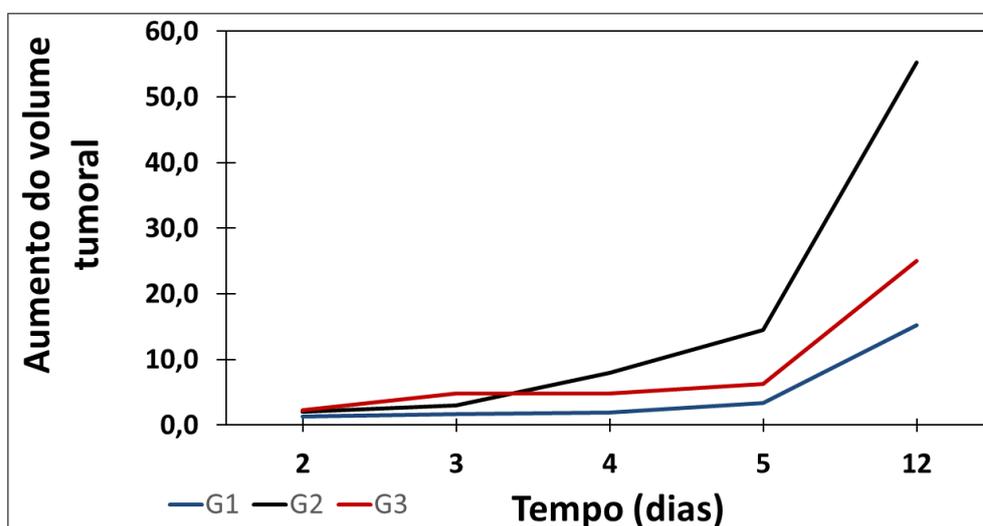


Figura 13. Monitoração do desenvolvimento do adenocarcinoma mamário murino durante 12 dias.

Os tumores também foram histopatologicamente avaliados após o sacrifício dos animais (Figura 14). As lâminas mostraram tumores com extensas áreas tumorais e típicas áreas de necrose isquêmica. Observa-se a efetividade da implantação subcutânea do nódulo tumoral, indicando sucesso no estabelecimento do modelo tumoral.

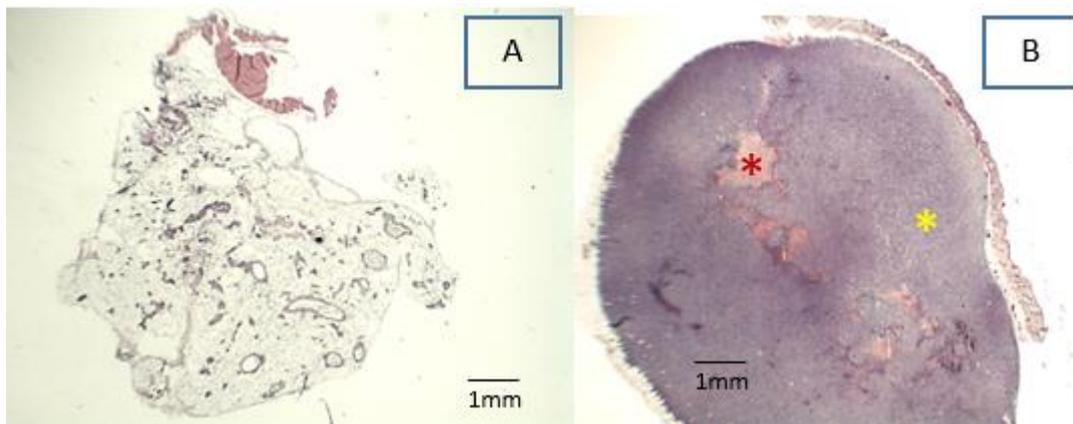


Figura 14. (A) Seção histológica da mama normal, grupo saudável. (B) Seção histológica da mama do grupo controle, detalhe mostrando tumor (* amarelo) e necrose isquêmica (* preto)

Juntos, os resultados dos pesos dos animais durante 12 dias, o aumento do volume tumoral e as análises histopatológicas com indicação de invasão tumoral demonstram a agressividade do modelo de adenocarcinoma mamário murino induzido subcutaneamente com células 4T1 – *luciferase*.

4.7.2 Avaliação histopatológica

A utilização de nanoestruturas como agentes terapêuticos implica também, além do potencial terapêutico, em elas serem hemocompatíveis, biodegradáveis em elas serem não tóxicas ao organismo.

Para avaliar a toxicidade de MNP@ e MNP@Au1 em um regime de tratamento para câncer de mama, os camundongos tiveram o adenocarcinoma mamário murino induzido e as amostras foram injetadas dentro do tumor. Após 7 dessa injeção, os animais foram sacrificados e os órgãos foram coletados para análises.

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

O fígado do grupo considerado saudável apresentou parênquima preservado, hepatócitos de tamanho normal e cápsula de tecido conjuntivo íntegra. Foi observado hematopoiese nos animais submetidos ao tratamento com fluido magnético e degeneração hidrópica no grupo controle, conforme Figura 15.

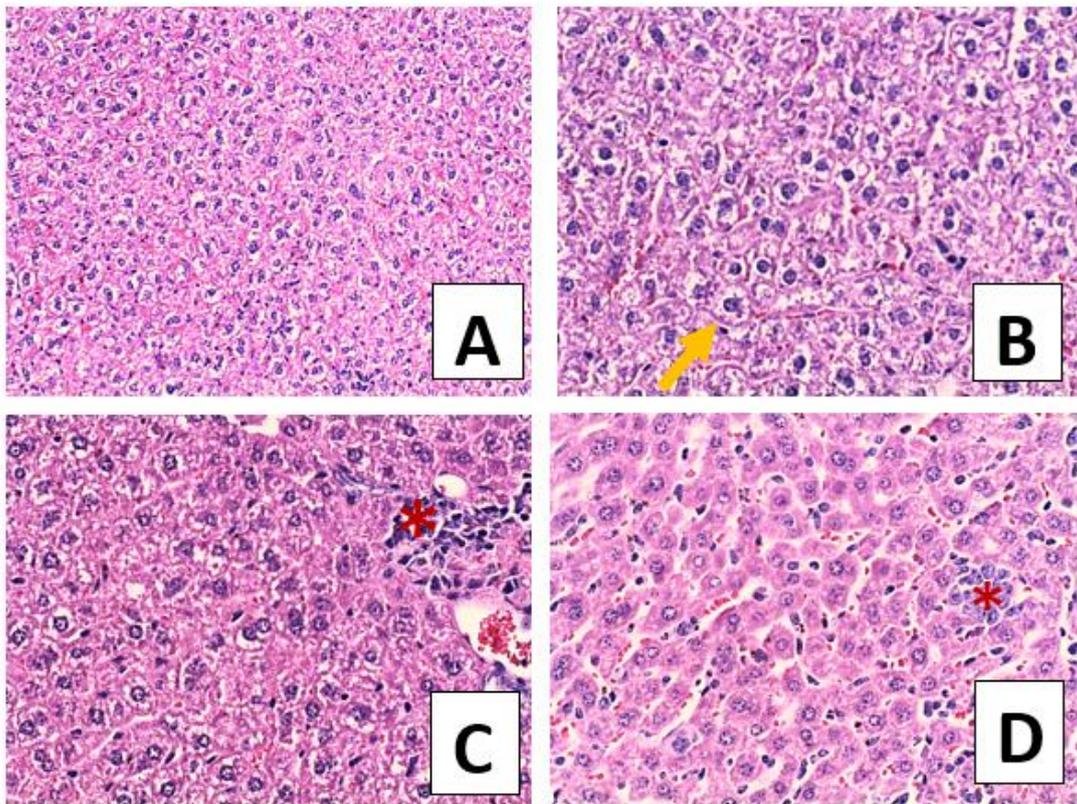


Figura 15 (A) Seção histológica do fígado do camundongo sem tumor, sem fluido magnético. (B) Seção histológica do fígado do camundongo do grupo controle, nota-se degeneração hidrópica (seta laranja). (C) Seção histológica do fígado do camundongo tratado com fluido MNP, nota-se Hematopoiese (*). (D) Seção histológica do fígado do camundongo do grupo tratado com MNP@Au1, * vermelho indicando hematopoiese (HE, 200X).

No baço, as áreas de polpa branca são bem delimitadas e nota-se a presença de hematopoiese nos grupos saudáveis e com aplicação dos fluidos magnéticos, conforme Figura 16.

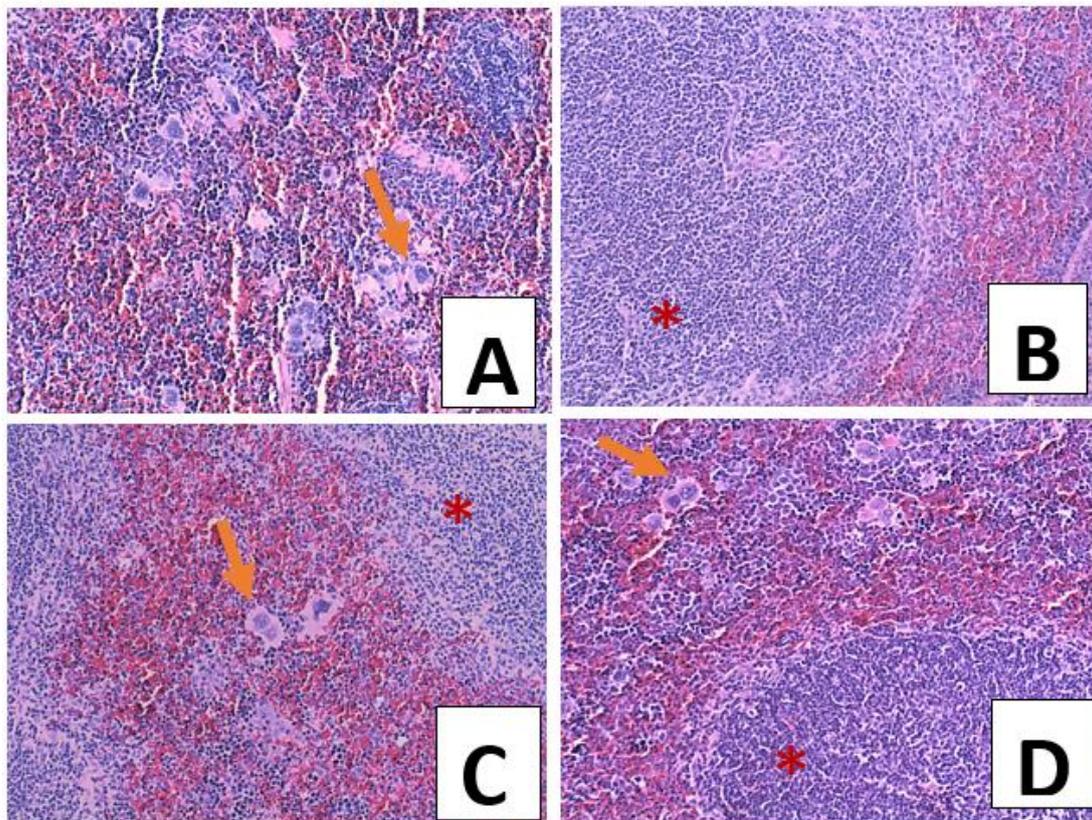


Figura 16 (A) Seção histológica do baço do camundongo sem tumor, sem fluido magnético, nota-se hematopoiese, indicado com seta laranja. (B) Seção histológica do baço do camundongo do grupo controle, * vermelho, hiperplasia linfoide. (C) Seção histológica do baço do camundongo com fluido MNP aplicado no tumor, a seta laranja é um indicativo de hematopoiese, * vermelho, hiperplasia linfoide. (D) Seção histológica do baço, seta laranja indicando hematopoiese e * vermelho, hiperplasia linfoide (nodulo linfático); polpa branca. (HE, 100X)

Na seção histológica dos pulmões nota-se congestão no grupo sem tumor e sem fluido magnético (Figura 17.A). Nota-se hemorragia no grupo controle, com tumor, sem tratamento (Figura 17.B) e no grupo tratado com fluido MNP (Figura 17.C). O grupo tratado com fluido MNPAu1 desenvolveu metástase (Figura 17.D).

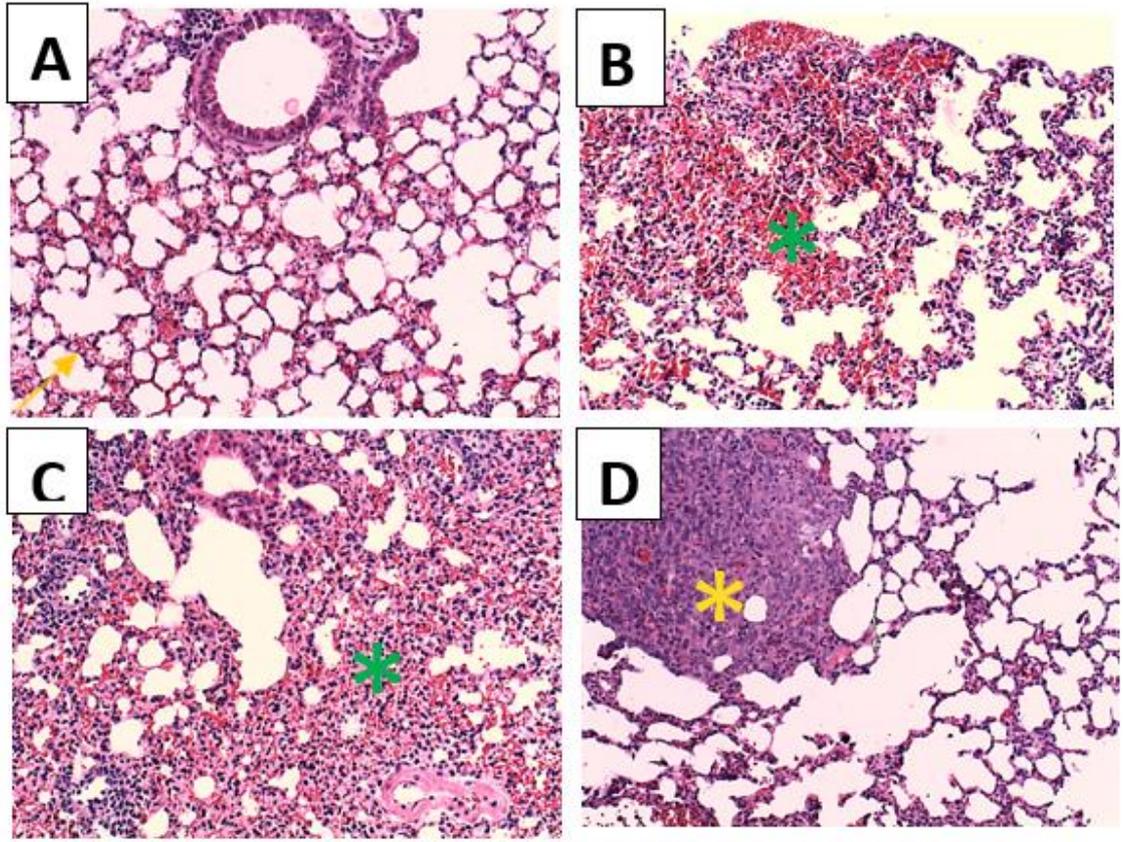


Figura 17. Seções histológicas dos pulmões dos camundongos 11 dias após a injeção dos fluidos magnéticos no tumor. (A) Seção histológica do pulmão do camundongo sem tumor, sem fluido magnético, nota-se congestão (Seta laranja). (B) Seção histológica do pulmão do camundongo do grupo controle, * verde é um indicativo de hemorragia. (C) Seção histológica do pulmão do camundongo tratado com fluido MNP, * verde é um indicativo de hemorragia. (D) Seção histológica do pulmão com indicativo em amarelo de metástase, no camundongo tratado com MNP@Au1. (HE, 100X).

Nos rins analisados, a camada cortical apresentou túbulos e glomérulos de morfologia padrão, e zona medular compatível com a normalidade, conforme Figura 18.

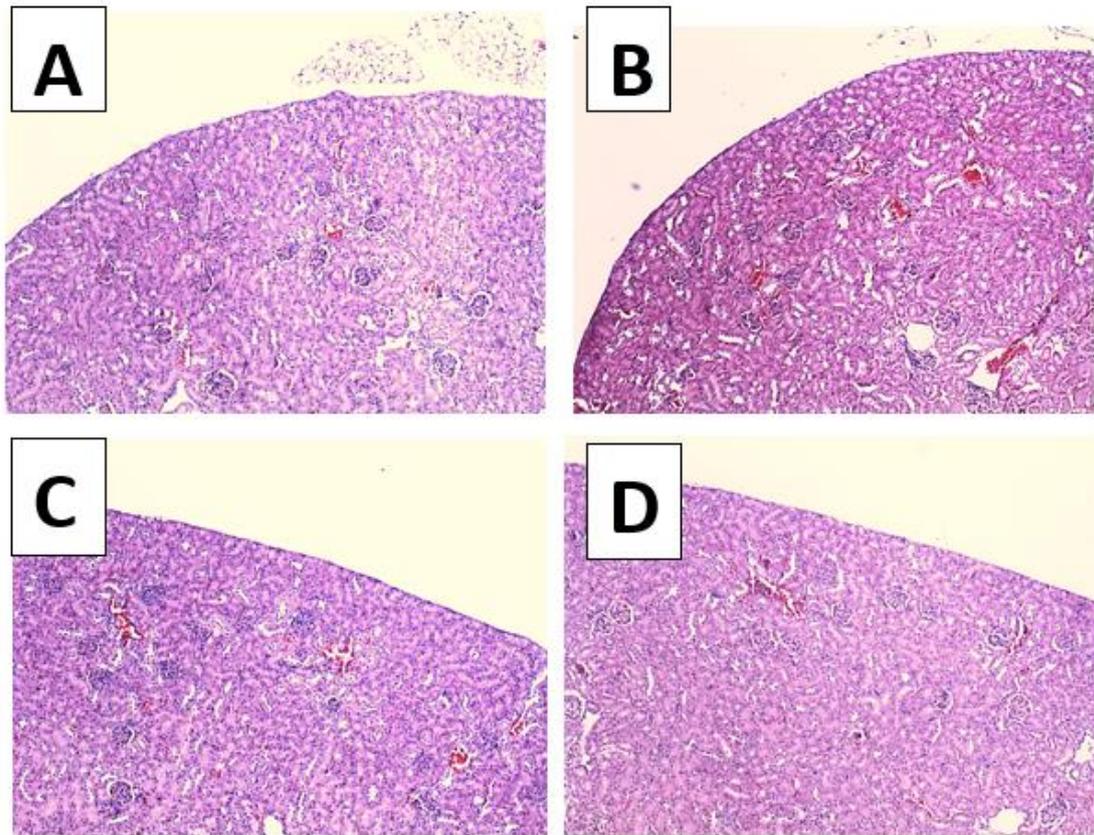


Figura 18. Seções histológicas dos rins dos camundongos 11 dias após a injeção dos fluidos magnéticos no tumor. Camundongos que não tiveram fluido magnético aplicado no tumor serviram como controle. (A) Seção histológica do rim do camundongo saudável, sem tumor, sem fluido magnético. (B) Seção histológica do rim do camundongo do grupo controle. (C) Seção histológica do rim do camundongo com fluido MNP aplicado no tumor. (D) Seção histológica do rim do camundongo com fluido MNP@Au1 aplicado no tumor (HE, 100X).

O cérebro mostrou células gliais com núcleos bem definidos conforme o tipo celular, os neurônios piramidais e capilares bem preservados, conforme Figura 19.

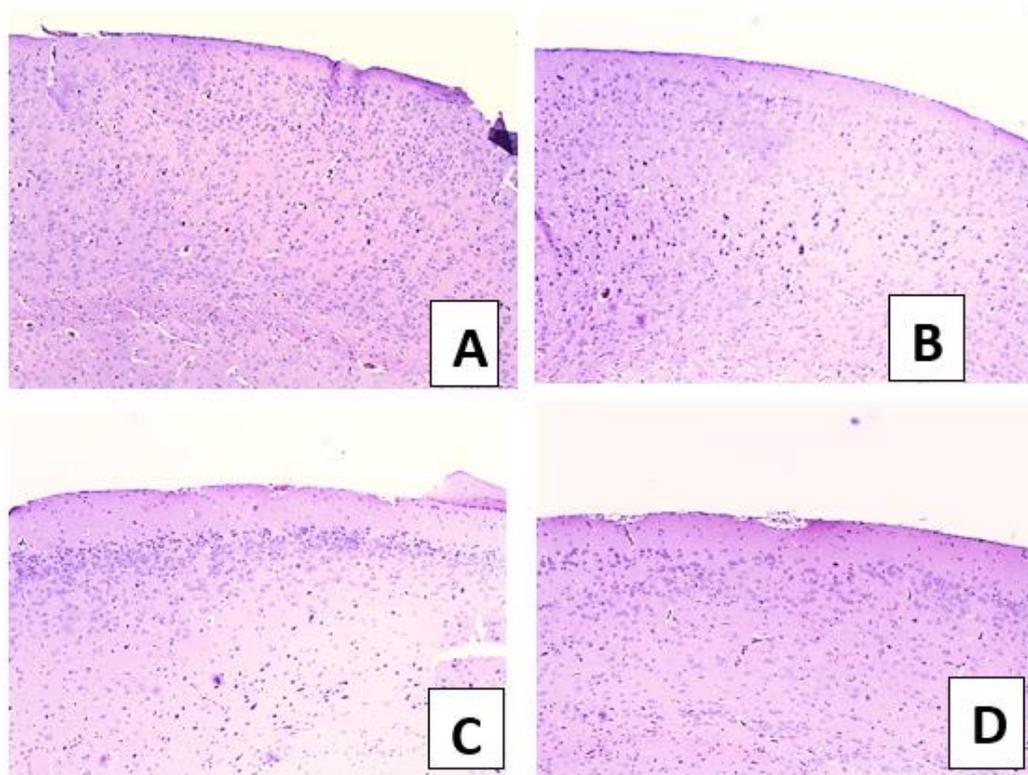


Figura 19. Seções histológicas do cérebro dos camundongos 12 dias após a injeção dos fluidos magnéticos no tumor. Camundongos que não tiveram fluido magnético aplicado no tumor serviram como controle. (A) Seção histológica do cérebro do camundongo saudável, sem tumor, sem fluido magnético. (B) Seção histológica do cérebro do camundongo do grupo controle. (C) Seção histológica do cérebro do camundongo com fluido MNP aplicado no tumor. (D) Seção histológica do cérebro do camundongo com fluido MNP@Au1 aplicado no tumor (HE, 100X).

Os pesos do fígado e baço foram anotados após o sacrifício dos animais (Figura 20). Nenhuma perda significativa de peso do fígado foi observada nos diferentes grupos. A alteração no peso do baço só aconteceu entre o grupo tratado apenas com MNP em relação aos grupos controle negativo (grupo 0), controle positivo (grupo 1), tratado com MNP + CMA (grupo 2) e o grupo tratado apenas com MNP@Au1 (grupo 5)

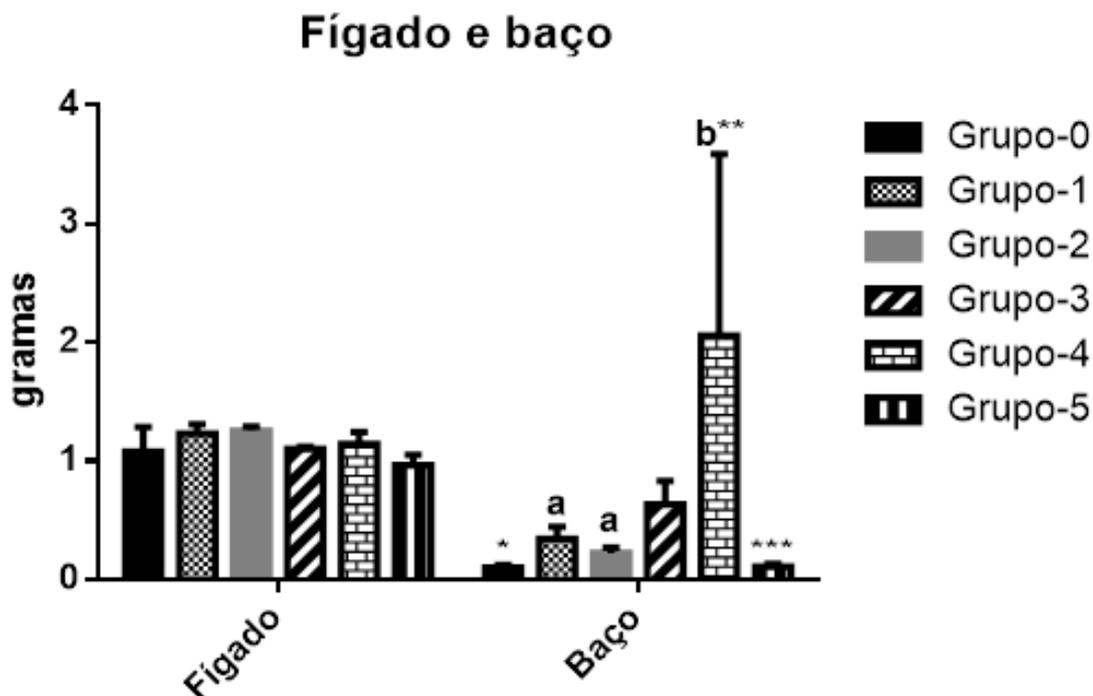


Figura 20. Pesos do fígado e baço de camundongos com adenocarcinoma mamário murino que foram eutanaziados 7 dias após injeção intratumoral de MNP e MNP@Au1. Camundongos sem tumor foram utilizados como controle negativo, enquanto os animais com tumor sem tratamento, controle positivo.

4.7.3 Magnetohipertermia

Tendo verificado que as amostras MNP e MNP@Au1 são capazes de aquecer através dos testes preliminares envolvendo alíquotas dos fluidos expostas à campos magnéticos variando de 9 – 25 mT, essas amostras foram utilizados para o tratamento do câncer de mama dos animais utilizando magnetohipertermia.

Após a caracterização das amostras MNP e MNP@Au1, os fluidos magnéticos foram testados em relação à sua capacidade de atuar como agente terapêutico contra o adenocarcinoma mamário murino, sob indução de um campo magnético alternado após ser injetado dentro do tumor do animal. Para este ensaio, o camundongo foi anestesiado e colocado dentro do equipamento gerador de campo magnético alternado (CMA). Os camundongos receberam injeção intratumoral de MNP, MNP@Au1 ou PBS (controle negativo) e foram deixados no equipamento por 30 minutos.

O tratamento foi baseado em 3 aplicações da amostra e 5 exposições ao CMA em dias consecutivos. Foram utilizados três grupos de camundongos, incluindo tratamento e

controle, estando assim distribuídos: [G1] animais que não tiveram nenhum tratamento, [G2] animais tratados com MNP + CMA, [G3] animais tratados com MNP@Au1 + CMA. Os animais de cada grupo foram analisados uma semana após o término do tratamento. O primeiro aspecto observado foi o estado da doença nos animais. Em todos os grupos analisados havia animais, com atividade motora reduzida, caracterizado por isolamento no canto da gaiola, sem reação quando eram pegos para a imobilização. Nos animais que receberam tratamento de fluido magnético + CMA, observou-se que eles eram mais ativos e o estado de morbidade em geral era menor do que no grupo sem tratamento.

O peso dos animais foi monitorado durante o regime de tratamento e no dia em que foram sacrificados (Figura 21). O gráfico de peso após uma semana do fim do tratamento mostrou uma tendência dos animais tratados com fluido magnético contendo nanoestruturas de maghemita revestidas com ouro + CMA manterem seu peso após o ciclo de tratamento quando comparados com os animais tratados com MNP + CMA. Entretanto, não houve diferença estatística entre os grupos tratados com MNP + CMA (grupo 2), MNP@Au1 + CMA (grupo 3) e o grupo não tratado (grupo 1). Estatisticamente houve diferença entre o peso do grupo controle negativo, grupo 0, comparado aos grupos tratados com fluidos magnéticos associados ao CMA e o grupo não tratado. Em contraposição não houve diferença estatística entre o peso dos grupos tratados somente com os fluidos MNP (grupo 4) e MNP@Au1 (grupo 5) com relação aos demais grupos.

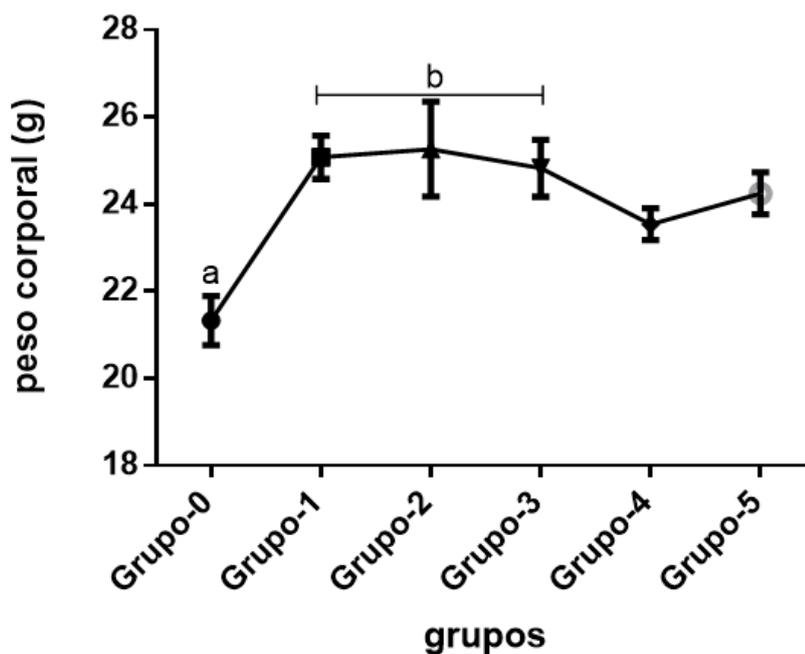


Figura 21. Peso corporal dos camundongos acompanhados por 7 dias após um ciclo de 5 dias de tratamento tumoral com magnetohipertemia.

O volume dos tumores dos animais também foi acompanhado durante os dias de tratamento e uma semana após o ciclo de tratamento, de acordo com o gráfico da Figura 22, parece haver uma tendência de manutenção do volume tumoral, até três dias de tratamento, do grupo controle positivo (grupo G1), e dos animais tratados apenas com MNP e MNP@Au1, G4 e G5 respectivamente. Entretanto todos os grupos apresentaram aumento do volume tumoral 7 dias após o término do ciclo de tratamento.

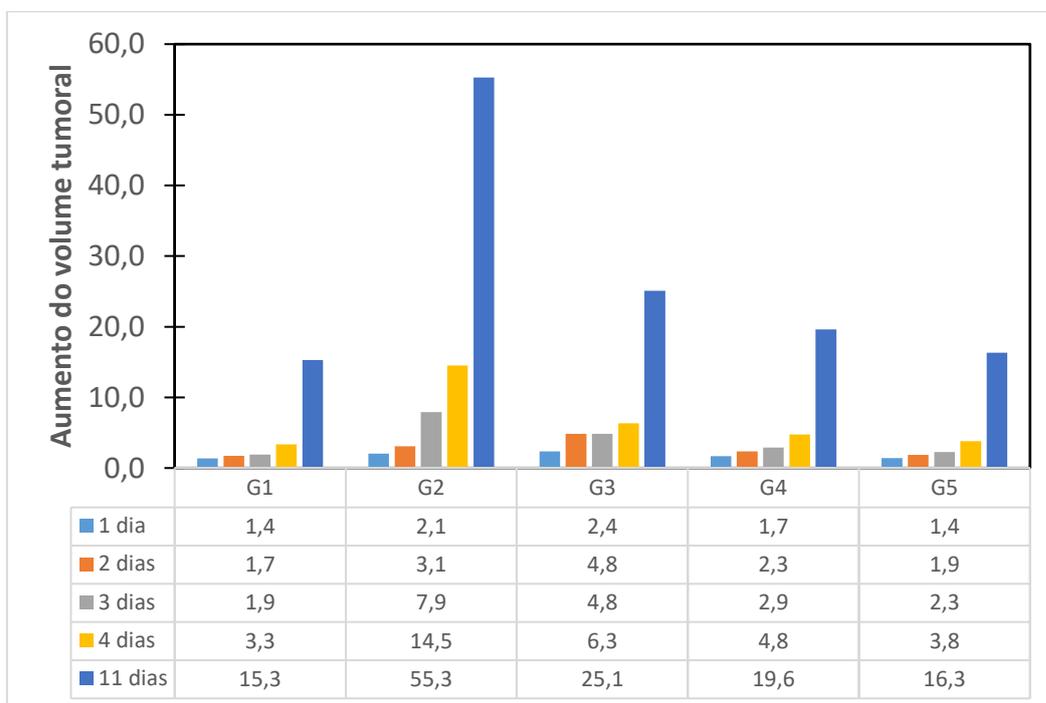


Figura 22. Aumento do volume tumoral dos camundongos acompanhados por 11 dias após o início de um ciclo de tratamento do adenocarcinoma mamário murino com magnetohipertermia

O peso do tumor também foi analisado após o sacrifício dos animais 7 dias após o término do ciclo de tratamento (Figura 23). Em concordância com os dados de volume tumoral, esses resultados mostraram que uma semana após o tratamento de magnetohipertermia, os pesos dos tumores dos camundongos dos grupos tratados com fluido magnético MNP (grupo G4) e MNP@Au1 (Grupo G5), foram menores em relação aos tumores do grupo de animais tratados com MNP + CMA (grupo G2) e tratados com

MNP@Au1 + CMA (grupo G3). Apesar dessa diminuição, os resultados não foram estatisticamente significativo

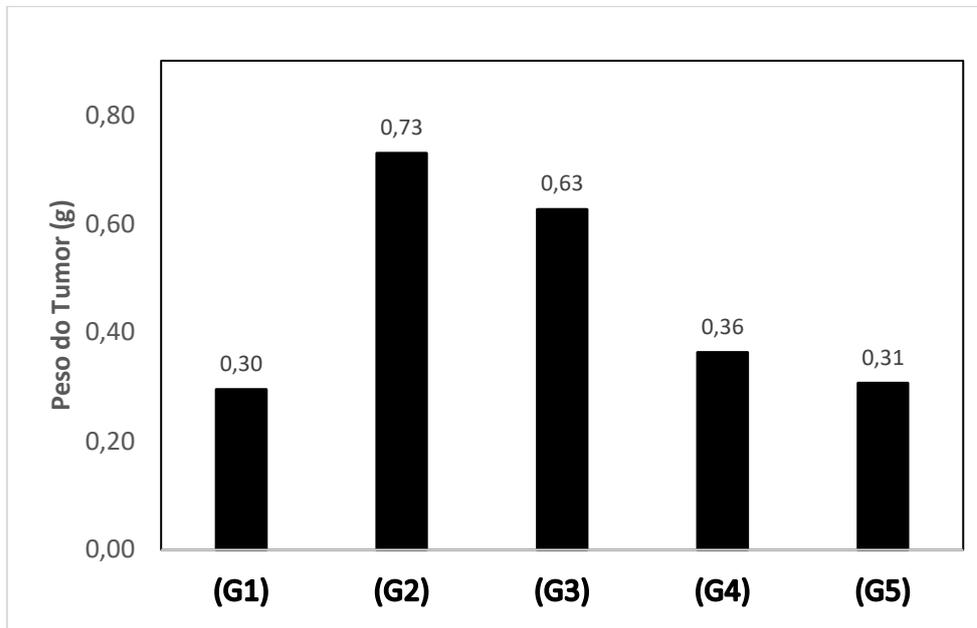


Figura 23. Peso dos tumores dos camundongos em diferentes grupos após 1 dia e 7 dias do tratamento tumoral com magnetohipertermia.

As áreas de necrose nos tumores dos animais foram quantificadas e os resultados mostraram que os camundongos dos grupos que receberam fluido magnético e CMA, Grupo G2 e G3, tiveram maior quantidade de necrose isquêmica no tumor do que os animais que não receberam tratamento, grupos: G1, G4 e G5 (Figura 24). Além disso, os animais tratados com MNP@Au1 + CMA, grupo G3, tiveram uma maior quantidade de necrose a partir do tratamento comparados com o grupo tratado com MNP + CMA, grupo G2.

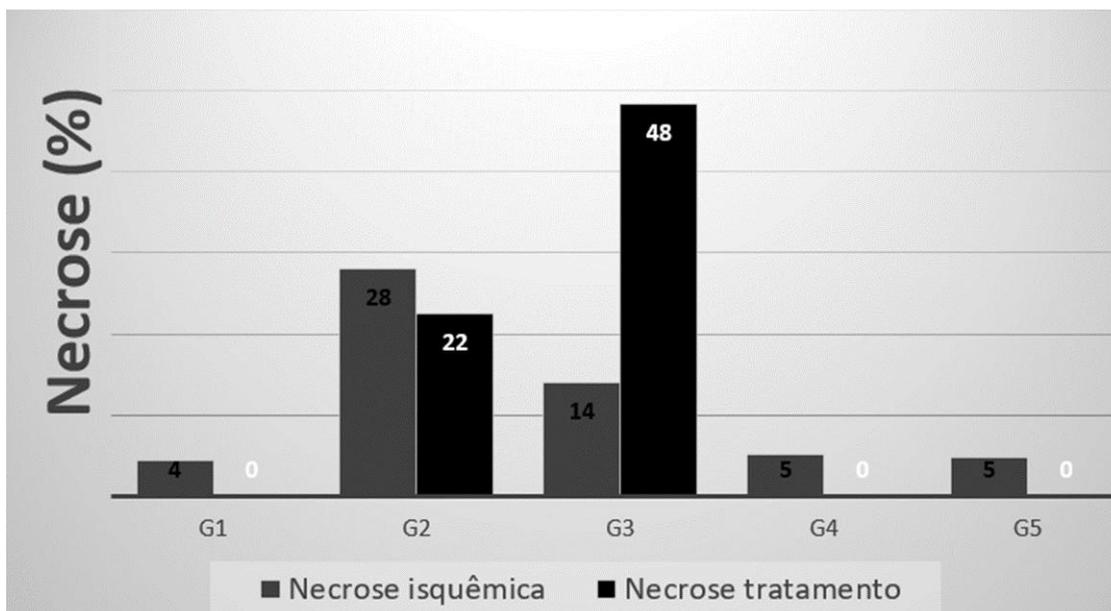


Figura 24. Porcentagem de necrose nos tumores dos camundongos em diferentes grupos após 1 dia do tratamento tumoral com magnetohipertermia.

Dentro dos parâmetros histológicos considerados como resposta do tumor à terapia tem-se necrose isquêmica; necrose pós tratamento; redução do tamanho em relação ao inicial. Existem outros parâmetros, mas estes são os principais que foram avaliados neste trabalho.

O carcinoma mamário apresenta vários tipos histológicos: tubular, cribriforme, sólido, comedo e papilar; diversos graus histológicos (baixo grau e alto grau). Contudo, a indução tumoral nestes camundongos produziu geralmente o carcinoma sólido de alto grau.

Os tumores foram histopatologicamente avaliados após o sacrifício dos animais, 7 dias após o tratamento (Figura 25). Observa-se que o grupo tratado com MNP@Au1 + CMA apresentou uma maior área de necrose pós tratamento comparado ao grupo tratado com MNP + CMA.

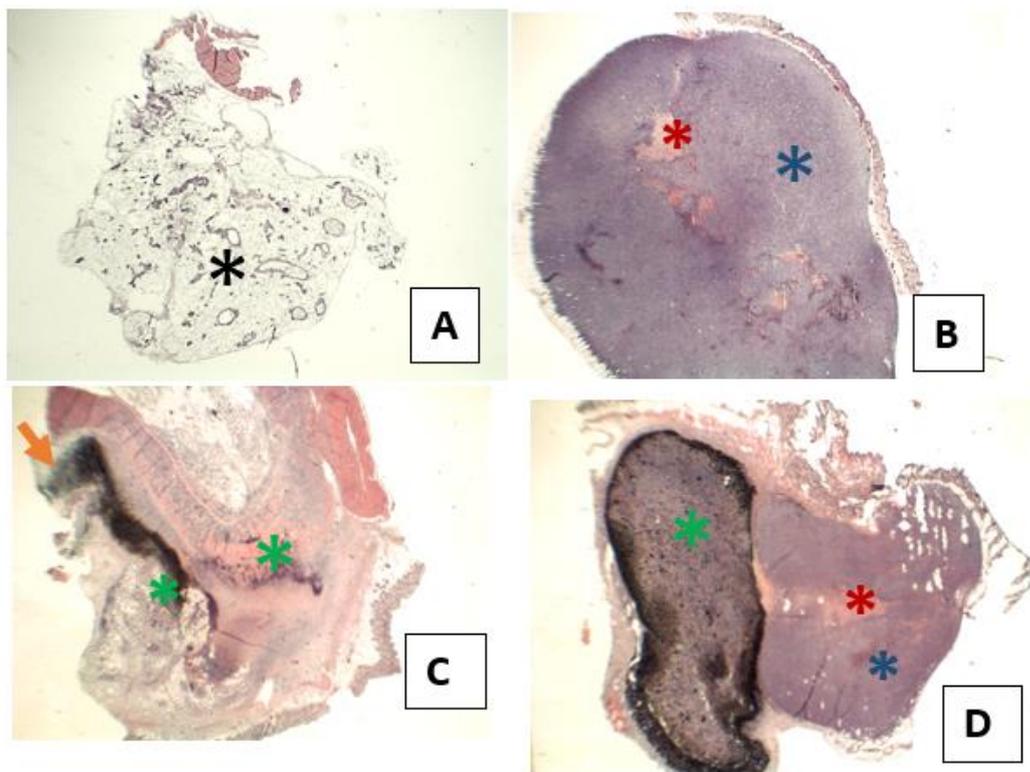


Figura 25. (A) Microscopia da mama normal (*) do grupo controle negativo, camundongos sem tumor. (B) Mama com tumor (*) do grupo controle positivo, com tumor e sem tratamento, necrose isquêmica (*). (C) Mama do grupo tratado com MNP, nota-se necrose pós-tratamento (*). (D) Mama do grupo tratado com MNP@Au1, nota-se necrose pós-tratamento (*), necrose isquêmica (*) e tumor (*)

As lâminas coradas com hematoxilina e eosina (HE) mostraram a transição necrose – tumor do animal do controle positivo (Figura 26. D), a presença de ferro no grupo tratado com MNP + CMA e hemossiderofagia no grupo tratado com MNP@Au1 + CMA.

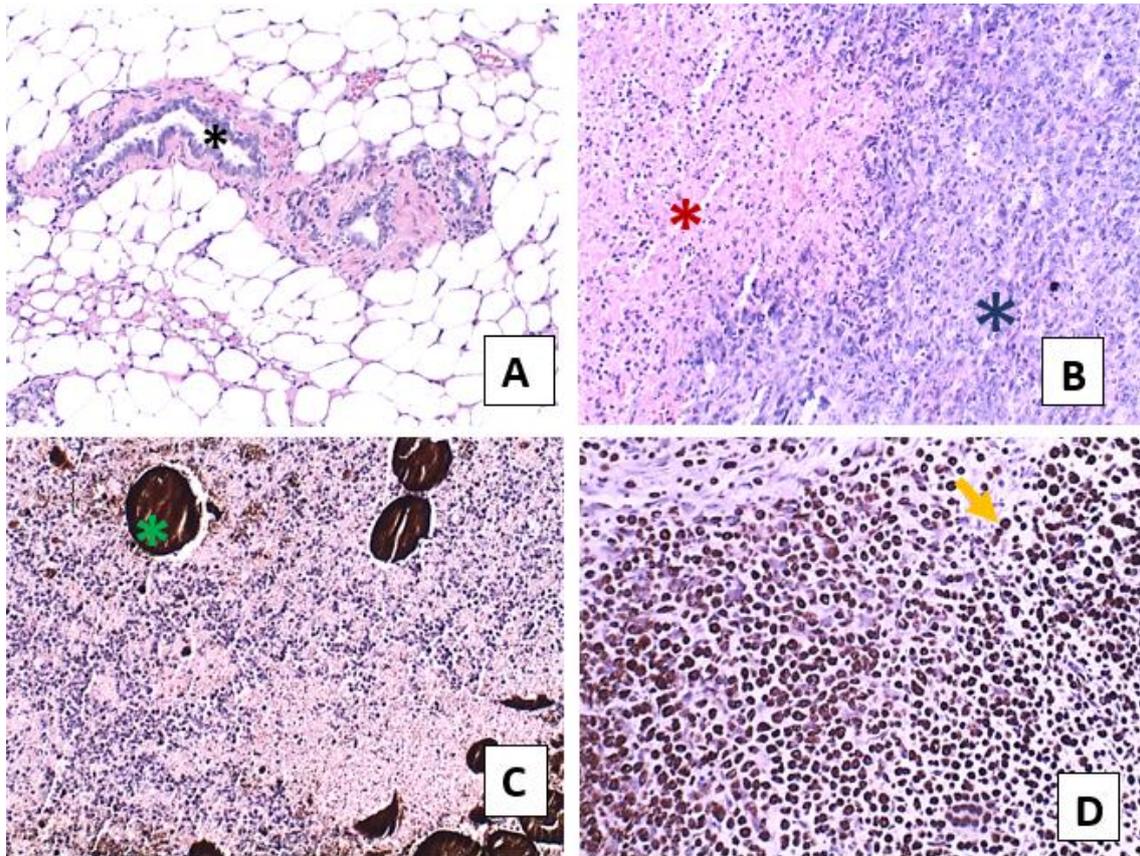


Figura 26. (A) Seção histológica da mama do camundongo do Grupo controle negativo, nota-se a glândula normal (*). (B) Transição necrose isquêmica(*)-tumor(*) da mama do grupo controle positivo. (C) necrose pós-tratamento do grupo tratado com MNP nota-se a presença de ferro (*). (D) Presença de hemossiderofagia (seta laranja) no grupo tratado com MNP@Au1 (HE, 100X)

5. DISCUSSÃO

Nesta pesquisa foram feitos testes para avaliar a potencialidade de nova amostra de fluido magnético no tratamento do adenocarcinoma mamário murino por magnetohipertermia. Diversas nanoestruturas estão sendo atualmente testadas como agentes terapêuticos, diagnósticos e prognósticos. Neste contexto, as nanopartículas magnéticas, principais constituintes dos fluidos magnéticos, possuem grande visibilidade porque representam amostras biocompatíveis, versáteis e multifuncionais, cujas principais vantagens sobre os outros sistemas são o direcionamento magnético ao alvo, uso como meios de contraste em exames de imagem e a realização da técnica de magnetohipertermia para o tratamento do câncer.

Os fluidos magnéticos contendo ouro (MNP@Au1 e MNP@Au2) representam novas amostras preparadas a partir de uma amostra já previamente utilizada e caracterizada pelo grupo do Prof. Marcelo Sousa [62], esta constituída de nanoestruturas de maghemita cobertas com citrato (amostra MNP). Alguns estudos já mostraram que nanoestruturas de maghemita revestidas com citrato são adequadas para a associação de moléculas de metálicas [62] e o ouro por ser um metal biocompatível, aprovado pela FDA, também foi associado a essas nanopartículas produzindo os fluidos magnéticos MNP@Au1 e MNP@Au2.

Neste trabalho, a caracterização dessas novas amostras MNP@Au1 e MNP@Au2 como tamanho e concentração de ferro e ouro foram realizadas pelo grupo do prof. Marcelo que utilizaram as técnicas de microscopia eletrônica de varredura e difratometria de raios X, tendo obtido o diâmetro de 17,9, 14 e 17,4 nm para as mostras MNP, MNP@Au1 e MNP@Au2 respectivamente, através de microscopia eletrônica de varredura e 15,06, 15,67 e 15,77 nm por difratometria de raios X. A diferença observada nos resultados é devido ao emprego de diferentes metodologias, o que está de acordo com os resultados prévios [89] e os obtidos por Mamani e colaboradores [90], os quais também obtiveram um tamanho menor da nanopartícula magnética por DRX do que pela técnica de MET. Nesse sentido, levando-se em consideração as limitações de cada método, como o fato do diâmetro das nanopartículas serem medidas manualmente nas análises por MET, por exemplo, essas diferenças não foram consideradas na avaliação da amostra. Para aplicações biomédicas, o método de preparo de nanopartículas de óxido de ferro mais utilizado é a co-precipitação de íons de ferro em meio alcalino [97] e os resultados

similares obtidos quanto ao tamanho nas nanopartículas demonstram a boa reprodutibilidade da metodologia.

Além do diâmetro reduzido, as fotomicrografias de MET revelaram a forma esférica das nanoestruturas. Não é possível fazer inferências sobre o grau de agregação das nanopartículas pela técnica de MET, uma vez que para serem observadas por esta técnica, as amostras devem ser desidratadas. De qualquer forma, através do potencial zeta é possível concluir se as amostras formam aglomerações entre si.

A avaliação dos valores de potencial zeta mostrou que as NPM, contendo ou não ouro apresentaram cargas negativas. Em consonância com a revisão da literatura, nanopartículas magnéticas revestidas com citrato e ouro possuem carga negativa [62]. O fato do ponto isoelétrico dos fluidos magnéticos constituídos por nanoestruturas de maghemita revestidas com ouro ser 2 pode ser um indicativo de que o ouro está cobrindo toda a superfície das nanopartículas magnéticas, uma vez que, o ponto isoelétrico da maghemita é em pH 6,8, enquanto do ouro em pH 2. Os resultados de potencial zeta evidenciaram valores absolutos elevados, o que coloca essas nanopartículas como sistemas bastante estáveis. Valores de potencial zeta maiores que 30 mV, em módulo, são considerados atributos que conferem boa estabilidade da suspensão coloidal [98], uma vez que a repulsão eletrostática contribui significativamente para esta estabilidade, não sendo, no entanto, a única característica que confere estabilidade às nanopartículas. Outro dado importante obtido dessas análises de estabilidade coloidal foi que não houve diferença estatística em relação ao potencial zeta entre os fluidos MNP, MNP@Au1 e MNP@Au2 e, além disso no pH sanguíneo (7,4), as nanopartículas revestidas com citrato e ouro apresentam carga negativa, superior à 30 mV, em módulo, causando uma repulsão eletrostática e evitando a formação de aglomerados, o que sugere a possibilidade de aplicação dos fluidos *in vivo* sem a desvantagem em relação à aglomeração das nanopartículas, muito comum em vários tipos de amostras nanoestruturadas [92] [93].

O citrato de sódio ou sal sódico do ácido cítrico é um composto presente naturalmente no organismo humano porque faz parte das vias metabólicas. O FDA reconhece o citrato de sódio como seguro e o autoriza como aditivo alimentar, aparece na lista como E – 331 e serve como emulsionante, estabilizador, reguladora da acidez sequestrante. A utilização do citrato de sódio em NPM produz uma suspensão coloidal estável em água e elas se apresentam biocompatíveis quando utilizadas em baixas concentrações para aplicações *in vitro* [62]. Os trabalhos encontrados na literatura que utilizam nanopartículas de óxido de ferro cobertas com citrato, mostram dados bem

estabelecidos quanto ao tamanho e potencial zeta das nanopartículas, citotoxicidade e biocompatibilidade [62]. Nossos resultados corroboraram esses já existentes e mostram ainda que os fluidos MNP@Au1 e MNP@Au2 são mais estáveis do que as amostras MNP, apontando para o fato de o ouro conferir ainda mais estabilidade ao fluido magnético que o citrato de sódio.

O efeito da citotoxicidade do fluido magnético contendo ouro foi avaliado pelo teste de viabilidade celular segundo o método do MTT. Apesar dos relatos na literatura quanto às complicações para a realização do MTT [93] [94], como a interação entre os nanomateriais e os reagentes ou produtos do ensaio, este tem sido o método mais utilizado para acessar a nanotoxicidade *in vitro* [95]. Até o momento não foi relatada nenhuma interação de nanopartículas de maghemita com reagentes ou produtos do ensaio de MTT que pudessem inviabilizar sua utilização com esse material. Além disso, não foi observada a aderência das nanopartículas dos fluidos FMS e FM nas placas de cultura utilizadas, o que poderia interferir com a leitura no espectrofotômetro para a quantificação do formazan.

Os resultados obtidos no ensaio de MTT mostraram que o fluido magnético MNP não provocou redução de 50% de viabilidade para as células 4T1 - *luciferase* nas concentrações entre 6,25 – 100 ug/mL em 24 e 48 horas de incubação. O fluido MNP@Au1, também, não reduziu em 50% a viabilidade celular nas concentrações entre 6,25 – 100 ug/mL em 24 horas de incubação. Apesar da diminuição da viabilidade celular, os resultados não são considerados como tóxicos para as células 4T1 - *luciferase*. Entretanto, a toxicidade foi observada nos resultados dos testes com a concentração entre 25 – 100 ug Fe/mL, nos quais as células apresentaram viabilidade inferior à 50% em 48 horas de incubação. Os resultados encontrados estão de acordo com os dados da literatura sobre a concentração tóxica de nanopartículas de maghemita revestida com ouro, utilizando diferentes linhagens celulares e diferentes metodologias para acessar a toxicidade [97] [98].

Apesar deste estudo não ter testado a toxicidade dos fluidos magnéticos em células normais, outros trabalhos que utilizaram nanopartículas de óxido de ferro revestidas com ouro já mostraram que células normais como nas linhagens de queratinócitos (HaCaT) de humano e linhagem de fibroblasto (NIH/3T3) de camundongo, obtiveram viabilidade celular superior à 80% em 24 horas de incubação, nas concentrações entre 6,25 – 100 ug de ferro/mL [62]. Nesse contexto, a estratégia do presente estudo foi escolher uma

concentração que fosse biocompatível com as células normais e que, após a aplicação do campo magnético de frequência alternada, a toxicidade fosse específica para as células

Em relação à interiorização das nanopartículas dos fluidos MNP e MNP@Au1 pelas células de adenocarcinoma mamário murino, foi verificada a presença de ambas no interior das células da linhagem 4T1 – *luciferase* e que elas estavam dentro de estruturas semelhantes a vesículas, sugerindo que essas nanopartículas foram interiorizadas mediante o processo de endocitose. Estudos mostram que a cobertura e o tamanho das nanopartículas possuem efeito sobre sua interiorização [101]. A MET foi realizada com o objetivo qualitativo, portanto não foi possível realizar inferências sobre a quantidade de nanopartículas interiorizadas do fluido MNP e do fluido MNP@Au1, se havia maior quantidade de uma ou de outra, mas pode-se concluir que, ao mesmo tempo em que o ouro não foi um obstáculo para a interiorização dessas nanopartículas, ele também não promoveu vantagens em relação às nanopartículas sem ouro neste processo.

Os estudos *in vivo* permitem analisar os efeitos das nanopartículas a longo prazo, sua biodistribuição e retenção tumoral [95], além de avaliar seu efeito nanotóxico. A maioria dos estudos de nanotoxicidade e de biodistribuição das nanopartículas [88] tem utilizado injeção endovenosa das nanoestruturas. No entanto, a circulação sistêmica induz no transporte das nanopartículas pelo sistema retículoendotelial do fígado e do baço, ocasionando a retenção das partículas opsonizadas pelos macrófagos residentes nestes órgãos [103]. Uma das alternativas para contornar essa situação é utilizar nanoestruturas furtivas, que sofrem modificações de superfície estratégicas para reduzir sua remoção prematura da circulação, o que pode ser promovido, por exemplo, por meio de polietilenoglicol (PEG) [104]. Outra medida que tem sido adotada é a realização da administração intra-arterial das nanopartículas próxima ao tumor, evitando, assim, que elas sejam capturadas e removidas antes de atingirem a massa tumoral [105] [106].

Neste estudo, foi escolhida a administração intratumoral das amostras. Uma vez que o câncer de mama oferece a facilidade de aplicação intratumoral, este método foi escolhido para tentar potencializar a entrega das nanopartículas ao tumor, já que a presença de grande quantidade de nanopartículas magnéticas no tumor é imprescindível para a realização da magnetohipertermia para tratamento do adenocarcinoma mamário murino.

Para avaliar a nanotoxicidade *in vivo* podem ser utilizadas diferentes técnicas. Neste trabalho foram investigadas as mudanças na morfologia do tecido, examinadas por histologia.

A injeção intratumoral dos fluidos magnéticos não provocou nenhuma alteração nos órgãos avaliados, fígado, baço, rim e cérebro, entretanto verificou-se a presença de metástase no pulmão dos grupos tratados com MNP e MNP@Au1. A análise histológica dos tumores dos animais revelou acúmulo de nanopartículas, após 7 dias de injeção intratumoral. Isto mostra o efeito da permeabilidade e retenção (EPR), característica das nanopartículas, devido à morfologia da capilaridade nos vasos sanguíneos do tumor. Outro fator importante a se considerar, é a relação dos tamanhos das nanopartículas com a biodistribuição no organismo. Blanco e colaboradores (2015) mostraram em seu estudo esta relação, e ressaltam que as partículas com diâmetros > 2.000 nm se acumulam dentro do baço e do fígado, bem como nos capilares dos pulmões. Enquanto, nanopartículas na faixa de 100-200 nm têm se mostrado extravasadas através de fenestrações vasculares de tumores (efeito EPR) e são filtradas pelo fígado e baço, conforme foi analisado pelo estudo da nanoformulação MIC-FOALCLFT. À medida que o tamanho aumenta além de 150 nm, as nanopartículas são aprisionadas dentro do fígado e do baço [107].

Não foram evidenciados aumentos no peso do fígado e também não foram encontradas alterações histológicas nesse órgão analisado, como necrose e inflamação entre os grupos controle negativo e os grupos tratados com MNP e MNP@Au1, entretanto observou-se degeneração hidrópica no grupo controle positivo. Estes resultados estão de acordo com os achados de Costa [108], que utilizaram nanopartículas de ouro.

Com relação à seção histológica do pulmão dos animais foi evidenciado metástase nos grupos tratados com os fluidos MNP e MNP@Au1. Este dado pode ser explicado devido ao fato das células utilizadas, 4T1, ser de uma linhagem altamente metastática. Uma forma que poderia melhorar a eficiência deste tratamento, seria diminuir os intervalos de tempo entre as sessões de aplicação da magnetohipertermia, visto que nestas circunstâncias o tratamento em si é mesmo invasivo. Neste trabalho foi utilizada a injeção intratumoral de NPM seguida de aplicação de campo magnético alternado para tratar o adenocarcinoma mamário murino. A injeção intratumoral foi escolhida porque, além de permitir um aumento de temperatura mais localizado sem danificar tecidos saudáveis adjacentes, os tumores de mama oferecem a facilidade de tratamentos intratumoral sem maiores dificuldades. No entanto, para tumores mais profundos, essa metodologia intratumoral também pode ser empregada com o auxílio de técnicas de injeção guiada (TC, ultrassom, endoscopia).

O tratamento do adenocarcinoma mamário murino com magnetohipertermia mostrou resultados promissores quanto à área de necrose pós tratamento. Para os animais

tratados com nanopartículas e CMA, foi utilizado 1 ciclo de tratamento, que corresponde a três aplicações da amostra magnética e 5 exposições ao CMA por 30 minutos cada em dias consecutivos. Os regimes de tratamento mais utilizados na literatura relatam uma, duas ou três exposições ao CMA por 30 minutos com intervalos de 24 h entre eles [109] [110] [111] [112] [113] [114] [115]. No entanto, alguns trabalhos também utilizam a hipertermia magnética por até 6 vezes de 20 ou 30 minutos cada [116] [117]

Neste trabalho a porcentagem de necrose encontrada nos tumores dos animais tratados com os fluidos magnéticos + CMA foi cerca de 10 vezes maior em relação aos animais não tratados e aqueles tratados apenas com os fluidos magnéticos. Estes resultados estão de acordo com outros estudos que também mostraram que a associação de nanopartículas magnéticas com a exposição ao CMA elevou o percentual de necrose em tumores sólidos [45] [118]. Portilho [118] verificou 76 a 100% de necrose em tumores sólidos de Ehrlich de animais tratados com polímeros de albumina magnéticos e CMA duas vezes ao dia durante três dias consecutivos. Estevanato [45], apesar de não ter quantificado o percentual de necrose, observou maior ocorrência de necrose tecidual quando o tratamento de adenocarcinoma mamário murino foi feito com nanocápsulas magnéticas de Selol juntamente com o quimioterápico Paclitaxel. Sabe-se que a eficiência da MHT está relacionada a alguns fatores como o tamanho, distribuição de tamanho e forma das nanopartículas, assim como a frequência e força do campo magnético utilizado [119] [120]. As diferenças observadas entre os estudos citados acima e o presente trabalho podem ser explicadas pelos parâmetros inerentes às nanopartículas (tamanho, forma, quantidade de ferro), recobrimento do núcleo magnético, que foram bem diferentes das nanopartículas utilizadas neste trabalho, pelos tipos de tumores tratados, os quais respondem de forma diferente às terapias.

Em suma, pôde-se observar pelas análises histológicas que o tratamento utilizando a magnetohipertermia com o fluido magnético MNP@Au1, possibilitou a regressão neoplásica, sendo uma nova forma para o tratamento de câncer de mama. Um exemplo de melhora que poderia ser efetuada é associar um quimioterápico às nanopartículas, de forma a potencializar o efeito antitumoral. Estevanato (2012) mostrou uma redução de aproximadamente 70% no volume tumoral e 55% no peso do tumor dos animais tratados com uma combinação de nanocápsulas magnéticas contendo Selol, Paclitaxel e CMA [45].

6. CONCLUSÕES

Neste estudo, uma nova amostra de fluido magnético, composta de nanoestruturas de maghemita revestida com ouro foi caracterizada e testada quanto ao seu potencial para tratamento do carcinoma mamário murino com magnetohipertermia (MHT). Com base nos resultados obtidos, pode-se concluir que:

- 1) Medidas do potencial zeta evidenciaram NPM carregadas negativamente e sem variação significativa de seu valor ao longo de 24 meses após o preparo de MNP@Au1 e MNP@Au2, o que sugere boa estabilidade da amostra;
- 2) Verificou-se, pelo ensaio de MTT, que MNP@Au1 não reduziu em 50% a viabilidade para células de adenocarcinoma mamário murino 4T1 - *luciferase* em concentrações entre 6,25 – 100 µg Fe/mL em 24 h de incubação;
- 3) Imagens de MET mostraram que as nanopartículas de MNP@Au1 foram interiorizadas pelas células de adenocarcinoma mamário murino, sendo encontradas no citoplasma das células tumorais dentro de estruturas semelhantes a vesículas, e que essa interiorização foi observada a partir de 1 h de incubação das NPM com as células;
- 4) Avaliações histopatológicas, revelaram que a injeção intratumoral de MNP@Au1 não foi tóxica para rim, cérebro, fígado;
- 5) Alíquotas de MNP@Au1 apresentaram aquecimento compatível com a realização de MHT quando foram submetidas a diferentes condições no equipamento gerador de campo magnético de frequência alternada;
- 6) MNP@Au1 foi utilizado no tratamento do adenocarcinoma mamário murino utilizando MHT e a eficácia desse tratamento foi evidenciada pelo maior percentual de necrose nos tumores dos animais tratados em relação aos não tratados.

REFERENCIAL TEÓRICO

- [1] BRITO, N. M. B.; SAMPAIO, P.C.M.; CASTRO, A. A. H.; OLIVEIRA, M. R. Características clínicas de mulheres com carcinoma ductal invasivo submetidas à quimioterapia neoadjuvante. Rev Para Med. 21(4):1-10, 2007.
- [2] INSTITUTO ONCOGUIA. Sobre o câncer de mama. Disponível em: <<http://www.oncoguia.org.br/conteudo/sobre-o-cancer/749/12>>. Acesso em: Agos 2018.
- [3] Breastcancer. CDI: Carcinoma ductal invasivo. Breastcancer. Disponível em: <http://www.breastcancer.org/es/sintomas/tipos/cdi>. Acesso em: Agos 2018.
- [4] LISBOA, L. F. Tendências da incidência e da mortalidade do CA de mama no município de São Paulo. Tese de doutorado. Universidade de São Paulo. 2009.
- [5] Evolving concepts in breast lobular neoplasia and invasive lobular carcinoma, and their impact on imaging methods. Oliveira TM, Elias J Jr, Melo AF, Teixeira SR, Filho SC, Gonçalves LM, Faria FM, Tiezzi DG, Andrade JM, Muglia V. 2014, Insights Imaging.
- [6] 5. Roche. Cancro da mama. Roche. [Online] 2013. [Citação: 17 de Fevereiro de 2014.] <http://www.roche.pt/sites-tematicos/infocancro/index.cfm/tipos/cancro-da-mama/>.
- [7] Coelho, Cecília. Mulheres com cancro da mama em Tratamento com quimioterapia: Contributos para a compreensão da sua qualidade de vida. Porto : Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar, 2008.
- [8] Importance of a personal history of breast cancer as a risk factor for the development of subsequent breast cancer: results from screening breast MRI. Schacht, D V, et al. 2014, AJR Am J Roentgenol, pp. 289-92.
- [9] Hormone Replacement Therapy and Breast Cancer Risk. Terry, Mary e Tehranifar, Parisa. 2013, Journal of the National Cancer Institute, pp. 1365-1372.
- [10] Does diet affect breast cancer risk? Hormes, Michelle e Willett, Walter. 2004, Breast Cancer Research, pp. 170-178.
- [11] The Influence of Energetic Factors on Biomarkers of Postmenopausal Breast Cancer Risk. Heather, Neilson e Conroy, Shannon. 2014, Current Nutrition Reports, pp. 22-34.
- [12] Stopeck, Alison. Breast Cancer. Medscape. [Online] 13 de Janeiro de 2014. [Citação:18 de Fevereiro de 2014.] <http://emedicine.medscape.com/article/1947145overview#aw2aab6b2b2>
- [13] Portal de Oncologia, Português. O cancro da mama. Portal de Oncologia Português. [Online] 2012. [Citação: 23 de Fevereiro de 2014.]

<http://www.pop.eu.com/porta/publico-geral/tipos-de-cancro/cancro-da-mama/o-cancro-da-mama.html>.

[14] Oliveira, Carlos, Cardoso, Maria e Orvalho, Maria. Recomendações nacionais para diagnóstico e tratamento do cancro da mama. Direção Geral de Saúde. [Online] 2009. [Citação: 25 de Fevereiro de 2014.] <https://www.dgs.pt/documentos-epublicacoes/recomendacoes-nacionais-para-diagnostico-e-tratamento-do-cancro-damama-pdf.aspx>.

[15] COSTA, H. SOLLA, J. TEMPORÃO, J. G. Controle do câncer de mama. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/publicacoes/consensointegra.pdf>. Acesso em: Agos 2018.

[16] Instituto Português de Oncologia, Coimbra. Cancro da mama: Protocolo de Diagnóstico, terapêutica e seguimento. Disponível em: <<http://www.croc.min-saude.pt/NR/rdonlyres/82A8AF5F-D8B2-4AEC-A1D-AB5C21B755A6/24551/CancrodaMamaProtocolodediagn%C3%B3sticoterap%C3%A4uticaesegu.pdf>> . Acesso em: Agos 2018.

[17] Oliveira, Carlos, Cardoso, Maria e Orvalho, Maria. Recomendações nacionais para diagnóstico e tratamento do cancro da mama. Direção Geral de Saúde. Disponível em: <<https://www.dgs.pt/documentos-epublicacoes/recomendacoes-nacionais-para-diagnostico-e-tratamento-do-cancro-damama-pdf.aspx>>. **Acesso em: Agos 2018.**

[18] Institute, National Cancer. Breast Cancer Treatment. Pubmed Health. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmedhealth/PMH0032825>> Acesso em: **Agos 2018.**

[19] Cordeiro, Carlos Jorge. Marcadores Tumoriais. Disponível em: <<https://www.estudaetal.com/thebox/theboxficheiros/76986f04f258860e19676dd8b606c4eccbb3d>> Acesso em: **Agos 2018.**

[20] Muehlmann, L. et al. Aluminum–phthalocyanine chloride associated to poly(methyl vinyl ether-co-maleic anhydride) nanoparticles as a new third-generation photosensitizer for anticancer photodynamic therapy. International Journal of Nanomedicine, p. 1199, 2014.

[21] Fertig, E. et al.,. Analysis of gene expression of secreted factors associated with breast cancer metastases in breast cancer subtypes. Sci. Rep., v. 5, p. 12133, 2015.

[22] Guelcher, S.; Sterling, J. Contribution of Bone Tissue Modulus to Breast Cancer Metastasis 32 to Bone. Cancer Microenvironment, v. 4, n. 3, p. 247-259, 2011.

[23] Krieger, N. Breast bruises and breast cancer. Breast Cancer Research, v. 17, n. 1, 2015.

- [24] Radioterapia e Hormonoterapia a Título Neoadjuvante no Carcinoma Localmente Avançado da Mama: Estado da Arte. Padilha, Marisa, et al. 2012, Acta Médica Portuguesa.
- [25] Krishnan, K. M.; IEEE Trans Magn. 2010, 46, 2526.
- [26] Jordan, A.; Scholz, R.; Wust, P.; Fähling, H.; Felix, R.; J. Magn. Magn. Mater. 1999, 201, 413.
- [27] Cole, A. J.; Yang, V. C.; David, A. E.; Trends Biotechnol. 2011, 29, 323.
- [28] Ito, A.; Shinkai, M.; Honda, H.; Kobayashi, T.; J. of Biosci. Bioeng. 2005, 100, 1.
- [29] LAURENT, S.; MORTEZA, M. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles: promises for diagnosis and treatment of cancer. Int J Epidemiol Mol Genet, v.2, n.4, p.367-390. 2011.
- [30] Figuerola, A.; Corato, R.; Manna, L.; Pellegrino, T.; Pharmacol. Res. 2010, 62, 126.
- [31] Pankhurst, Q. A.; Connolly, J.; Jones, S. K.; Dobson, J.; J. Phys. D: Appl. Phys. 2003, 36, R167.
- [32] Krishnan, K. M.; IEEE Trans Magn. 2010, 46, 2526.
- [33] Jordan, A.; Scholz, R.; Wust, P.; Fawling, H.; Felix, R.; J. Magn. Magn. Mater. 1999, 201, 413.
- [34] Guedes, M. H.; Sadeghiani, N.; Peixoto, D. L. G.; Coelho, J. P.; Barbosa, L. S.; Azevedo, R. B.; Kückelhaus, S.; Silva, M. F.; Moraes, P. C; Lacava, Z. G. M.; J. Magn. Magn. Mater. 2005, 293, 283.
- [35] Józefczak, A.; Hornowski, T.; Skumiel, A.; Łabowski, M.; Timko, M.; Kopčanský, P.; Koneracká, M.; Szlaferek, A.; Kowalski, W.; J. Magn. Magn. Mater. 2009, 321, 1505.
- [36] Meenach, S. A.; Hilt, J. Z.; Anderson, K. W.; Acta Biomater. 2010, 6, 1039.
- [37] Johanssen, M.; Gneveckow, U.; Thiesen, B.; Taymoorian, K.; Cho, C. H.; Waldöfner, N.; Scholz, R.; Jordan, A.; Loening, S. A.; Wust, P.; Eur. Urol. 2007, 52, 1653.
- [38] HILGER, I.; FRUHAUF, K.; ANDRA, W.; HIERGEIST, R.; HERGT, R.; KAISER, W. A. Heating potential of iron oxides for therapeutic purposes in interventional radiology. Academic Radiology, v. 9, p. 198-202, 2002.
- [39] Nanopartículas Magnéticas e suas Aplicações Elton Francisquini Jeroen Schoenmaker José Antonio Souza; <http://professor.ufabc.edu.br/~joseantonio.souza/wp-content/uploads/2015/05/Cap%C3%ADtulo-14-Nanopart%C3%ADculas-Magn%C3%A9ticas-e-suas-Aplica%C3%A7%C3%B5es.pdf>.

- [40] ROSENWEIG, R. E. Ferrohydrodynamics, Cambridge University Press, New York, 1985.
- [41] HOFMANN-AMTENBRINK, M.; HOFMANN, H.; MONTET, X. Superparamagnetic nanoparticles - a tool for early diagnostics. *Swiss Med Wkly*, v. 140, p. w13081, 2010.
- [42] SANTHOSH, P. B.; ULRIH, N. P. Multifunctional superparamagnetic iron oxide nanoparticles: promising tools in cancer theranostics. *Cancer Lett*, v. 336, n. 1, p. 8-17, Ago 2013.
- [43] ALEXIOU, C.; JURGONS, R.; SELIGER, C.; BRUNKE, O.; IRO, H.; ODENBACH, S. Delivery of superparamagnetic nanoparticles for local chemotherapy after intraarterial infusion and magnetic drug targeting. *Anticancer Res*, v. 27, n. 4A, p. 2019-22, Jul-Ago 2007.
- [44] YANG, L.; MAO, H.; CAO, Z.; WANG, Y. A.; PENG, X.; WANG, X.; SAJJA, H. K.; WANG, L.; DUAN, H.; NI, C.; STALEY, C. A.; WOOD, W. C.; GAO, X.; NIE, S. Molecular imaging of pancreatic cancer in an animal model using targeted.
- [45] DAS, M.; DHAK, P.; GUPTA, S.; MISHRA, D.; MAITI, T. K.; BASAK, A.; PRAMANIK, P. Highly biocompatible and water-dispersible, amine functionalized magnetite nanoparticles, prepared by a low temperature, air-assisted polyol process: a new platform for bio-separation and diagnostics. *Nanotechnology*, v. 21, n. 12, p. 125103, Mar 2010.
- [46] ESTEVANATO, L. L.; LACAVA, L. M.; CARVALHO, L. C.; AZEVEDO, R. B.; SILVA, O.; PELEGRINI, F.; BAO, S. N.; MORAIS, P. C.; LACAVA, Z. G. Long-term biodistribution and biocompatibility investigation of dextran-coated magnetite nanoparticle using mice as the animal model. *J Biomed Nanotechnol*, v. 8, n. 2, p. 3018, Apr 2012a.
- [47] LACAVA, L. M.; LACAVA, Z. G. M.; AZEVEDO, R. B.; CHAVES, S. B.; GARCIA, V. A. P.; SILVA, O.; PELEGRINI, F.; BUSKE, N.; GANSAU, C.; DA SILVA, M. F.; MORAIS, P. C. Use of magnetic resonance to study biodistribution of dextran-coated magnetic fluid intravenously administered in mice. *J Magn Magn Mater*, v. 252, p. 367-369, 2002.
- [48] MARTINEZ-BOUBETA, C.; BALCELLS, L.; CRISTOFOL, R.; SANFELIU, C.; RODRIGUEZ, E.; WEISSLEDER, R.; LOPE-PIEDRAFITA, S.; SIMEONIDIS, K.; ANGELAKERIS, M.; SANDIUMENGE, F.; CALLEJA, A.; CASAS, L.; MONTY, C.;

MARTINEZ, B. Self-assembled multifunctional Fe/MgO nanospheres for magnetic resonance imaging and hyperthermia. *Nanomedicine*, v. 6, n. 2, p. 362-70, Abr 2010.

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

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

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

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

[53] SHEKHAR, C. Lean and mean: Nanoparticle-based delivery improves performance of cancer drugs. *Chem. Biol.* v.16, p. 349-350, 2009.

[54] DRUMMOND, A. L. DESENVOLVIMENTO DE SISTEMAS MAGNÉTICOS NANOESTRUTURADOS PARA APLICAÇÕES BIOMÉDICAS. Universidade de Brasília – UnB Instituto de Química – IQ Programa de Pós-Graduação em Química – PPGQ Laboratório de Pesquisa em Polímeros. Brasília – 2012.

[55] P. Fee, Y. Cesbron, P. Native, V. Shaheen, DI Rigden. *ACS Nano*, 3 (2009), p. 2461

[56] GANTA, S., DEVALAPALLY, H. SHAHIWALA, A., AMIJI, M. A review of stimuli-response nanocarriers for drug and gene delivery. *J. Control. Release.* v. 126. p. 187-204, 2008.

[57] JUNQUEIRA, J. S. S.; SILVA, P. P.; GUERRA, W. Ouro. *Quim. Nova*, v. 34, p. 45-46, 2012.

[58] BHATTACHARYA, R., MUKHERJEE, P. Biological properties of “naked” metal nanoparticles. *Adv. Drug Deliver. Rev.* v.60, p. 1289-1306, 2008

[59] DJAJADISASTRA, J.; SUTRIYO; PURNAMASARI, P.; PUJIYANTO, A. Antioxidant activity of gold nanoparticles using gum arabic as a stabilizing agent. *J. Pharm. Pharm. Sci.*, v. 6, p. 462-465, 2014.

[60] JAIN, P. K., EL-SAYED, I. H., EL-SAYED, M. A. Au nanoparticles target cancer. *Nano Today* v.2(1), p.18-29, 2007

- [61] HAINFELD, J. F.; SLATKIN, D. N.; FOCELA, T. M.; SMILOWITZ, H. M. Gold nanoparticles: a new X-ray contrast agente. *British Journal of Radiology*, v. 79, n. 939, p. 248-253, 2006.
- [62] CUNHA, B. C; SOUSA, M. H, SIQUEIRA, E. R. L. *Elaboração de nanopartículas de maguemita recobertas com ouro e funcionalizadas com ftalocianina de alumínio para aplicações multitarefa em imageamento e terapias médicas.* Universidade de Brasília – Faculdade de Ceilândia Programa de Pós Graduação Strictu-Sensu em Ciências e Tecnologias em Saúde. Brasília, 2016.
- [63] Kennedy LC et al., A new era for cancer treatment gold-nanoparticle-mediated thermal therapies, *Small*, 2011, Vol. 7, nº 2, págs, 169–183
- [64] Tong L et al., Gold Nanorods Mediate Tumor Cell Death by Compromising Membrane Integrity, *Advanced Materials - Special Issue: Special Section on Bionanotechnology*, 2007, Vol. 19, nº 20, págs. 3136–3141
- [65] KUMAR, C.S.S.R. *Biofunctionalization of nanomaterials.* Weinheim: WILEY-VCH, 2005. V.1.
- [66] SPERLING, R. A.; RIVERA GIL, P.; ZHANG, F.; ZANELA, M.; PARAK, W. J. Biological applications of gold nanoparticles. *Chemical Society Review*, v. 37. 2008.
- [67] V.I. Shubayev, T.R. Pisanic, S. Jin, *Adv. Drug Del. Rev.* 61 (2009) 467.
- [68] P. Fee, Y. Cesbron, P. Native, V. Shaheen, DI Rigden. *ACS Nano*, 3 (2009), p. 2461
- [69] Disponível em: < <http://www.nanopartz.com> > Acesso em 2 de junho de 2009
- [70] T. D. Giorgio, C. S. Bell and S. S. Yu, *Small*, 2011, 7, 1158–1162.
- [71] S. I. Stoeva, F. W. Huo, J. S. Lee and C. A. Mirkin, *J. Am. Chem. Soc.*, 2005, 127, 15362–15363.
- [72] O. Chen, L. Riedemann, F. Etoc, H. Herrmann, M. Coppey, M. Barch, C. T. Farrar, J. Zhao, O. T. Bruns, H. Wei, P. Guo, J. Cui, R. Jensen, Y. Chen, D. K. Harris, J. M. Cordero, Z. Wang, A. Jasanoff, D. Fukumura, R. Reimer, M. Dahan, R. K. Jain and M. G. Bawendi, *Nature communications*, 2014, 5, 5093.
- [73] COELHO, B. C. P; SIQUEIRA, E. R. L; OMBREDANE, A. S; JOANITTI, G. A; MORAIS, P. C; AZEVEDO, R. B; SOUSA, M. H; *Maghemite – gold core – shell nanostructures surface- functionalized with aluminium phthalocyanine for multi-task imaging and therapy.* *Royal Society of Chemistry. RSC Adv.* 2017, 7, 11223.
- [74] J. C. O. Silva, M. H. Sousa, F. A. Tourinho and J. C. Rubim, *Langmuir*, 2002, 18, 5511-5515.

- [75] Yu SB, Watson AD. Metal-based X-ray contrast media. *Chem Ver* 1999, 99(9), 2353–2377.
- [76] Badea CT, Drangova M, Holdsworth DW, Jhonson GA. **In vivo small animal imaging using micro-CT and digital subtraction angiography.** *Phys Med Biol* 2008;53:R319e50
- [77] Zagorchev L, Oses P, Zhuang ZW, Moodie K, Mulligan-Kehoe M, Simons M, et al. **Micro computed tomography for vascular exploration.** *J Angiogenesis Res* 2010;2:7e17
- [78] Almajdub M, Nejari M, Poncet G, Magnier L, Chereul E, Roche C, et al. **In-vivo high-resolution X-ray microtomography for liver and spleen tumor assessment in mice.** *Contrast Media Mol Imag* 2007;2:88e93.
- [79] S.-J. Burke, A. Annapragada, E.-A. Ho_man, E. Chen, K.-B. Ghaghada, J. Sieren, E.- J.-R. van Beek, **Imaging of pulmonary embolism and t-pa therapy e_ects using mdct and liposomal iohexol blood pool agent: preliminary results in a rabbit model,** *Academic Radiology* 14 (2007) 355–362.
- [80] K. Jain, **Regulation of transport pathways in tumor vessels: role of tumor type and microenvironment,** *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95 (1998) 4607–4612.
- [81] J.-P. Weichert, F.-T. Lee, S.-G. Chosy, M.-A. Longino, J.-E. Kuhlman, D.-M. Heisey, G.-E. Leverson, **Combined hepatocyte-selective and blood-pool contrast agents for the ct detection of experimental liver tumors in rabbits,** *Radiology* 216 (2000) 865–871
- [82] F. Hallouard, N. Anton, P. Choquet, A. Constantinesco, T. Vandamme, **Iodinated blood pool contrast media for preclinical X-ray imaging applications – a review,** *Biomaterials* 31 (2010) 6249–6268.
- [83] Hallouard F, Anton N, Choquet P, Constantinesco A, Vandamme T. Iodinated blood pool contrast media for preclinical X-ray imaging applications – a review. *Biomaterials* 2010, 31(24), 6249–6268.
- [84] Jordan A, Scholz R, Maier-Hauff K, Johannsen M, Wust P, Nadobny J, et al. Presentation of a new magnetic field therapy system for the treatment of human solid tumors with magnetic fluid hyperthermia. *J Magn Magn Mater.* 2001;225(1-2):118-26.
- [85] Maier-Hauff K, Rothe R, Scholz R, Gneveckow U, Wust P, Thiesen B, et al. Intracranial thermotherapy using magnetic nanoparticles combined with external beam

radiotherapy: results of a feasibility study on patients with glioblastoma multiforme. *J Neurooncol.* 2007;81(1):53-60.

[86] VERDE, E, L. Hipertermia magnética em nanopartículas: da instrumentação biomédica in vitro ao estudo das propriedades magneto-térmicas de diferentes ferritas. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Goiás, Instituto de Física, 2012.

[87] DEMARCHI, C. A. Utilização de nanogel magnético como carreador de compostos maleimídicos com atividade antitumoral. Dissertação de mestrado, Universidade Vale do Itajaí, Itajaí, Santa Catarina, 2014.

[88] FERREIRA, C. A. Nanopartículas de sílica mesoporosa mcm-41 funcionalizadas com aptâmero e radiomarcadas com ^{90y} e ^{159gd} como um potencial agente terapêutico contra câncer colorretal. Dissertação de mestrado, Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear, Belo Horizonte, 2014.

[89] PAVON, L. F.; OKAMOTO, O. K.; Aplicações de recursos biotecnológicos em câncer. *Revendo ciências básicas, Einstein.* V.5(1) p 74-77, 2007.

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

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

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

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

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

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

- [96] MARQUIS, B. J.; LOVE, S. A.; BRAUN, K. L.; HAYNES, C. L. Analytical methods to assess nanoparticle toxicity. *Analyst*, v. 134, n. 3, p. 425-39, Mar 2009.
- [97] V.I. Shubayev, T.R. Pisanic, S. Jin, *Adv. Drug Del. Rev.* 61 (2009) 467.
- [98] S. Link, M.A, El Sayed, **Spectral properties and relaxation dynamics of surface plasmon electronic oscillations in gold and silver nanorods**, *J. Phys. Chem.B.*103-8410-8426.
- [99] BALIVADA, S.; RACHAKATLA, R. S.; WANG, H.; SAMARAKOON, T. N.; DANI, R. K.; PYLE, M.; KROH, F. O.; WALKER, B.; LEAYM, X.; KOPER, O. B.; TAMURA, M.; CHIKAN, V.; BOSSMANN, S. H.; TROYER, D. L. A/C magnetic hyperthermia of melanoma mediated by iron(0)/iron oxide core/shell magnetic nanoparticles: a mouse study. *BMC Cancer*, v. 10, p. 119, Mar 2010.
- [100] MATSUMINE, A.; TAKEGAMI, K.; ASANUMA, K.; MATSUBARA, T.; NAKAMURA, T.; UCHIDA, A.; SUDO, A. A novel hyperthermia treatment for bone metastases using magnetic materials. *Int J Clin Oncol*, v. 16, n. 2, p. 101-8, Abr 2011.
- [101] ROOHI, F.; LOHRKE, J.; IDE, A.; SCHUTZ, G.; DASSLER, K. Studying the effect of particle size and coating type on the blood kinetics of superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *Int J Nanomedicine*, v. 7, p. 4447-58, 2012.
- [102] FABIAN, E.; LANDSIEDEL, R.; MA-HOCK, L.; WIENCH, K.; WOHLLEBEN, W.; VAN RAVENZWAAY, B. Tissue distribution and toxicity of intravenously administered titanium dioxide nanoparticles in rats. *Arch Toxicol*, v. 82, n. 3, p. 151-7, Mar 2008.
- [103] ERNSTING, M. J.; MURAKAMI, M.; ROY, A.; LI, S. D. Factors controlling the pharmacokinetics, biodistribution and intratumoral penetration of nanoparticles. *J Control Release*, v. 172, n. 3, p. 782-794, Set 2013.
- [104] AMOOZGAR, Z.; YEO, Y. Recent advances in stealth coating of nanoparticle drug delivery systems. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol*, v. 4, n. 2, p. 21933, Mar-Abr 2012.
- [105] TIAN, M.; LU, W.; ZHANG, R.; XIONG, C.; ENSOR, J.; NAZARIO, J.; JACKSON, J.; SHAW, C.; DIXON, K. A.; MILLER, J.; WRIGHT, K.; LI, C.; GUPTA, S. Tumor uptake of hollow gold nanospheres after intravenous and intra-arterial injection: PET/CT study in a rabbit VX2 liver cancer model. *Mol Imaging Biol*, v. 15, n. 5, p. 614-24, Out 2013.
- [106] TIETZE, R.; LYER, S.; DURR, S.; STRUFFERT, T.; ENGELHORN, T.; SCHWARZ, M.; ECKERT, E.; GOEN, T.; VASYLYEV, S.; PEUKERT, W.;

WIEKHORST, F.; TRAHMS, L.; DORFLER, A.; ALEXIOU, C. Efficient drug-delivery using magnetic nanoparticles--biodistribution and therapeutic effects in tumour bearing rabbits. *Nanomedicine*, v. 9, n. 7, p. 961-71, Out 2013.

[107] Blanco, E.; Shen, H.; Ferrari, M. Principles of nanoparticle design for overcoming biological barriers to drug delivery. *Nature Biotechnology*, v. 33, n. 9, p. 941-951, 2015.

[108] COSTA, P. R. Síntese e Caracterização de nanopartículas de ouro como ferramenta terapêutica e diagnóstica. Programa de Pós Graduação em Ciências e Tecnologia das Radiações, Minerais e Materiais. Belo Horizonte, 2012.

[109] DU, Y.; ZHANG, D.; LIU, H.; LAI, R. Thermochemotherapy effect of nanosized As₂O₃/Fe₃O₄ complex on experimental mouse tumors and its influence on the expression of CD44v6, VEGF-C and MMP-9. *BMC Biotechnol*, v. 9, p. 84, 2009.

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

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

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

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

[114] REN, Y.; ZHANG, H.; CHEN, B.; CHENG, J.; CAI, X.; LIU, R.; XIA, G.; WU, W.; WANG, S.; DING, J.; GAO, C.; WANG, J.; BAO, W.; WANG, L.; TIAN, L.; SONG, H.; WANG, X. Multifunctional magnetic Fe₃O₄ nanoparticles combined with chemotherapy and hyperthermia to overcome multidrug resistance. *Int J Nanomedicine*, v. 7, p. 2261-9, 2012.

- [115] ZHAO, Q.; WANG, L.; CHENG, R.; MAO, L.; ARNOLD, R. D.; HOWERTH, E. W.; CHEN, Z. G.; PLATT, S. Magnetic nanoparticle-based hyperthermia for head & neck cancer in mouse models. *Theranostics*, v. 2, p. 113-21, 2012.
- [116] HOU, C. H.; HOU, S. M.; HSUEH, Y. S.; LIN, J.; WU, H. C.; LIN, F. H. The in vivo performance of biomagnetic hydroxyapatite nanoparticles in cancer hyperthermia therapy. *Biomaterials*, v. 30, n. 23-24, p. 3956-60, Ago 2009.
- [117] ITO, A.; TANAKA, K.; HONDA, H.; ABE, S.; YAMAGUCHI, H.; KOBAYASHI, T. Complete regression of mouse mammary carcinoma with a size greater than 15 mm by frequent repeated hyperthermia using magnetite nanoparticles. *J Biosci Bioeng*, v. 96, n. 4, p. 364-9, 2003b.
- [118] PORTILHO, F. A. O uso de nanoesferas de albumina na terapia fotodinâmica e magnetohipertermia do tumor de Ehrlich. 2011. 126p. Tese (Doutorado em Patologia Molecular) – Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília, Brasília, 2011
- [119] ARMIJO, L. M.; BRANDT, Y. I.; MATHEW, D.; YADAV, S.; MAESTAS, S.; RIVERA, A. C.; COOK, N. C.; WITHERS, N. J.; SMOLYAKOV, G. A.; ADOLPHI, N. L.; MONSON, T. C.; HUBER, D. L.; SMYTH, H. D. C.; OSIŃSKI, M. Iron Oxide Nanocrystals for Magnetic Hyperthermia Applications. *Nanomaterials*, v. 2, p. 134146, 2012.
- [120] KHANDHAR, A. P.; FERGUSON, R. M.; SIMON, J. A.; KRISHNAN, K. M. Enhancing cancer therapeutics using size-optimized magnetic fluid hyperthermia. *J Appl Phys*, v. 111, n. 7, p. 7B306-7B3063, Abr 2012b.

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



Universidade de Brasília

Instituto de Ciências Biológicas
Comissão de Ética no Uso Animal

Brasília, 8 de novembro de 2017.

DECLARAÇÃO

Declaramos que o projeto intitulado **"APLICAÇÃO DE NANOESTRUTURAS MAGNÉTICAS PARA TRATAMENTO ANTITUMORAL ATRAVÉS DA MAGNETOHIPERTERMIA"**, Protocolo n.º 111/2017, sob responsabilidade do Professor Paulo César Morais foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) da Universidade de Brasília. Este projeto foi aprovado para utilização de: *Mus musculus* (30 fêmeas). A presente aprovação é válida pelo período de: 20/12/2017 a 20/12/2018.



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



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

