



Universidade de Brasília

Instituto de Ciências Biológicas

Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal

Nanocápsulas de selol com invólucro de poli(metil vinil-éter co-anidrido maléico) conjugado à doxorubicina: Desenvolvimento e avaliação de seu potencial anticâncer *in vitro* e *in vivo*

BRASÍLIA

2016

RAYANE GANASSIN

Nanocápsulas de selol com invólucro de poli(metil vinil-éter co-anidrido maléico) conjugado à doxorubicina: Desenvolvimento e avaliação de seu potencial anticâncer *in vitro* e *in vivo*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Biologia Animal, do Instituto de Ciências Biológicas da
Universidade de Brasília, como parte integrante dos requisitos
para a obtenção de título de Mestre em Biologia Animal.

Orientador: Prof. Dr. Luis Alexandre Muehlmann

BRASÍLIA

2016

RAYANE GANASSIN

Nanocápsulas de selol com invólucro de poli(metil vinil-éter co-anidrido maléico) conjugado à doxorubicina: Desenvolvimento e avaliação de seu potencial anticâncer *in vitro* e *in vivo*

COMISSÃO EXAMINADORA:

Prof. Dr. Luis Alexandre Muehlmann

(Orientador)

Prof. Dr. Diêgo Madureira de Oliveira

(Membro titular)

Prof. Dr. João Paulo Figueiró Longo

(Membro titular)

Prof. Dr. Ricardo Bentes de Azevedo

(Suplente)

Brasília, 29 de fevereiro de 2016

Dedico este trabalho ao meu pai,
que sempre me incentiva a realizar meus sonhos.

Agradecimentos

A Deus, por me proporcionar grandes oportunidades, as quais eu nem imaginava ter, por me dar forças para superar os obstáculos, por me encorajar frente aos desafios, por realizar os meus sonhos e o mais importante: seu grande amor.

Aos meus familiares, que apesar de não compreenderem muito o meu trabalho, sempre me apoiaram nesta e nas outras jornadas que enfrentei. Obrigada pelas orações, pela união e amor.

Ao meu pai Eduardo, homem trabalhador e humilde, pelas lutas que travou para que eu chegasse até aqui. Pela educação que me proporcionou, por todos os ensinamentos da importância de batalhar na vida e de ser humilde.

À minha mãe Lurdinha, não mais presente entre nós, por todo o amor, cuidado, carinho e preocupação. Por sempre me encorajar e me animar frente aos desafios dessa vida.

Ao meu irmão Dudu, meu companheirinho fiel, meu bem mais precioso. Que faz meus dias mais felizes. Obrigada maninho, pelo seu amor e proteção.

À minha avó Maria, por me dar o exemplo do que é ser uma mulher guerreira e batalhadora e por todas as orações que eu sei que faz todos os dias ao meu favor.

À minha madrasta, Sandra, por cuidar tão bem de nossa família e por fazer da nossa casa um lar muito alegre.

Aos meus amigos da minha cidade que apesar da distância não se esquecem de mim e sempre torcem por mim.

Aos meus amigos da igreja por todas as orações e intercessões.

Agradeço a todos meus companheiros e amigos do laboratório de Nanobiotecnologia que participaram de forma direta ou indireta nesta etapa.

Agradeço ao Professor Ricardo por me receber em seu laboratório e por confiar no meu trabalho. Obrigada Professor, o senhor é um grande mestre!

Um agradecimento especial ao meu orientador e professor Luis pelo incentivo na área da pesquisa e pela paciência em me ensinar desde a época de estágio. Obrigada Luis, por me suportar 5 anos e ainda tem 4 anos pela frente!

Agradeço a Professora Grazi, por me ensinar e me auxiliar em experimentos de forma perfeita. Obrigada Grazi, por tanto carinho e cuidado! E agradeço à sua aluna Alicia pela ajuda nos experimentos finais.

Agradeço à minha grande amiga Janes pela paciência, companhia e parceria. Mosar pela confiança que sempre podemos fazer o melhor e por me fazer rir todos os dias. Jana pela preocupação e carinho, tanto em relação ao profissional quanto pessoal. Aos meus amigos, Mateus, Laise, Raphael, Marina, Henrique, Jaque, Fred, Paulinha, Ludmila e Sara pelo acréscimo em conhecimentos científicos e por me proporcionarem momentos incríveis de muitas risadas. Agradeço à minha amiga Analy por me ensinar e por me tratar como uma irmã. Muitas saudades! À minha amiga Luiza por confiar e acreditar no meu trabalho, pela cumplicidade e pelos tantos momentos de felicidades nos corredores do laboratório. À minha amiga Débora, pela companhia e pelos seus ensinamentos. Agradeço à Karen pela paciência em resolver os meus problemas nos experimentos. Agradeço às estagiárias Carine e Nayara que tanto se preocuparam em me ajudar nos experimentos, por serem comprometidas, interessadas e por confiar nos meus ensinamentos. E aos estagiários Thayna, Victor e Wellington pela disponibilidade e ajuda em muitos dos experimentos e por terem confiado no melhor do que poderíamos fazer.

À Dona Zélia, pela sua incrível dedicação e compromisso em tornar o laboratório muito organizado.

Também agradeço aos membros dos laboratórios de microscopia, nanociência e nanobiotecnologia (física) e genética toxicológica (Gtox) pelo auxílio e disponibilidade de equipamentos para realização dos meus experimentos.

Agradeço às instituições CAPES pela concessão da bolsa de mestrado e às instituições CNPq e FAP/DF pelo fomento da minha pesquisa em nanobiotecnologia.

Todas as vossas obras sejam feitas com amor.

1 Coríntios 16:14

vii

Resumo

A doxorubicina (DOX) tem se mostrado eficaz no tratamento de cânceres sólidos e hematológicos, mas a sua potencial cardiotoxicidade irreversível, limita o sucesso do tratamento, levando a um baixo índice terapêutico. O selol, mistura de selenitotriacilglicerídeos, mostrou atividade citostática em ensaios *in vitro* e demonstrou habilidade em reduzir a viabilidade de células resistentes à DOX. Os objetivos gerais do presente trabalho foram: 1) desenvolver uma nanocápsula contendo selol e doxorubicina com diâmetro próximo a 200 nm, 2) avaliar sua atividade anticâncer *in vitro* e *in vivo*, e 3) verificar o seu potencial cardiotóxico. A formulação obtida consistiu de nanocápsulas com núcleo de selol e com invólucro de poli(metil vinil-éter co-anidrido maléico) conjugado à doxorubicina. As nanocápsulas apresentaram-se estáveis e monodispersas. Para os testes *in vitro*, foram utilizadas as células de adenocarcinoma mamário murino (4T1) e células de fibroblasto murino como célula não tumoral (NIH-3T3). Os tratamentos DOX (doxorubicina), NCS-DOX (nanocápsulas de selol contendo doxorubicina) e Pol-DOX (produto da reação entre PVM/MA e doxorubicina) provocaram significativa redução na viabilidade de células 4T1. Ensaio de interiorização mostraram que NCS-DOX e Pol-DOX são mais interiorizadas do que DOX livre em células 4T1. NCS-DOX manteve o potencial da DOX em expor a fosfatidilserina na face externa da membrana em células 4T1, sendo este evento um dos que indica a ocorrência de apoptose. NCS-DOX apresentou maior capacidade de provocar fragmentação de DNA, além de provocar maior alteração na polarização mitocondrial do que DOX. NCS-DOX também foi capaz de gerar maior produção de EROs em tempos de 3 e 24 horas de exposição do que DOX. NCS-DOX e Pol-DOX alteraram a distribuição intracelular da DOX quando comparados com a exposição à DOX livre, do núcleo para a mitocôndria. Em estudos *in vivo* a NCS-DOX apresentou mesma habilidade da DOX em reduzir o crescimento do tumor de células 4T1, além de apresentar a mesma biodistribuição em camundongos BALB/c. A NCS-DOX não elevou os níveis de CK-MB quando comparado ao controle, o mesmo efeito não foi observado para DOX livre. Portanto, conclui-se que a NCS-DOX é eficaz contra células cancerosas 4T1 *in vitro* e *in vivo*, e menos cardiotóxica que a DOX *in vivo*.

Palavras chaves: doxorubicina, selol, nanocápsulas, câncer de mama, cardiotoxicidade.

Abstract

Doxorubicin (DOX) has shown to be effective in the treatment of solid and haematological cancers, but its potential irreversible cardiotoxicity limits the success of the treatment, lowering its therapeutic index. The selol, selenitotriacylglycerides mixture, has shown cytostatic activity in *in vitro* tests and ability to reduce the viability of doxorubicin-resistant cells. The general goals of this study were: 1) to develop nanocapsules containing selol and doxorubicin with diameter close to 200 nm, 2) to evaluate its *in vitro* and *in vivo* anticancer activity, and 3) to check its cardiotoxicity. The formulation consisted of nanocapsules with a core of selol and a shell of poly (methyl vinyl ether-co-maleic anhydride) conjugated to doxorubicin. The nanocapsules were stable and monodisperse. For *in vitro* tests, murine mammary adenocarcinoma cells (4T1) and fibroblast murine as non-tumor cell (NIH-3T3) were used. The treatments DOX (doxorubicin), NCS-DOX (nanocapsules of selol containing doxorubicin) and Pol-DOX (product of the reaction between PVM/MA and doxorubicin) caused a significant reduction in the viability of 4T1 cells. Internalization assays showed that NCS-DOX and Pol-DOX are more internalized than free DOX by 4T1 cells. NCS-DOX, similarly to free DOX, expose phosphatidylserine on the outside face membrane in 4T1 cells, this is an event that indicate apoptosis. NCS-DOX showed an increased ability to cause DNA fragmentation and to disturb the mitochondrial membrane polarization in comparison to free DOX. NCS-DOX was also able to induce higher production of ROS, at 3 and 24 hours of exposure. NCS-DOX and Pol-DOX altered intracellular distribution of doxorubicin when compared to free DOX alone, from the nuclei to the mitochondria. In *in vivo* studies, NCS-DOX and free DOX showed the same ability to reduce 4T1 tumor growth, and presented the same biodistribution in BALB/c mice. The NCS-DOX did not increase CK-MB levels when compared to the control. Free DOX significantly increased CK-MB activity. Therefore, it is concluded that the NCS-DOX is effective against 4T1 cancer cells *in vitro* and *in vivo*, and less cardiotoxic than free DOX *in vivo*.

Keywords: doxorubicin, selol, nanocapsules, breast cancer, cardiotoxicity.

Lista de figuras

Figura 1. Anatomia da mama feminina.....	4
Figura 2. Diferentes nanocápsulas	7
Figura 3. Estrutura do PVM/MA (Gantrez NA 119).....	8
Figura 4. Estrutura química da doxorubicina	9
Figura 5. Estrutura do selol de acordo com a concentração de selênio.	10
Figura 6. Representação de uma nanocápsula de selol com invólucro polimérico conjugado à doxorubicina (NCS-DOX).	16
Figura 7. Diâmetro hidrodinâmico, índice de polidispersão e potencial zeta das nanocápsulas.	33
Figura 8. Amostras de NCS-DOX (nanocápsulas de selol contendo doxorubicina) e NCS (nanocápsulas de selol) após centrifugação.....	34
Figura 9. Diâmetro hidrodinâmico, índice de polidispersão e potencial zeta das nanocápsulas NCS-DOX a 4 °C , temperatura ambiente (T.A.), 37 °C e em meio de cultivo.	37
Figura 10. Morfologia das nanocápsulas de selol contendo doxorubicina (NCS-DOX)	38
Figura 11. Curva de calibração da doxorubicina.....	38
Figura 12. Perfil de liberação de doxorubicina por meio do método de diálise.....	39
Figura 13. Espectros de infravermelho.	40
Figura 14. Espectros <i>SERS</i>	41
Figura 15. Viabilidade de células 4T1 após exposição aos tratamentos.....	42
Figura 16. Viabilidade de células NIH-3T3 após exposição aos tratamentos.....	43
Figura 17. Viabilidade celular de 4T1 após exposição ao tensoativo.....	44
Figura 18. Viabilidade celular de NIH-3T3 após exposição ao tensoativo.....	45
Figura 19. Morfologia das células 4T1 coradas com Giemsa	46
Figura 20. Morfologia de células NIH-3T3 coradas com Giemsa.....	47
Figura 21. Índices de adesão celular em tempo real das células NIH-3T3 e 4T1	49
Figura 22. Ensaio de interiorização	50
Figura 23. Efeito da inibição de vias de endocitose em células 4T1	51
Figura 24. Histogramas de fragmentação de DNA em células 4T1 após exposição aos tratamentos por 24 horas	52
Figura 25. Histogramas de fragmentação de DNA em células 4T1 após exposição aos tratamentos por 48 horas	53
Figura 26. Fragmentação de DNA em células 4T1 em 24 e 48 horas	54

Figura 27. Imagens da integridade de membrana plasmática, exposição da fosfatidilserina na face externa da membrana plasmática ou apoptose tardia em células 4T1 em 48 horas.	55
Figura 28. Integridade de membrana plasmática, exposição da fosfatidilserina na face externa da membrana plasmática ou apoptose tardia em células 4T1 em 48 horas.....	56
Figura 29. Imagens da morfologia de células 4T1 expostas aos tratamentos por 24 horas	57
Figura 30. Influência dos tratamentos em 24 horas na morfologia de células 4T1.....	58
Figura 31. Imagens da morfologia de células 4T1 expostas aos tratamentos por 48 horas	59
Figura 32. Influência dos tratamentos em 48 horas na morfologia de células 4T1	60
Figura 33. Histogramas da análise de potencial de membrana mitocondrial em células 4T1 em 24 horas.	61
Figura 34. Histogramas da análise de potencial de membrana mitocondrial em células 4T1 em 48 horas.	62
Figura 35. Potencial de membrana mitocondrial nas células 4T1 em 24 e 48 horas	63
Figura 36. Produção de espécies reativas de oxigênio por células 4T1 em 3, 24 e 48 horas...	64
Figura 37. Imagens de microscopia confocal de varredura a laser de células 4T1 tratadas com doxorrubicina.....	65
Figura 38. Imagens de microscopia confocal de varredura a laser de células 4T1 tratadas com NCS-DOX (nanocápsula de selol contendo doxorrubicina)	66
Figura 39. Imagens de microscopia confocal de varredura a laser de células 4T1 tratadas com Pol-DOX (produto da reação entre PVM/MA e doxorrubicina)	67
Figura 40. Intensidade de colocalização da doxorrubicina com organelas de células 4T1.....	68
Figura 41. Evolução do volume de tumores.....	69
Figura 42. Massa corpórea	69
Figura 43. Análise da atividade da enzima creatina cinase MB (CK-MB).....	70
Figura 44. Fluorescência específica da doxorrubicina em órgãos de camundongos tratados com doxorrubicina.	71
Figura 45. Fluorescência específica da doxorrubicina em órgãos de camundongos tratados com NCS-DOX (nanocápsulas de selol contendo DOX).....	72
Figura 46. Biodistribuição <i>ex vivo</i> de camundongos tratados com NCS-DOX (nanocápsulas de selol e DOX) e DOX (doxorrubicina) por 2, 4 e 8 horas	73
Figura 47. Equação genérica da hidrólise de um anidrido.	75
Figura 48. Reação entre o PVM/MA e doxorrubicina formando a ligação amida.	78

Lista de tabelas

Tabela 1. Materiais utilizados nos experimentos.....	13
Tabela 2. Componentes das formulações de nanocápsulas de selol e DOX e dados do volume final concentrado em rotaevaporador.....	17
Tabela 3. Faixas espectrais ajustadas para detecção da emissão de fluorescências da DOX e marcadores (fluoróforos).....	26
Tabela 4. O diâmetro hidrodinâmico (<i>z-average</i>) (DH), índice de polidispersão (PDI) e potencial zeta (PZ) das nanocápsulas NC-1, NC-2, NC-3, NC-4, NC-5, NC-6 e NC-7. Os valores foram expressos como média \pm erro padrão da média.....	31
Tabela 5. O diâmetro hidrodinâmico (<i>z-average</i>) (DH), índice de polidispersão (PDI) e potencial zeta (PZ) das formulações frescas NCS-DOX (nanocápsulas de selol contendo DOX) e NCS (nanocápsulas de selol). Os valores foram expressos como média \pm erro padrão da média.	34
Tabela 6. Diâmetro hidrodinâmico (<i>z-average</i>) (DH), índice de polidispersão (PDI) e potencial zeta (PZ) das formulações NCS-DOX (nanocápsulas de selol contendo DOX) em meio de cultivo. Os valores foram expressos como média \pm erro padrão da média.....	37

Lista de abreviaturas e siglas

4T1 – Adenocarcinoma mamário murino

ATCC – *American Type Culture Collection*

ATP – Trifosfato de adenosina

CLAE – Cromatografia líquida de alta eficiência

CK-MB – Creatina cinase MB

CPK – Creatina fosfoquinase

DAPI – 4,6-Diamidino-2-Phenylindole, Dihydrochloride

DH – Diâmetro hidrodinâmico

DMSO – Dimetilsulfóxido

DMEM – Meio Eagle modificado por Dulbecco

DNA – Ácido desoxirribonucleico

DOX – Doxorrubicina

EPR – Efeito de retenção e permeação

EROs – Espécies reativas de oxigênio

FTIR – Espectrômetro de infravermelho com transformada de Fourier

HL-60 – Células de leucemia humana

HLB – *Hydrophilic-lipophilic balance*

HEPES – Solução tampão ácido 4-(2-hidroxietil)piperazina-1-etanossulfônico

IC50 – *Inhibitory concentration of 50%*

INCA – Instituto Nacional de Câncer

MEV – Microscopia eletrônica de varredura

MET – Microscopia eletrônica de transmissão

MTT – 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolio brometo

NC – Nanocápsulas

NCS – Nanocápsulas de selol

NCS-DOX – Nanocápsulas de selol contendo doxorrubicina

HIH-3T3 – Fibroblasto murino

OMS – Organização Mundial da Saúde

PDI – Índice de polidispersão

PEG – Polietilenoglicol

PLA – Poli(ácido lático)

PLGA – Poli(lático-co-glicólico)

Pol-DOX – Produto da reação entre PVM/MA e doxorrubicina

PVM/MA – Poli(metil vinil-éter co-anidrido maléico)

PZ – Potencial zeta

ROS – *Reactive oxygen species*

RPMI – Meio do Instituto Memorial Park Roswell

RTCA – *Real Time Cell Analysis*

SERS – Espectroscopia Raman Amplificada por superfície

SFB – Soro fetal bovino

T.A. – Temperatura ambiente

UA – Unidades arbitrárias

Sumário

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DA LITERATURA	4
2.1 Câncer de Mama.....	4
2.2 Principais tratamentos para o câncer de mama	5
2.3 Nanotecnologia no tratamento de neoplasias	6
2.4 Doxorubicina.....	8
2.5 Selol	9
3. JUSTIFICATIVA	11
4. OBJETIVOS	12
4.1 Objetivo Geral	12
4.2 Objetivos Específicos	12
5. MÉTODOS.....	13
5.1 Materiais	13
5.2 Preparo das nanocápsulas	15
5.3 Caracterização das nanocápsulas poliméricas contendo selol e DOX.....	17
5.3.1 Análise das propriedades coloidais	17
5.3.2 Avaliação da estabilidade	18
5.3.3 Morfologia de superfície e estrutura	18
5.3.4 Quantificação da DOX por cromatografia líquida de alto desempenho	19
5.3.5 Análise do perfil de liberação de DOX	19
5.3.6 Espectroscopia de Transmitância na Região do Infravermelho.....	20
5.3.7 Espectroscopia Raman intensificada por superfície.....	20
5.4 Avaliações <i>in vitro</i>	21
5.4.1 Cultivo celular.....	21
5.4.2 Análise de viabilidade celular pelo método de MTT	21
5.4.3 Morfologia e confluência celular	22
5.4.4 Índice de adesão celular em tempo real.....	22
5.4.5 Ensaio de interiorização	23
5.4.6 Mecanismos de endocitose	23
5.4.7 Fragmentação de DNA.....	24
5.4.8 Análise de morte e morfologia celular por citometria de fluxo	24
5.4.9 Potencial de membrana mitocondrial.....	25

5.4.10	Análise de espécies reativas de oxigênio.....	25
5.4.11	Análise de localização sub-celular	26
5.5	Avaliações <i>in vivo</i>	27
5.5.1	Manutenção dos animais	27
5.5.2	Indução de tumor	28
5.5.3	Análises clínicas.....	28
5.5.4	Análises bioquímicas.....	29
5.5.5	Biodistribuição	29
5.6	Análises estatísticas	30
6.	RESULTADOS	31
6.1	Desenvolvimento e caracterização das formulações de nanocápsulas	31
6.1.1	Características coloidais e estabilidade temporal de nanocápsulas com diferentes composições	31
6.1.2	Análise morfológica da NCS-DOX por microscopia eletrônica	37
6.1.3	Perfil de liberação da doxorubicina da NCS-DOX.....	38
6.1.4	Espectroscopia de Transmitância na Região do Infravermelho (<i>FTIR</i>) e Espectroscopia Raman intensificada por superfície (<i>SERS</i>)	39
6.2	Avaliações em células <i>in vitro</i>	42
6.2.1	Redução da viabilidade varia entre os diferentes tipos celulares e tratamentos	42
6.2.2	Morfologia e confluência celular são alteradas por NCS-DOX e DOX	45
6.2.3	NCS-DOX causa maior redução no índice de adesão celular em tempo real	48
6.2.4	Pol-DOX e NCS-DOX apresentam maior interiorização por células 4T1	49
6.2.5	NCS-DOX e Pol-DOX são interiorizados por vias ativas.....	50
6.2.6	NCS-DOX causa maior fragmentação de DNA do que DOX.....	51
6.2.7	NCS-DOX e DOX causam apoptose	54
6.2.8	Alterações na morfologia celular	56
6.2.9	Alterações no potencial de membrana mitocondrial	60
6.2.10	Produção de espécies reativas de oxigênio por células 4T1	63
6.2.11	NCS-DOX e Pol-DOX alteram a localização sub-celular da DOX.....	64
6.3	Avaliações <i>in vivo</i>	68
6.3.1	NCS-DOX, NCS e DOX controlam o volume tumoral	68
6.3.2	Atividade da enzima creatina cinase MB (CK-MB)	70
6.3.3	NCS-DOX apresenta maior biodistribuição no tumor	71
7.	DISCUSSÃO	74

8. CONCLUSÃO	88
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	90
10. ANEXOS	101
10.1 Parecer do comitê de ética animal	101

1. INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas o câncer tornou-se um evidente problema de saúde pública mundial. A Organização Mundial de Saúde (OMS) estimou que no ano de 2025 possam ocorrer 20 milhões de novos casos de câncer . O câncer de mama é o segundo mais frequente no mundo, o mais comum entre as mulheres, e corresponde a 25,2 % de todos os tipos de câncer diagnosticado nas mulheres. O câncer de mama é o tipo que apresenta a maior incidência e maior mortalidade na população feminina em todo o mundo, tanto em países desenvolvidos quanto em países em desenvolvimento (INCA, 2016).

As taxas de incidência do câncer de mama variam entre as diferentes regiões do mundo, com as maiores taxas em 2012 na Europa Ocidental e as menores taxas na Ásia Oriental. Em 2012 foram estimados 500 mil óbitos por câncer de mama em mulheres em todo o mundo. A estimativa para os anos de 2016 e 2017 apontam para a ocorrência de 600 mil novos casos de câncer no Brasil. E para o câncer de mama estima-se a ocorrência de quase 58 mil novos casos. Excetuando-se o câncer de pele não melanoma, o câncer de mama é o tipo mais frequente em mulheres das regiões Sul, Sudeste, Centro-Oeste e Nordeste. Na região Norte é o segundo mais incidente. A idade é o principal fator de risco e o número de casos aumenta de forma acelerada após os 50 anos. No Brasil, as taxas de mortalidade pelo câncer de mama ainda continuam elevadas, provavelmente porque a doença é diagnosticada em estágios avançados. Estatísticas indicam aumento de sua incidência tanto nos países desenvolvidos quanto nos em desenvolvimento (INCA, 2016). Na população mundial, a sobrevivência média após 5 anos é de 61% (INCA, 2014).

A terapia contra o câncer continua sendo um desafio devido aos mecanismos de resistência das células tumorais e à toxicidade dos fármacos anticâncer (Perche, Patel, & Torchilin, 2012). Desta maneira, vários novos estudos são realizados na tentativa de encontrar soluções menos agressivas aos pacientes e com melhores resultados. O desafio da quimioterapia do câncer, assim como de qualquer outro tipo de terapia, é alcançar a cura sem causar efeitos adversos (Yoshitomi, Ozaki, Thangavel, & Nagasaki, 2013). Neste contexto, o uso de nanoestruturas como carreadores de fármacos anticâncer pode aumentar a eficácia e reduzir os efeitos colaterais negativos, i.e., aumentar o índice terapêutico de fármacos já disponíveis no mercado.

Nanoestruturas oferecem várias vantagens para a entrega de fármacos, as quais geralmente não são observadas com as formas farmacêuticas convencionais. Para a entrega de fármacos podem ser utilizados nanopartículas poliméricas, dendrímeros, lipossomas, nanopartículas metálicas, entre outras (Mirza & Shamshad, 2011). Além de proporcionar a entrega tecido-específica, este tipo de sistema pode superar barreiras fisiológicas no corpo (ex: barreira hematoencefálica, vias sanguíneas pulmonares e as junções oclusivas epiteliais) (Rawat, Singh, Saraf, & Saraf, 2006). Ainda, as propriedades de superfície das nanoestruturas podem ser modificadas para que o sistema imunitário não as reconheça e para que sejam eficientemente direcionadas para determinados tipos de tecidos (Rawat et al., 2006).

Dentre os fármacos quimioterápicos, a doxorubicina (DOX) é um dos mais utilizados atualmente na prática clínica (Yang, Teves, Kemp, & Henikoff, 2014). Este fármaco inibe a síntese e a transcrição de DNA, intercalando-se entre as bases nitrogenadas do DNA, e sua atividade depende de sua concentração intracelular (Lince, Bolognesi, Stella, Marchisio, & Dosio, 2011; Mirza & Shamshad, 2011). A DOX tem se mostrado eficaz no tratamento de cânceres sólidos e hematológicos, mas a sua potencial cardiotoxicidade limita o sucesso do tratamento (Perche et al., 2012; Yang et al., 2014). A cardiotoxicidade causada pela DOX é irreversível e pode ocasionar falência cardíaca (Mitra, Gaur, Ghosh, & Maitra, 2001; Park et al., 2009; Xi et al., 2012), contribuindo para um baixo índice terapêutico (Mitra et al., 2001). Uma das teorias que explica o mecanismo da cardiotoxicidade da DOX é que esta induz estresse oxidativo nos cardiomiócitos e altera o metabolismo energético mitocondrial (Xi et al., 2012).

Uma estratégia empregada para limitar a cardiotoxicidade da DOX é a associação desta a carreadores que diminuam a entrega de DOX livre ao tecido cardíaco e aumentem a entrega nos tecidos tumorais (Park et al., 2009). Algumas formulações com DOX baseadas em polímeros biodegradáveis, tais como o poli(ácido lático) (PLA) e o poli(ácido lático-co-glicólico) (PLGA), têm sido relatadas na literatura (Lince et al., 2011). De fato, o aumento da meia vida de fármacos e de seu acúmulo em tumores têm sido alcançados através de sua associação a nanoestruturas. Esses efeitos são dependentes do tamanho das nanopartículas (Mitra et al., 2001). Foi observado que nanopartículas de menor diâmetro (<100 nm) permanecem na circulação sistêmica por um período prolongado, enquanto que nanopartículas maiores (<200 nm) possuem a habilidade de se acumular mais facilmente em tumores (Mitra et al., 2001). Um tempo de circulação sistêmica e um tamanho adequados podem reduzir o

acúmulo das nanopartículas em tecidos saudáveis e aumentar o acúmulo em tecidos tumorais por extravasamento através das fenestras presentes na vasculatura tumoral (Blanco & Ferrari, 2014).

Outro agente que possui potencial para ser utilizado no tratamento contra o câncer é o selol. Este é um óleo viscoso composto de uma mistura de diferentes selenotriacilglicerídeos sintetizados a partir do óleo de sementes de girassol. Este composto contém selênio no estado de oxidação +4. A literatura sugere que o selênio presente no selol apresenta atividade anticâncer (Malinowska et al., 2009; P. Suchocki, Jakoniuk, & Fitak, 2003; Piotr Suchocki et al., 2007, 2010). Resultados publicados na literatura indicam que o selol em concentrações adequadas pode restaurar a sensibilidade aos agentes quimioterápicos em células malignas resistentes (Piotr Suchocki et al., 2007). Sendo assim, o potencial sinergismo de selol com quimioterápicos, como a DOX, pode ser explorado para tratamento do câncer. Neste contexto, a proposta deste projeto é desenvolver nanocápsulas com núcleo de selol e invólucro composto de poli(metil vinil-éter co-anidrido maleico) conjugado à DOX. Pretende-se, com esta estratégia, reduzir a cardiotoxicidade da DOX pela redução de sua entrega ao tecido cardíaco ou por alteração de seu mecanismo de citotoxicidade no nível celular, bem como melhorar a sua eficácia anticâncer pelo aumento da sua entrega ao tecido tumoral e pela potencial sinergia da DOX com o selol.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Câncer de Mama

Em condições fisiológicas normais, células epiteliais possuem estrutura bem definida formando camadas uniformes. No caso da mama, as células epiteliais formam o revestimento dos ductos que são responsáveis pelo transporte do leite durante a lactação (Videira, Reis, & Brito, 2014). Mais de 80% dos cânceres de mama têm origem no epitélio ductal, chamado carcinoma ductal. Uma minoria dos cânceres de mama se origina no epitélio lobular, chamado carcinoma lobular (Figura 1). O câncer de mama ocorre em homens e mulheres, mas em homens a ocorrência é rara (INCA 2014).

Em geral, os tumores de mama são classificados em quatro estágios com base no tamanho do tumor e envolvimento de nódulos. O primeiro estágio é caracterizado por uma massa tumoral bem definida e localizada, caracterizada por pouca invasão do tecido adjacente, já o segundo e terceiro estágios são caracterizados pelo aumento do volume tumoral e pela aquisição de um fenótipo invasivo (tumores maiores e metastáticos). No tumor de mama invasivo, o envolvimento de nódulos linfáticos faz surgir as subclassificações A, B e C, sendo o câncer de subclassificação A o de menor agressividade e o C o de maior agressividade. Já os tumores mais avançados são classificados como sendo de quarto estágio. O tamanho do tumor e a ocorrência de metástases estão positivamente correlacionados com o fenótipo invasivo. A progressão dos tumores ocorre junto com várias mutações envolvidas em quimioresistência, ativação da proliferação e da sobrevivência tumoral, promovendo resultados clínicos heterogêneos (Videira et al., 2014).

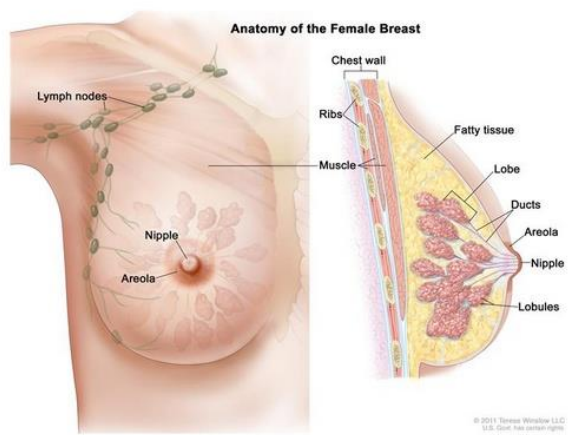


Figura 1. Anatomia da mama feminina (“National Cancer Institute”, 2015)

2.2 Principais tratamentos para o câncer de mama

As opções de tratamento para o câncer de mama incluem cirurgia, radioterapia, quimioterapia, terapia hormonal e terapia alvo como os anticorpos monoclonais (“National Cancer Institute”, 2015). Mas em estágios mais avançados e agressivos estas estratégias são caracterizadas por resultados insatisfatórios, falta de especificidade dos tratamentos e possível recorrência da doença (Blanco & Ferrari, 2014).

O tratamento depende dos fatores do prognóstico e frequentemente envolve uma combinação de intervenções locais como cirurgia e radioterapia, associadas a tratamentos sistêmicos como quimioterapia, terapia hormonal e/ou terapia direcionada (Siegel et al., 2014). A cirurgia consiste na remoção total ou parcial da mama (mastectomia), e pode ocorrer também a remoção de nódulos linfáticos adjacentes. A radioterapia consiste na utilização de radiações ionizantes que são capazes de destruir células tumorais. A radiação é comumente utilizada em associação com a quimioterapia (INCA, 2014; Murawa, Murawa, Adamczyk, & Połom, 2014). Devem ser também considerados, na escolha do tratamento, os fatores biológicos do tumor, como a expressão gênica dos diferentes receptores e a presença ou ausência de metástase (Bourdeanu & Liu, 2015).

A terapia neoadjuvante é o tratamento utilizado antes do procedimento cirúrgico. Esta é bem estabelecida para cânceres de mama localmente avançados ou para cânceres de mama precoces. Sua principal função é melhorar os resultados cirúrgicos (Gampenrieder, Rinnerthaler, & Greil, 2013). Os pacientes que possuem os linfonodos axilares acometidos são candidatos à realização de quimioterapia, já para os que não possuem o envolvimento desses linfonodos, é necessário levar em consideração a anatomia, histologia e características patológicas do tumor para a escolha do tratamento (Bourdeanu & Liu, 2015).

O tratamento do câncer de mama metastático ainda é um desafio. Mesmo quando o câncer de mama metastático não pode ser curado, o tratamento com novos agentes pode ser efetivo, aumentando o tempo de vida dos pacientes sem os sintomas relacionados à doença. A quimioterapia é utilizada para o câncer de mama metastático avançado como forma paliativa e quando a doença progride para órgãos viscerais ameaçando a qualidade de vida. Os agentes utilizados incluem antraciclinas (doxorubicina, epirubicina), taxanos (paclitaxel, docetaxel), platinas (cisplatina, carboplatina), capecitabina, vinorelbina e gencitabina (Johnston, 2011).

2.3 Nanotecnologia no tratamento de neoplasias

A aplicação da nanotecnologia pode trazer avanços significativos no diagnóstico, tratamento e no acompanhamento do câncer. A nanotecnologia envolve a engenharia de dispositivos com dimensões na escala nanométrica, similares com algumas vesículas biológicas ou às macromoléculas do nosso corpo. As nanoestruturas são capazes de superar as barreiras biológicas, podem se acumular preferencialmente em tumores, e podem ser especificamente direcionadas às células cancerosas para a detecção ou tratamento do tumor. Ainda, podem ser projetadas para se acumular passivamente nos tumores devido ao efeito de retenção e permeação aumentadas (EPR), causado pela vascularização malformada, com janelas maiores, e drenagem linfática ineficiente, características de vários cânceres sólidos (M. Wang & Thanou, 2010).

Um dispositivo terapêutico anticâncer eficaz é aquele que tem a capacidade de reduzir e eliminar tumores sem danificar tecidos saudáveis. Um aumento da especificidade do agente anticâncer pode melhorar a eficácia do tratamento e diminuir a possibilidade de efeitos adversos. Nanopartículas podem oferecer melhorias na terapêutica contra o câncer por poder se acumular mais intensamente no local do tumor, e ter a capacidade de escapar de mecanismos de resistência a múltiplos fármacos (Byrne, Betancourt, & Brannon-Peppas, 2008).

Dentre as nanoestruturas já estudadas, nanoesferas, nanocápsulas, lipossomas, micelas, entre outros, podem ser utilizadas para a entrega de agentes terapêuticos. Podem ser realizadas várias modificações nestas nanoestruturas para controlar suas propriedades *in vivo* como, por exemplo, sua longevidade, sua estabilidade na circulação, ou sua especificidade ao tecido alvo (V. Torchilin, 2009).

Alguns sistemas nanoestruturados de entrega de fármacos já estão aprovados por diferentes agências regulatórias para o uso clínico no tratamento do câncer. Os exemplos incluem a doxorrubicina lipossomal (Myocet™, Elan Pharmaceuticals), doxorrubicina lipossomal peguilada (DOXIL®), Ortho Biotech, e Caelyx®, Schering Plough), daunorubicina lipossomal peguilada (DaunoXome®, Diatos), nanopartículas de paclitaxel conjugadas à albumina (Abraxane®, Abraxis Bioscience), entre outras (Byrne et al., 2008).

Entre os dispositivos de entrega utilizados, podem ser destacadas as nanocápsulas poliméricas, que são sistemas vesiculares (figura 2) com um núcleo líquido ou sólido, que

geralmente confina os fármacos, e uma membrana polimérica, denominada invólucro, que o envolve. O núcleo da nanocápsula pode ter característica hidrofílica ou lipofílica, de acordo com o método de preparo e os materiais utilizados. As nanocápsulas também podem carrear os fármacos em sua superfície ou embebidos em seu invólucro (Mora-Huertas, Fessi, & Elaissari, 2010).

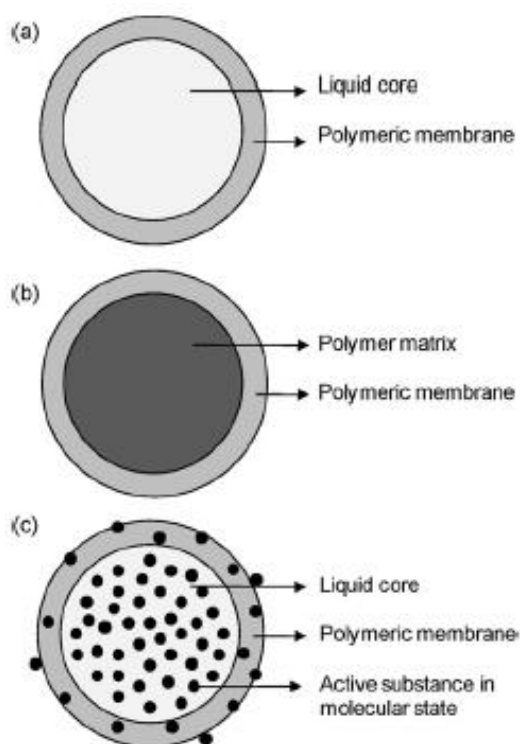


Figura 2. Diferentes nanocápsulas. a, núcleo líquido. b, núcleo composto por matriz polimérica. c, fármacos no núcleo e na membrana polimérica. (Mora-Huertas et al., 2010).

O invólucro é geralmente composto por um polímero. Neste caso, o PVM/MA [poli(metil vinil-éter-co-anidrido maléico)] (Gantrez® AN 119) é um copolímero de baixa toxicidade e excelente biocompatibilidade (Krassimira Yoncheva, Lizarraga, & Irache, 2005). Estas características são importantes para o desenvolvimento de nanocarreadores de agentes terapêuticos. Uma característica vantajosa deste polímero é a presença de grupamentos anidrido (Figura 3), que podem ser usados para ligar facilmente diferentes tipos de moléculas, principalmente aquelas com grupamentos hidroxila ou amina (Arbós, Wirth, Arangoa, Gabor, & Irache, 2002).

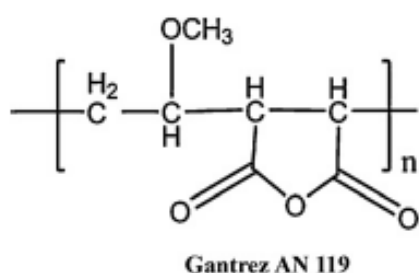


Figura 3. Estrutura do PVM/MA (poli (metil vinil-éter-co-anidrido maléico) (Gantrez NA 119) (Guhagarkar, Gaikwad, Samad, Malshe, & Devarajan, 2010).

2.4 Doxorrubicina

A DOX, também chamada de adriamicina, pertence à classe das antraciclinas (Bertazzoli, Chieli, Forni, Ricevuti, & Solcia, 1972), e é um dos agentes quimioterápicos mais importantes atualmente, sendo largamente utilizada contra tumores sólidos e leucemias agudas (Thorn, Oshiro et al. 2012). Porém, a ocorrência de resistência e efeitos adversos, principalmente danos ao miocárdio, têm limitado o seu sucesso no tratamento de câncer (Thorn, Oshiro et al. 2012). Alguns mecanismos têm sido propostos para explicar a ação da DOX, incluindo a inibição da topoisomerase II, intercalação com bases nitrogenadas no DNA, estresse oxidativo e superprodução de ceramida (Gewirtz, 1999; Minotti, Menna, Salvatorelli, Cairo, & Gianni, 2004; Senchenkov, Litvak, & Cabot, 2001). Mas a importância relativa destes mecanismos ainda permanece controversa (Yang et al., 2014).

Vários nanossistemas desenvolvidos, como micelas poliméricas, conjugados poliméricos e outros tipos de carreadores têm mostrado potencial para a redução da toxicidade da DOX em ensaios de fase 1 (Cai et al., 2010). O lipossoma peguilado contendo DOX (Doxil®) tem mostrado bons resultados clínicos (ROSE, 2005).

Estudos mostraram que a associação da DOX a nanopartículas poliméricas de poli(ácido lático-co-glicólico) (PLGA) e polietilenoglicol (PEG) não comprometeu sua eficácia, além de reduzir a sua cardiotoxicidade. Estas nanopartículas foram estudadas em modelo *in vivo* de camundongos BALB/c com linfoma (células B murinas da linhagem A20), e foi investigada a cardiotoxicidade dos tratamentos através de ecocardiograma, níveis de creatina fosfoquinase (CPK) e histopatologia. Foi observado que a administração da DOX

livre nos camundongos provocou um aumento de sete vezes no nível de CPK e uma significativa diminuição na fração de encurtamento do ventrículo esquerdo, enquanto que as nanopartículas associadas à DOX não provocaram nenhum desses resultados, possivelmente pelo aumento de sua entrega ao local do tumor e redução de sua entrega ao tecido cardíaco (Park et al., 2009).

Ainda, a DOX é um fármaco anfifílico (Mitry & Edwards, 2016) (figura 4) e, por possuir baixa absorção por via oral, é administrada por via endovenosa. Em tecidos sólidos a DOX apresenta baixa penetração e distribuição, e assim surge a importância do desenvolvimento de dispositivos de entrega que superem estas barreiras (Primeau, Rendon, & Hedley, 2005).

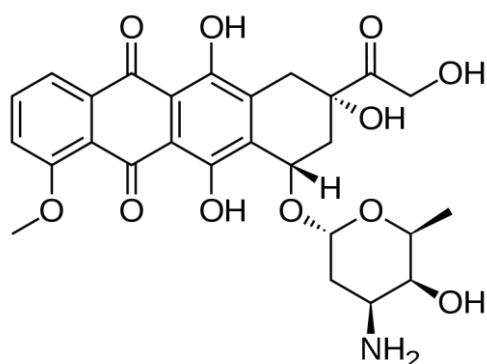


Figura 4. Estrutura química da doxorubicina (DOX).

2.5 Selol

O selol é composto de uma mistura de selenitotriacilglicerídeos (figura 5), com selênio em seu estado de oxidação +4, que possui toxicidade sistêmica relativamente baixa (Malinowska et al., 2009; P. Suchocki et al., 2003; Piotr Suchocki et al., 2007, 2010). Sendo assim, comparado a outros compostos contendo selênio IV, é possível administrar o selol em doses relativamente altas, possibilitando explorar sua atividade anticâncer associada a uma baixa toxicidade sistêmica (Piotr Suchocki et al., 2007, 2010). Tem sido especulado que a atividade anticâncer de compostos contendo selênio está relacionada à sua atividade pró-oxidante (Drake, 2006), induzindo estresse oxidativo em células cancerosas (Piotr Suchocki et al., 2010).

Ensaio *in vitro* demonstraram que o selol exibe forte habilidade em reduzir a viabilidade de células de leucemia resistentes à DOX ou vincristina (Piotr Suchocki et al., 2007). Neste contexto, tem sido proposto que o selol pode aumentar a sensibilidade de células tumorais resistentes a agentes quimioterápicos (P. Suchocki et al., 2003). Ensaio *in vitro* também demonstraram que o selol é citostático e ativa mecanismos de apoptose (de Souza et al., 2014). Sendo assim, o selol apresenta potencial para ser utilizado como adjuvante no tratamento quimioterápico do câncer. Porém, por ser um composto altamente hidrofóbico, sua aplicação em organismos vivos ainda é um desafio. Este problema pode ser superado através da nanoencapsulação do selol e sua dispersão em um veículo aquoso. O desenvolvimento de uma nanocápsula polimérica contendo selol já foi realizado (de Souza et al., 2014), mas a sua combinação com outro agente quimioterápico, como a DOX, em uma mesma nanoestrutura, ainda não foi estudada.

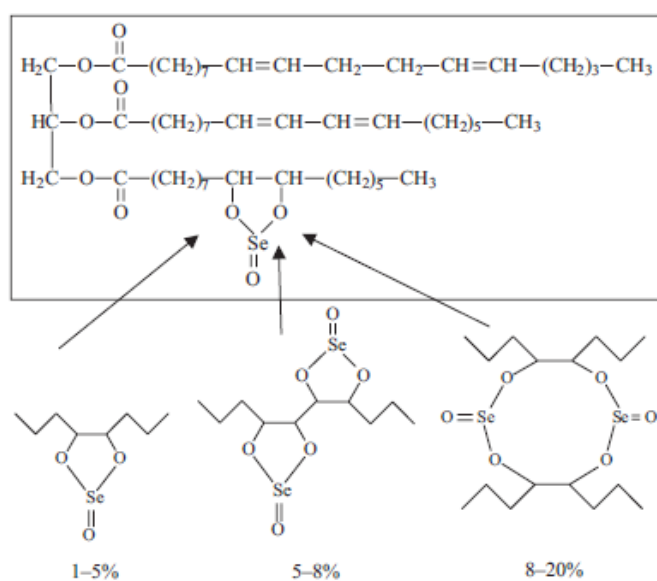


Figura 5. Estrutura do selol de acordo com a concentração de selênio (Piotr Suchocki et al., 2010).

3. JUSTIFICATIVA

A quimioterapia contra o câncer continua sendo um desafio devido aos mecanismos de resistência das células tumorais e à toxicidade dos fármacos anticâncer. O uso de nanoestruturas como carreadores de fármacos anticâncer pode aumentar a eficácia e reduzir os efeitos colaterais da quimioterapia. As nanoestruturas oferecem várias vantagens para a entrega de fármacos, as quais geralmente não são observadas com as formas farmacêuticas convencionais.

A hipótese deste projeto é que nanocápsulas com diâmetro entre 100 e 200 nm atravessam mais facilmente as fenestras presentes em tumores de mama, devido ao efeito EPR, do que fenestras presentes na vasculatura de tecidos saudáveis. Este evento aumentaria o índice terapêutico destes fármacos nanoencapsulados em relação aos fármacos livres. Ainda, o selol pode atuar sinérgica ou aditivamente com a DOX em células cancerosas, aumentando sua eficácia contra o tecido tumoral. Assim, uma formulação com estas nanocápsulas seria eficaz contra câncer de mama e provocaria menos efeitos adversos.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

Desenvolver um sistema de nanocápsulas com núcleo oleoso de selol e invólucro de PVM/MA ligado à DOX, para alcançar a redução da cardiotoxicidade da DOX, mantendo ou aumentando a sua eficácia contra câncer de mama murino.

4.2 Objetivos Específicos

- Desenvolver nanocápsulas funcionalizáveis com invólucro polimérico e núcleo de selol com diâmetro hidrodinâmico entre 100 e 200 nm, útil ao direcionamento a tumores;
- Associar às nanocápsulas a doxorrubicina de maneira a aumentar ou manter sua atividade anticâncer e reduzir seus efeitos adversos;
- Avaliar as características coloidais – potencial zeta, diâmetro hidrodinâmico e índice de polidispersão – e morfológicas das nanocápsulas;
- Verificar a atividade das nanocápsulas em ensaio de viabilidade em células de adenocarcinoma mamário murino (4T1) e fibroblastos murinos (NIH-3T3) *in vitro*;
- Verificar o perfil de interiorização e mecanismos de morte das nanocápsulas por células 4T1 *in vitro*;
- Analisar o perfil de distribuição intracelular das nanocápsulas em células 4T1 *in vitro*;
- Avaliar o potencial cardiotoxígeno e a eficácia anticâncer das nanocápsulas em modelo de tumor induzido pelo inóculo subcutâneo de células 4T1 em camundongos BALB/c fêmeas *in vivo*.

5. MÉTODOS

5.1 Materiais

Tabela 1. Materiais utilizados nos experimentos

Materias	Fabricante
7AAD (7-Amino-Actinomicina D)	BD, EUA
Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT)	Invitrogen, EUA
Acetona (99,60%)	J.T. Backer, Brasil
Acetonitrila (99,95% - grau HPLC)	J.T.Backer, Brasil
Ácido tricloroacético ($\geq 99,0\%$)	Sigma, EUA
Anexina V	BD, EUA
Azul de tripan	Sigma, EUA
Brometo de potássio (KBr) ($\geq 99,0\%$)	Sigma, EUA
Dimetilsulfóxido (DMSO) ($\geq 99,5\%$)	Sigma, EUA
Cloridrato de doxorubicina (Padrão da Farmacopéia Européia)	Sigma, EUA
Estreptomina	Gibco, EUA

Etanol (99,3° INPM)	J.T. Backer, Brasil
Giemsa	Laborclin, Brasil
Glicose	J.T. Baker, Brasil
Meio do Instituto Memorial Park Roswell (RPMI)	Gibco, EUA
Meio Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM)	Gibco, EUA
Membranas de diálise (50KDa)	Spectrum Laboratories, EUA
Metanol (99,96% - grau HPLC)	J.T.Backer, Brasil
Nitrato de prata	Sigma, EUA
Penicilina	Gibco, EUA
Peróxido de Hidrogênio	Vetec, Brasil
PVM/MA (Gantrez AN-119)	Gentilmente cedido por ISP, Brasil
RNAse	BD, EUA
Rodamina 123	Probes – Thermo Fisher, EUA
Selol (5% de selênio, m:m)	Gentilmente cedida pela Universidade Médica de Varsóvia, Polônia

Soro fetal bovino	Gibco, EUA
Solução salina tamponada com fosfato (PBS)	Laborclin, Brasil
Suportes para microscopia eletrônica de varredura	Electron Microscopy Sciences, EUA
Tampão de ligação (0,1M de HEPES (pH 7,4); 1,4 M de NaCl e 25mM de CaCl ₂)	(Sigma, EUA)
Telas de cobre (300 malhas)	Electron Microscopy Sciences, EUA
Tetróxido de ósmio	Electron Microscopy Sciences, EUA
Tripsina	Gibco, EUA
Tween 80	Sigma, EUA

5.2 Preparo das nanocápsulas

Nanocápsulas com núcleo oleoso de selol e invólucro de PVM/MA conjugado à DOX foram preparadas por meio de um método de nanoprecipitação baseado em um trabalho publicado pelo grupo na literatura. Este método consiste da dissolução do óleo e do polímero do invólucro em um solvente orgânico no qual sejam livremente solúveis, seguida da adição de água, induzindo assim a precipitação dos componentes hidrofóbicos. O solvente orgânico deve ser miscível com água (Mora-Huertas et al., 2010). A fase aquosa – solução de tensoativo em água ultrapura – possui uma alta tensão superficial capaz de atrair a fase orgânica, responsável por ocasionar uma turbulência interfacial no sistema, fazendo com que o polímero se deposite na interface óleo:fase aquosa (Mora-Huertas et al., 2010). Este processo induz a formação de nanocápsulas, nas quais o polímero compõe um invólucro que contém o núcleo oleoso. Fármacos podem ser associados tanto ao invólucro quanto ao núcleo.

Neste trabalho, a hipótese é de que a DOX foi ligada covalentemente ao PVM/MA do invólucro em reação mantida em meio líquido – mistura de DMSO e acetona – sob temperatura ambiente e agitação branda por 24 horas. O produto desta reação foi um conjugado de PVM/MA e DOX (Pol-DOX). Ao fim da reação, foi adicionado selol, formando uma solução transparente. Na sequência, foram adicionados a esta solução o etanol e então a fase aquosa. Neste ponto foram formadas as nanocápsulas (figura 6). Para evitar a agregação e reduzir o tamanho das nanocápsulas, a fase aquosa continha tensoativos de HLB (do inglês, *hydrophilic-lipophilic balance*) entre 15 e 18. Após a adição da fase aquosa, a mistura foi mantida sob agitação por 10 minutos e os solventes foram então removidos por destilação a 40 °C sob pressão reduzida (50 mbar) em rotaevaporador (RotavaporR11®, BuchiSwitzerland, Suíça). A formulação foi analisada quanto às suas características coloidais (tópico 5.3.1), e então armazenada a 4 °C.

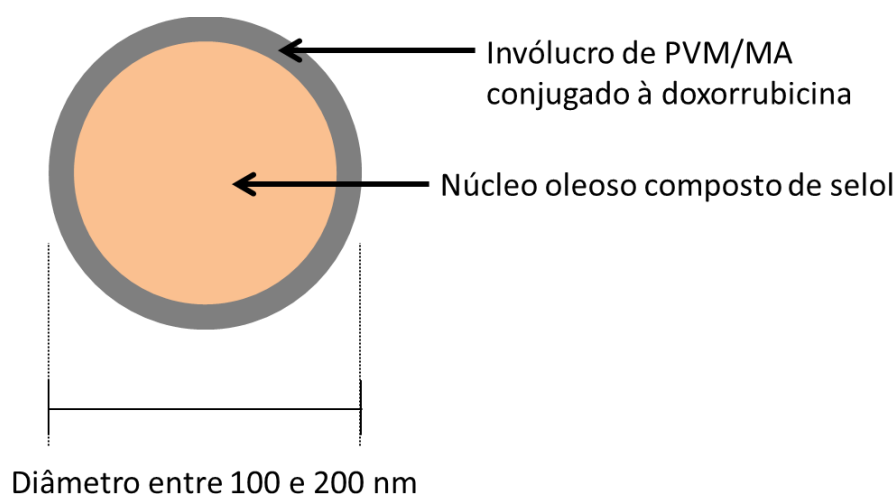


Figura 6. Representação de uma nanocápsula de selol com invólucro polimérico conjugado à doxorrubicina (NCS-DOX).

Para o desenvolvimento de uma formulação que atendesse aos objetivos desse trabalho, diferentes concentrações de selol, PVM/MA, tensoativo e DMSO foram testadas (Tabela 2). A melhor formulação (NCS-DOX) foi produzida da seguinte forma: primeiramente, 50 mg de PVM/MA e 2,5 mg de DOX foram dissolvidos em 100 μ L de DMSO (dimetilsulfóxido). O DMSO foi utilizado para auxiliar na dissolução da DOX e polímero. Em seguida, foram adicionados 4,9 mL de acetona. Esta solução foi deixada em

agitação branda por 24 horas no escuro para que a DOX reagisse com o PVM/MA. Posteriormente, foram adicionados 60 mg de selol e a solução foi deixada sob agitação magnética por 10 minutos. Então, foi adicionado etanol e, na sequência, esta mistura foi vertida em béquer contendo 10 mL de água e 60 mg de Tween 80. Neste passo as nanocápsulas foram formadas. Os solventes orgânicos e água foram removidos por destilação até restar o volume de 5 mL. Sendo assim a concentração final de DOX nesta formulação foi de 0,5 mg/mL. Também foi preparada uma formulação de nanocápsulas com as mesmas concentrações dos componentes, mas sem adição de DOX, a NCS (nanocápsulas de selol), para comparações *in vitro*.

Tabela 2. Componentes das formulações de nanocápsulas de selol e DOX e dados do volume final concentrado em rotaevaporador.

Formulação	Selol (mg)	DOX (mg)	PVM/MA (mg)	Tween 80 (mg)	DMSO (µL)	Acetona	Etanol	Volume final (mL)
NCS-DOX (formulação de trabalho)	60	2,5	50	60	100	4,9	10	5
NC-1	60	5	100	60	1000	4	10	10
NC-2	60	5	50	60	100	4,9	10	5
NC-3	60	5	100	60	100	4,9	10	5
NC-4	60	5	50	60	250	5	10	2
NC-5	60	5	100	60	500	5	10	2
NC-6	60	2,5	50	60	250	5	10	5
NC-7	60	2,5	100	60	500	5	10	5

5.3 Caracterização das nanocápsulas poliméricas contendo selol e DOX

5.3.1 Análise das propriedades coloidais

As nanocápsulas desenvolvidas foram armazenadas a 4 °C e analisadas em aparelho de dispersão de luz dinâmica (ZetaSizer Nano ZS[®], Malvern Instruments Ltd., Reino Unido; laser 633 nm) para a determinação do seu diâmetro hidrodinâmico, potencial zeta e índice de

polidispersão. Para isto as amostras foram diluídas em água MiliQ®, na concentração de 5% (v:v). A temperatura para análise foi mantida em 25 °C e o ângulo de leitura em 90°. As leituras foram realizadas em triplicatas.

5.3.2 Avaliação da estabilidade

Alíquotas contendo as nanocápsulas para análise da estabilidade – NCS-DOX – foram submetidas às seguintes temperaturas de armazenamento: 20-30 °C (temperatura ambiente), 4 °C e 37 °C. Para a NCS-DOX, amostras também foram dispersadas em meio de cultivo celular e acondicionadas em estufa a 37 °C para análise da estabilidade nas condições de cultivo celular suplementado com soro fetal bovino (SFB). Em determinados tempos de armazenamento, as características coloidais foram avaliadas (ver tópico 5.3.1). As dispersões de nanocápsulas – NCS-DOX e NCS – também foram avaliadas quanto ao pH e foram centrifugadas (Centrífuga Hettich – Mikro 220R Alemanha) à 31.514 g por 30 minutos em microtubos à temperatura de 4 °C para a investigação de separação de fases.

5.3.3 Morfologia de superfície e estrutura

A caracterização da morfologia de superfície das nanocápsulas – NCS-DOX – foi realizada em microscópio eletrônico de varredura (MEV) (Quanta Feg 250, FEI Company, EUA). Uma alíquota de 40 µL da suspensão de nanocápsulas foi depositada sobre suportes de metal (stubs), logo em seguida a amostra foi fixada em vapor de tetróxido de ósmio (1%) (p:v) por 1 hora. A amostra foi deixada para secar em dessecador contendo sílica por 24 horas, em seguida foi coberta com ouro em metalizador Blazers SCD 050® (Blazers Union AG, Liechtenstein). As imagens foram digitalizadas utilizando uma câmera Nav-Cam™ (FEI Company, EUA).

A forma das nanocápsulas foi analisada em microscópio eletrônico de transmissão (MET) (JEOL JEM 1011®, Japão). Para tal as amostras foram diluídas em água MiliQ® na concentração de 5% (v:v), colocadas sobre telas de cobre (300 malhas) previamente cobertas com Formvar 0,5% e fixadas em vapor de tetróxido de ósmio (1%) (p:v) por 20 minutos.

5.3.4 Quantificação da DOX por cromatografia líquida de alto desempenho

O perfil de liberação da DOX das nanocápsulas NCS-DOX foi avaliado através de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (Shimadzu-Prominence) acoplada ao desgaseificador (Modelo DGU 20A₅), com módulo de distribuição de solvente (modelo LC-20AT), amostrador automático (modelo SIL-20AHT), forno de coluna (Modelo CTO-20A), detector de fluorescência (Modelo RF-10AXL) e controlador do sistema CBM-20A. A fase estacionária consistiu de uma coluna C18 de fase-reversa ACE AQ (25 x 0,4 cm, 5 µm diâmetro de partícula) (ACE, Aberdeen, Scotland) com uma pré-coluna (1 x 0,4 cm, 5 µm diâmetro de partícula) (ACE, Aberdeen, Scotland).

Soluções de DOX com concentrações entre 0,05 e 2,0 µg/mL foram preparadas em mistura de metanol:água (1:1 v:v) para obtenção da curva padrão/calibração. A fase móvel foi obtida pela mistura de 65% de ácido tricloroacético 0,05 M aquoso e 35% de acetonitrila (v:v). As medições fluorimétricas foram realizadas em célula de fluxo de 12 µL com comprimento de onda de excitação de 470 nm e de emissão de 555 nm. O volume de injeção foi de 20 µL, a taxa do fluxo durante o ensaio foi de 1 mL/min a uma pressão de trabalho de 120 kgf.cm⁻². A temperatura da coluna foi mantida em 30 °C. O software *LC solution* (Shimadzu, Tokyo, Japan) foi usado para o processamento e identificação dos parâmetros cromatográficos.

5.3.5 Análise do perfil de liberação de DOX

A análise da liberação da DOX das nanocápsulas NCS-DOX foi realizada pelo método de diálise utilizando membranas com poros de 50 kDa (membranas de ester celulose, SpectrumLabs, EUA). Em um experimento típico, 1 mL da formulação NCS-DOX e da DOX livre (0,5 mg de DOX/mL) foi adicionado à bolsa de diálise, que foi selada e imersa em 249 mL de meio dialisador (metanol e água, 1:1 (v:v)) por 48 horas, a 37 °C, sob agitação contínua a 180 rpm. Na sequência, em determinados tempos, 1 mL de meio dialisador foi recolhido e o mesmo volume foi repostado ao sistema. As alíquotas retiradas foram mantidas congeladas até análise em HPLC. Os valores foram plotados de acordo com a porcentagem acumulada de liberação da DOX.

O cálculo da liberação foi realizado de acordo com a seguinte equação:

$$\text{Liberação (\%)} = \frac{[\text{DOX liberada}]}{[\text{DOX total}]} \times 100$$

Na qual, DOX liberada é a concentração de DOX medida no meio dialisador, e DOX total é a concentração teórica máxima de DOX (2 µg/mL) que seria observada caso houvesse liberação de toda a DOX da formulação.

5.3.6 Espectroscopia de Transmitância na Região do Infravermelho

Para verificar o tipo de interação química entre a DOX e o PVM/MA, nas nanocápsulas NCS-DOX, espectros de transmitância na região do infravermelho de várias amostras foram obtidos em espectrômetro de infravermelho com transformada de Fourier (sigla em inglês, *FTIR*) (Vertex 70, Bruker, EUA). As amostras analisadas foram: DOX, PVM/MA, selol, NCS, Pol-DOX e NCS-DOX. Para o preparo da pastilha, as amostras secas foram diluídas em KBr (brometo de potássio) seco na proporção de 1:100 (m:m).

5.3.7 Espectroscopia Raman intensificada por superfície

A espectroscopia Raman Amplificada por superfície (sigla em inglês, *SERS*) também foi realizada para caracterizar a interação entre DOX e o PVM/MA das nanocápsulas NCS-DOX. Amostras isoladas de DOX, PVM/MA, selol, NCS, Pol-DOX e NCS-DOX foram preparadas e analisadas. PVM/MA e selol foram diluídos em solução de água destilada e DMSO (1:2, v:v). NCS-DOX, DOX e Pol-DOX foram diluídas em água destilada (1:2, v:v). As amostras de NCS foram utilizadas sem diluição. Na sequência, as amostras preparadas foram depositadas em placas cobertas por filme de nitrato de prata a 6×10^{-4} mol/L e secas com o auxílio de nitrogênio gasoso. Para obtenção dos espectros de SERS foi utilizado um espectrômetro triplo (Jobin Yvon modelo T64000, Tripla Raman Spectrometer, Horiba, Japão). O feixe do laser de íon argônio foi focalizado na amostra por meio de uma lente cilíndrica, isto para evitar aquecimento das amostras e garantir a reprodutibilidade dos espectros de SERS, a qual forneceu uma densidade de potência de 0,1 W/cm². A linha

utilizada foi de 514,5 nm do laser de íon argônio com potência ótica na amostra de 200 mW. A luz espalhada foi coletada na configuração de macro-Raman.

5.4 Avaliações *in vitro*

5.4.1 Cultivo celular

Células tumorais murinas das linhagens 4T1 (adenocarcinoma mamário) foram obtidas do banco de células da *American Type Culture Collection* (ATCC), EUA, e células não tumorais murinas NIH-3T3 (fibroblastos) foram obtidas do banco de células do Rio de Janeiro. As células 4T1 foram cultivadas em meio RPMI suplementado com 10% (v:v) de soro fetal bovino (SFB) e 1% (v:v) de solução de antibiótico (100 unidades/mL de penicilina e 100 mg/mL de estreptomicina). As células NIH-3T3 foram cultivadas em meio DMEM (Meio Eagle modificado por Dulbecco) suplementado com 10% de SFB e 1% de antibiótico, estas foram utilizadas como células controle não tumorais. As células foram mantidas em incubadora úmida a 37 °C e 5% de CO₂.

5.4.2 Análise de viabilidade celular pelo método de MTT

O ensaio de MTT (3-(4,5-Dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolio brometo) foi utilizado para verificar a viabilidade das células (Mosmann, 1983). O teste foi realizado em células semeadas em placas de cultivo de 96 poços – 1 x 10⁴ células/poço – e expostas por 48 horas a: 1) NCS-DOX; 2) Pol-DOX; 3) NCS; 4) PVM/MA; 5) DOX, ou 6) meio de cultivo (controle). Cada tratamento foi realizado em sextuplicata e em 6 concentrações diferentes (equivalente a 0,03; 0,1; 0,3; 1,0; 3,0 e 9,0 µg de DOX/mL) obtidas por diluição seriada a partir de uma solução estoque. As concentrações de PVM/MA foram equivalentes para todas as formulações que continham este polímero (equivalente a 180; 60; 20; 6,6; 2,2 e 0,74 µg de PVM/MA/mL). As concentrações de selol também foram equivalentes para todas as formulações contendo selol (sendo as concentrações de 0,88; 2,66; 8; 24; 72 e 216 µg/mL). A fim de verificar se o tensoativo utilizado nas formulações causa redução na viabilidade, células 4T1 e NIH-3T3 também foram tratadas com solução de tensoativo em concentrações equivalente as utilizadas nas formulações. Os tratamentos para este experimento foram os seguintes: 1) Tween 80; 2) DOX e 3) Tween 80 + DOX (mistura de Tween 80 e DOX). Sendo

as concentrações de Tween 80 de 0,88; 2,66; 8; 24; 72 e 216 µg/mL. As concentrações de DOX foram as mesmas das formulações testadas.

Depois de 48 horas, as amostras foram removidas e as células foram incubadas com 0,5 mg/mL de MTT em meio de cultivo por 2,5 horas a 37 °C em atmosfera úmida e 5% de CO₂. A redução do MTT (de coloração amarela) a formazan (coloração roxa) é proporcional à atividade de desidrogenases, principalmente as mitocondriais e, conseqüentemente, à viabilidade celular (Mosmann 1983). Em seguida, a solução de MTT foi descartada e o formazan foi extraído das células com 200 µL de DMSO por poço. As placas foram analisadas em espectrofotômetro (Spectramax M2, Molecular Devices, EUA) e a absorbância foi medida no comprimento de onda de 595 nm. A absorbância foi utilizada como índice de viabilidade celular e os resultados foram expressos como porcentagem em relação aos grupos controles. Os resultados obtidos através do MTT foram comparados entre os diferentes tipos de tratamento. Foram realizadas três repetições do experimento.

5.4.3 Morfologia e confluência celular

A morfologia e confluência de células 4T1 e NIH-3T3 foram analisadas por meio de microscópio de luz invertido (Leica DMi1, Alemanha) utilizando corante de Giemsa. As células foram semeadas em placas de cultivo de 12 poços em concentração de 5×10^4 células/poço. Após 24 horas de cultivo, receberam os seguintes tratamentos: 1) NCS-DOX; 2) DOX e 3) meio de cultivo (controle). A concentração de DOX foi de 0,1 e 3 µg/mL, e a de selol – para NCS-DOX – foi de 2,66 e 72 µg/mL. O tempo de tratamento foi de 48 horas e apenas as células aderidas ao fundo dos poços foram analisadas. As imagens foram capturadas por meio de câmera óptica (Moticam 2300 3,0MP Live Resolution) controlada pelo *software* Motic Images Plus 2.0. As imagens foram obtidas utilizando magnificação de 20x.

5.4.4 Índice de adesão celular em tempo real

O experimento de RTCA (do inglês, *Real Time Cell Analysis*, da marca xCelligence-Roche, Suíça) foi realizado para verificar em tempo real a adesão celular, que é proporcional à proliferação e à viabilidade celulares. Para tal, células 4T1 e NIH-3T3 foram semeadas em concentração de 4×10^3 células/poço em placas de cultivo de 16 poços contendo biossensores eletrônicos para medição de impedância elétrica gerada pela adesão celular. Após 24 horas de

cultivo foram realizados os seguintes tratamentos: 1) NCS-DOX; 2) NCS; 3) Pol-DOX; 4) POL; 5) DOX e 6) meio de cultivo (controle). A concentração de DOX foi equivalente a 1 µg/mL e a de selol – para NCS-DOX – foi de 96 µg/mL. Os índices de células aderidas no fundo do poço foram monitorados a cada 30 minutos por 97 horas.

5.4.5 Ensaio de interiorização

Para análise de interiorização da DOX, células 4T1 foram semeadas em concentração de 1×10^5 de células/poço em placas de cultivo de 12 poços. Após 24 horas foram realizados os seguintes tratamentos, com concentração equivalente de DOX de 9 µg/mL: 1) NCS-DOX; 2) Pol-DOX; 3) DOX e 4) meio de cultivo (controle). A concentração de selol – para NCS-DOX – foi de 216 µg/mL. As células ficaram incubadas com os tratamentos por 0,25; 0,5; 1 e 3 horas, e em seguida analisadas em citômetro de fluxo (FACSVerse, BD, EUA). A fluorescência da DOX foi detectada em comprimento de onda de 590 nm. Para cada amostra, 10.000 eventos foram analisados usando o *software* FlowJo® vX 0.7.

5.4.6 Mecanismos de endocitose

Este experimento foi realizado para identificar por qual via de endocitose as nanocápsulas são interiorizadas pelas células. Em um experimento típico, células 4T1 na concentração de 3×10^4 células/poço foram semeadas em placas de cultivo de 12 poços. Após 24 horas, estas foram incubadas com inibidores de endocitose por 30 minutos, sendo estes: nistatina, citocalasina D, amilorida, azida sódica e filipina. Amilorida e citocalasina D inibem as vias de endocitose mediadas por macropinositose. Nistatina e filipina inibem as vias de endocitose mediadas por cavéolas (caveolina) (Zeng & Zhang, 2012). Já a azida sódica inibe a endocitose por vias que são dependentes de ATP (Sato, Nagai, Mitsui, Ryoko Yumoto, & Takano, 2009). Em seguida as células foram tratadas com: 1) NCS-DOX; 2) Pol-DOX; 3) DOX e 4) meio de cultivo (controle) por 3 horas. A concentração de DOX em todos os tratamentos, exceto o controle, foi de 9 µg/mL e de selol –para NCS-DOX – 216 µg/mL. Para cada tratamento, foram mantidos controles sem incubação com os inibidores. A fluorescência da DOX foi detectada em comprimento de onda de 590 nm. As células foram analisadas em citômetro (FACSVerse, BD, EUA) e 10.000 eventos foram contados por amostra. Os resultados foram analisados usando o *software* FlowJo® vX 0.7.

5.4.7 Fragmentação de DNA

Para análise da fragmentação de DNA, células 4T1 foram semeadas em concentração de 2×10^4 células/poço em placas de cultivo de 12 poços e após 24 horas foram incubadas com os seguintes tratamentos: 1) NCS-DOX; 2) Pol-DOX; 3) DOX e 4) meio de cultivo (controle) por 24 e 48 horas. A concentração de DOX foi de $1 \mu\text{g/mL}$ para todos os tratamentos, exceto o controle, e de selol – para NCS-DOX – $24 \mu\text{g/mL}$. As células foram lavadas com PBS e incubadas com $50 \mu\text{g/mL}$ de RNase por 30 minutos em estufa à 37°C . O material genético foi marcado com 7AAD na concentração de $2,5 \mu\text{g/mL}$ por 5 minutos à temperatura ambiente. As células foram analisadas em citômetro (FACSVerse, BD, EUA) e 10.000 eventos foram contados por amostra. A fluorescência da DOX foi detectada em comprimento de onda de 590 nm e do 7AAD em 650 nm. Os resultados foram analisados no *software* FlowJo® vX 0.7.

5.4.8 Análise de morte e morfologia celular por citometria de fluxo

Para a análise de exposição de fosfatidilserina – sinal de apoptose – e perda da integridade da membrana celular – sinal de necrose –, foram realizadas marcações com anexina V e 7AAD, respectivamente. Células 4T1 foram semeadas em concentração de 2×10^4 células/poço em placas de 12 poços. Após 24 horas foram realizados os seguintes tratamentos: 1) NCS-DOX; 2) Pol-DOX; 3) DOX e 4) meio de cultivo (controle). A concentração de DOX foi de $1 \mu\text{g/mL}$ e de selol – para NCS-DOX – $24 \mu\text{g/mL}$. Após 48 horas de tratamento, as células foram incubadas com tampão de ligação ($0,1 \text{ M}$ de HEPES pH 7,4; $1,4 \text{ M}$ de NaCl e 25 mM de CaCl_2) para aumentar a afinidade da anexina V à fosfatidilserina. Em seguida, $5 \mu\text{L}$ de anexina V e $10 \mu\text{L}$ de 7AAD foram adicionados às células, e estas foram então incubadas com estes marcadores por 5 minutos no escuro em temperatura ambiente. Como controle negativo foram utilizadas células tratadas apenas com DOX, sem incubação com os fluoróforos, para que apenas o sinal da DOX fosse detectado. A fluorescência da DOX foi detectada em comprimento de onda de 590 nm e de anexina V e 7AAD em 488 e 650 nm, respectivamente. As células foram analisadas em citômetro (FACSVerse, BD, EUA) e 10.000 eventos foram contados por amostra. Os resultados foram analisados com o *software* FlowJo® vX 0.7.

5.4.9 Potencial de membrana mitocondrial

Para análise do potencial de membrana mitocondrial foi utilizado o fluoróforo Rodamina 123. Células 4T1 foram semeadas em concentração de 2×10^4 células/poço em placas de 12 poços. Após 24 horas foram realizados os seguintes tratamentos: 1) NCS-DOX; 2) Pol-DOX; 3) DOX; 4) meio de cultivo (controle) e 5) peróxido de hidrogênio (controle positivo). A concentração de DOX foi de 1 $\mu\text{g/mL}$ e de selol – para NCS-DOX – 24 $\mu\text{g/mL}$. As análises foram realizadas após 24 e 48 horas de exposição aos tratamentos. As células aderidas e em suspensão foram analisadas. As células foram incubadas com 12 $\mu\text{g/mL}$ de Rodamina 123 por 15 minutos no escuro e em temperatura ambiente, e em seguida lavadas com PBS. As células foram então analisadas em citômetro (FACSVerse, BD, EUA), sendo que 10.000 eventos foram contados por amostra. A fluorescência da DOX foi detectada em comprimento de onda de 590 nm e para rodamina 123 foi de 530 nm. Os resultados foram analisados usando o *software* FlowJo® vX 0.7.

5.4.10 Análise de espécies reativas de oxigênio

A análise de produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) foi feita utilizando o reagente *CellROX green* (molecular probes®), sonda fluorescente utilizada para mensurar EROs em células vivas. Células 4T1 foram semeadas em concentração de 2×10^4 células/poço em placas de 12 poços. Após 24 horas foram realizados os seguintes tratamentos: 1) NCS-DOX; 2) Pol-DOX; 3) DOX; 4) meio de cultivo (controle) e 5) peróxido de hidrogênio (controle positivo). A concentração de DOX foi de 1 $\mu\text{g/mL}$ e de selol – para NCS-DOX – 24 $\mu\text{g/mL}$. As análises foram realizadas após 3; 24 e 48 horas de exposição aos tratamentos. As células aderidas e em suspensão foram analisadas. As células foram incubadas com 5 μM de CellROX por 30 minutos em estufa à 37 °C, e em seguida lavadas com PBS. Então, 10.000 eventos foram contados por amostra em citômetro (FACSVerse, BD, EUA). A fluorescência da DOX foi detectada em comprimento de onda de 590 nm e do *CellROX green* em 520 nm. Este experimento também foi utilizado para verificar a morfologia celular após os tratamentos. Os resultados foram analisados usando o *software* FlowJo® vX 0.7.

5.4.11 Análise de localização sub-celular

Para identificação da localização sub-celular da NCS-DOX e DOX, 5×10^4 de células 4T1 foram semeadas em placas de cultivo de 12 poços, contendo lamínula redonda de 18 mm de diâmetro. Após 24 horas as células receberam 800 μ L dos seguintes tratamentos: 1) NCS-DOX; 2) Pol-DOX e 3) DOX. A concentração de DOX foi de 9 μ g/mL e de selol – para NCS-DOX – 216 μ g/mL. As análises foram realizadas após 6 horas de exposição com os tratamentos. Faltando 30 minutos para o fim do tempo de exposição aos tratamentos, foram adicionados 200 μ L dos marcadores (fluoróforos) mitocôndria (*MitoTracker*®), retículo endoplasmático (*ER-Tracker*®), lisossomos (*LysoTracker*®) e núcleo (DAPI, adicionado 5 minutos antes), separadamente. As células permaneceram incubadas nas condições de 37 °C e atmosfera de 5% CO² umidificada. Após o total de 6 horas as células foram lavadas 2 vezes com PBS gelado, para retirada do excesso dos marcadores e dos tratamentos. As lamínulas foram retiradas com auxílio de uma pinça e montadas em uma lâmina limpa. As lâminas prontas foram analisadas imediatamente em microscópio confocal de varredura a laser (TSC SP5, Leica, Alemanha) para verificação da emissão de fluorescência da DOX dos tratamentos em relação aos marcadores. Para obtenção da fluorescência foram ajustadas as faixas espectrais nas condições descritas na Tabela 3.

Tabela 3. Faixas espectrais ajustadas para detecção da emissão de fluorescências da DOX e marcadores (fluoróforos).

	Excitação (nm)	Emissão (nm)
DAPI	358	461
<i>ER-Tracker</i> ®	374	430
<i>LysoTracker</i> ®	373	422
<i>MitoTracker</i> ®	490	516
DOX	488	590

As imagens foram obtidas em alta resolução utilizando microscópio confocal de varredura a laser ajustado com objetiva HCX PL APO 63x/1.40-0.60 CS-BL (imersão a

óleo), resolução de 1024 x 1024 *pixel* e com frequência de 100 Hz. Após a obtenção das imagens, foi utilizado o programa *Adobe Photoshop CC 2015* para ajuste da opacidade e montagem da co-localização (*merge*). Para verificação e análise da co-localização da DOX com as organelas, foi utilizado o *software* livre de processamento de imagens *ImageJ*. Primeiramente, foi feita a divisão dos canais vermelho (DOX), verde (*MitoTracker*®) e azul (*ER-Tracker*®, *LysoTracker*® e DAPI) e em seguida, as imagens foram colocadas na escala de cinza, pois a escala de cinza facilita a análise da localização da marcação e contagem dos *pixels* através do histograma da imagem (escala de 0-255). O próximo passo foi analisar a intensidade de correlação das imagens. Essa análise permite a verificação do valor total de *pixels* das duas imagens, sendo que a intensidade de co-localização foi obtida através da porcentagem de *pixels* positivos, ou seja, a sobreposição das duas imagens que apresentaram valores de *pixels* que referencia uma nova cor, por exemplo: mistura de vermelho e azul é roxa.

5.5 Avaliações *in vivo*

5.5.1 Manutenção dos animais

Camundongos fêmeas da linhagem BALB/c com 8 semanas e peso de 25-30 gramas (Biotério IPEN - CNEN/SP) foram usados neste trabalho. Os animais permaneceram em gaiolas plásticas com temperatura controlada (~24 °C), ciclo circadiano automatizado (12/12 horas claro/escuro) e filtragem de ar no biotério do Departamento de Genética e Morfologia do Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade de Brasília. A água e alimentação estavam disponíveis *ad libidum* em todo o tempo de experimentação.

Os experimentos realizados neste estudo foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, UnB Doc nº 139625/2015 (anexo I).

5.5.2 Indução de tumor

Os animais foram anestesiados pela via intraperitoneal com 100 µL de solução de cloridrato de cetamina e cloridrato de xilazina 2% (CX) (0,8 mg/kg e 0,1 mg/kg respectivamente), e foi realizada a tricotomização dos pelos do flanco direito. Em seguida, 100 µL de suspensão de células 4T1 na concentração de $2 \times 10^4/100 \mu\text{L}$, em meio de cultivo sem SFB, foram injetadas em cada animal, exceto controle sem tumor, pela via subcutânea.

5.5.3 Análises clínicas

Quinze dias após a indução tumoral, foram administrados os tratamentos por via endovenosa, através da veia caudal, utilizando seringas de insulina com capacidade de 0,3 mL (8 mm x 0,3 mm). Sendo assim, os animais foram divididos em grupos, anestesiados e tiveram seu regime terapêutico iniciado. Os tratamentos foram os seguintes: 1) NCS-DOX, 2) NCS, 3) DOX, 4) controle com tumor (injeção de solução de glicose 5% m:v) e 5) controle sem tumor (injeção de solução de glicose 5% m:v). Cada grupo consistia de 6 animais. O tratamento foi realizado com 4 doses, uma a cada 3 dias, com o equivalente a 3,2 mg de DOX/kg/dose. O volume de cada dose foi de aproximadamente 150 µL. As amostras foram isotonzadas com glicose a 5% m:v. No decorrer de 21 dias pós-tratamento, os animais foram observados diariamente e, a cada três dias, a massa corporal e o tamanho do tumor eram medidos.

O cálculo do tamanho tumoral foi realizado de acordo com a seguinte equação:

$$VT = \left(\frac{C + L}{2}\right)^3 \times \frac{4\pi}{3}$$

Onde: VT: volume tumoral (mm^3), C: comprimento do tumor (mm), L: largura do tumor (mm).

5.5.4 Análises bioquímicas

O sangue recolhido para análise bioquímica foi coletado em tubos com gel separador para a obtenção do soro e posteriormente foi armazenado a -20 °C até o momento de análise. O soro foi utilizado para verificar os níveis de CK-MB, enzima encontrada no músculo cardíaco sendo que seus níveis elevados indicam dano ao mesmo. Estes níveis foram avaliados em equipamento bioquímico (Analisador automático Chem Well T, LabTest, Brasil) com auxílio dos reagentes CK-MB Liquiform (LabTest, Brasil) e Qualitrol CK (LabTest, Brasil) obedecendo a dosagem do fabricante. Os grupos controles, ou seja, animais com e sem tumor que não receberam os tratamentos foram utilizados como referência.

5.5.5 Biodistribuição

Vinte e um dias após a indução tumoral foram administrados os tratamentos por via endovenosa, através da veia caudal: 1) NCS-DOX, 2) DOX ou 3) controle com tumor (injeção de solução de glicose a 5% m:v). O tratamento foi realizado com uma dose, com o equivalente a 2,2 mg de DOX/kg/dose. O volume de cada dose foi de aproximadamente 150 µL. Os animais foram então avaliados em 2, 4 ou 8 horas após a administração. O grupo controle foi analisado 2 horas após o tratamento. Para isotonzificação dos tratamentos foi adicionado glicose a 5% m:v.

Para analisar a fluorescência específica da DOX nos órgãos, os camundongos foram sacrificados após o tempo determinado (2, 4 ou 8 horas) e foram retirados coração, pulmão, baço, fígado, rins e tumor. Foi utilizado um grupo controle, ou seja, em que não foram administrados os tratamentos, para retirada da autofluorescência dos órgãos (retirada do branco). O comprimento de excitação e emissão foram 480 e 570 nm, respectivamente. Os dados de biodistribuição foram expressos em fótons/segundo/grama de tecido. A análise da fluorescência foi então realizada *ex vivo* em fluorímetro IVIS® Lumina XR.

5.6 Análises estatísticas

Os resultados foram analisados no *software* GraphPad Prisma® 6.0 e foram submetidos a testes estatísticos específicos com confiança estatística de 95% ($p < 0,05$). Diferenças estatísticas foram avaliadas pelos testes Anova, de uma ou de duas vias, aplicando pós-testes de múltiplas comparações de Tukey's ou Sidak's. Os resultados quantitativos foram descritos como média \pm erro padrão.

6. RESULTADOS

6.1 Desenvolvimento e caracterização das formulações de nanocápsulas

6.1.1 Características coloidais e estabilidade temporal de nanocápsulas com diferentes composições

Todas as nanocápsulas desenvolvidas apresentaram PDI abaixo de 0,2 – indicativo de monodispersão –, valores de PZ negativo, e diferentes valores de DH. As nanocápsulas apresentaram aumento no DH por volta de 30 nm no primeiro dia após a preparação, devido à hidrólise do PVM/MA e também apresentaram diferenças no DH ao decorrer de 330 dias (tabela 4 e figura 7).

Tabela 4. O diâmetro hidrodinâmico (*z-average*) (DH), índice de polidispersão (PDI) e potencial zeta (PZ) das nanocápsulas NC-1, NC-2, NC-3, NC-4, NC-5, NC-6 e NC-7 no primeiro e último dia de análise. Os valores foram expressos como média \pm erro padrão da média.

Formulação	DH (nm) - primeiro dia	DH (nm) - último dia	PDI (abaixo de)	PZ (mV)
NC-1	277,9 \pm 1,43	334,7 \pm 3,2	0,2	-27 a -34,8
NC-2	262,6 \pm 0,96	268,0 \pm 2,36	0,15	30,7 a -36,9
NC-3	274 \pm 5,35	290,3 \pm 1,38	0,15	-27,8 a -33,1
NC-4	294,1 \pm 2,59	318,2 \pm 6,81	0,17	-30,7 e -34,6
NC-5	291,4 \pm 4,51	301,0 \pm 1,20	0,15	-28,6 a -31,1
NC-6	291,1 \pm 5,18	305,2 \pm 3,37	0,2	-33 e -37,7
NC-7	346,8 \pm 3,97	421,9 \pm 3,67	0,2	-26,4 e -33

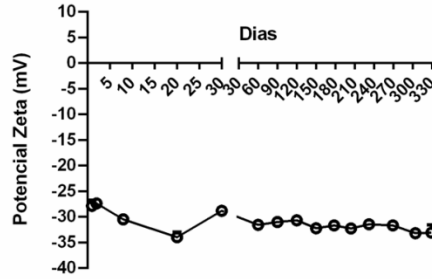
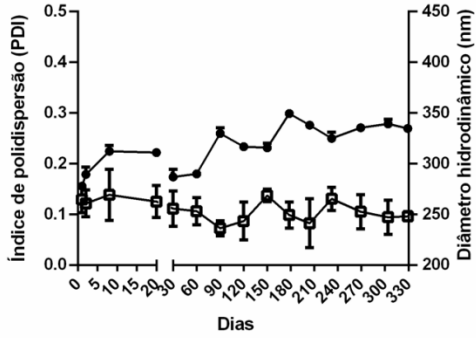
Legenda:

□ Índice de polidispersão

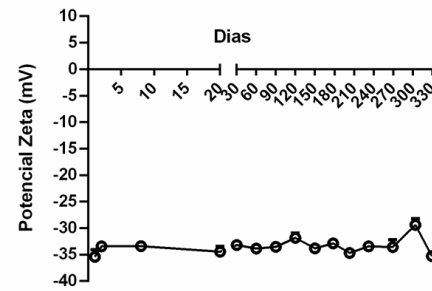
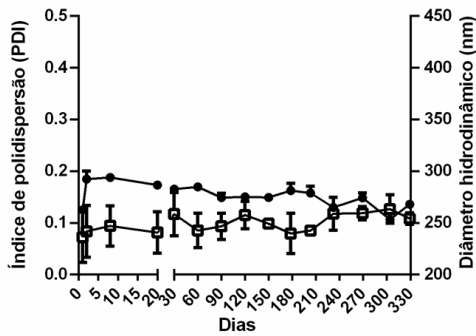
● Diâmetro hidrodinâmico

○ Potencial Zeta

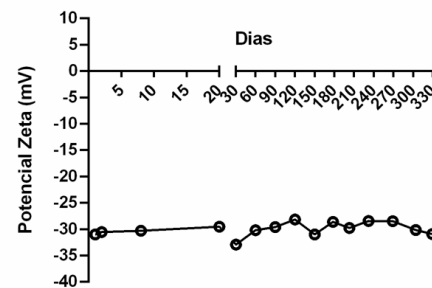
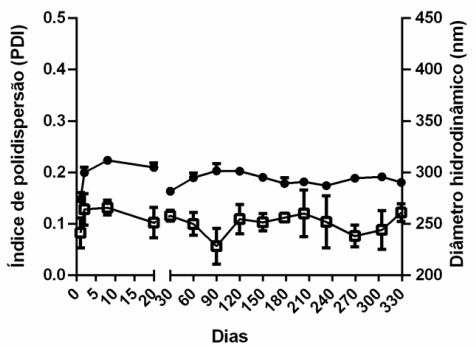
NC-1



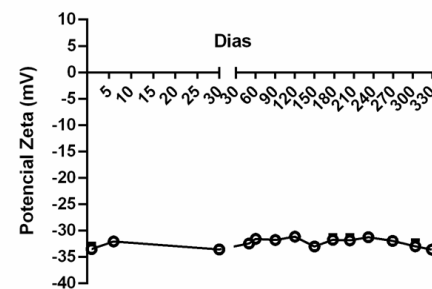
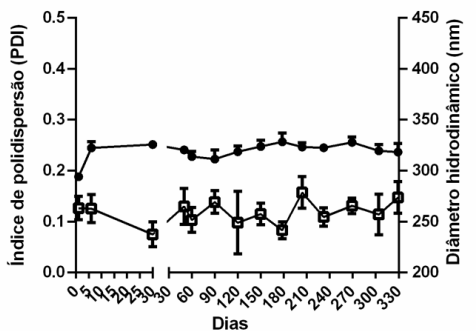
NC-2



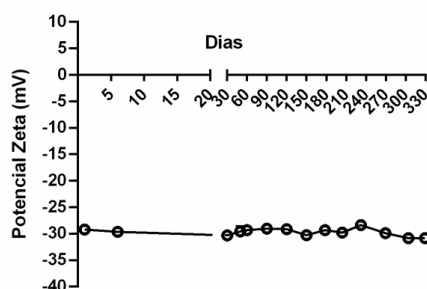
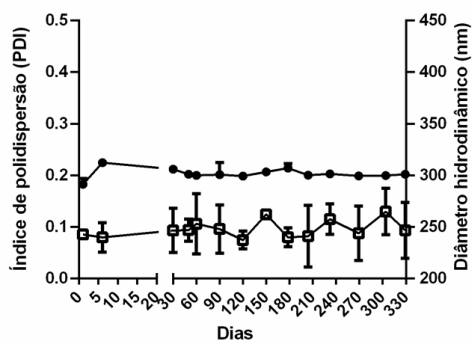
NC-3



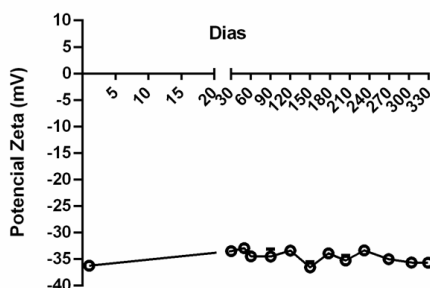
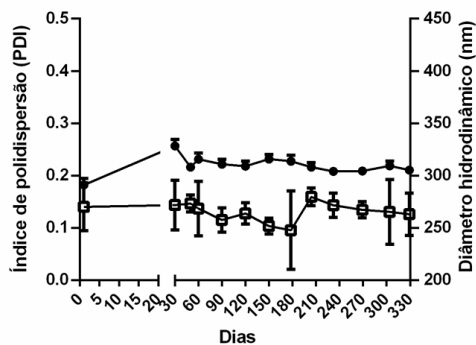
NC-4



NC-5



NC-6



NC-7

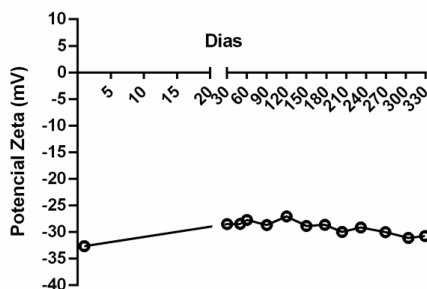
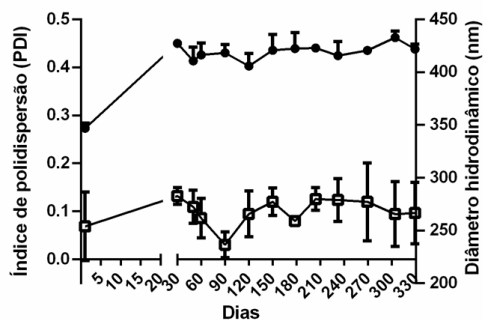


Figura 7. Diâmetro hidrodinâmico (DH - círculo cheio), índice de polidispersão (PDI - quadrado vazio) e potencial zeta (PZ - círculo vazio) das nanocápsulas NC-1, NC-2, NC-3, NC-4, NC-5, NC-6 e NC-7. Amostras armazenadas a 4°C. Os valores foram expressos como média ± erro padrão da média.

A formulação escolhida para proceder aos experimentos de eficácia anticâncer *in vitro* e *in vivo* foi a NCS-DOX. O DH, o PDI, o potencial zeta (PZ) e pH desta formulação estão apresentados na tabela 5. A NCS, nanocápsula contendo somente selol, foi utilizada como

controle em determinados experimentos. Somente a formulação principal, NCS-DOX, foi avaliada quanto à sua estabilidade temporal.

Tabela 5. O diâmetro hidrodinâmico (*z-average*) (DH), índice de polidispersão (PDI) e potencial zeta (PZ) das formulações frescas NCS-DOX (nanocápsulas de selol contendo DOX) e NCS (nanocápsulas de selol). Os valores foram expressos como média \pm erro padrão da média.

Formulação	DH (nm)	PDI	PZ (mV)	pH	Separação de fase
NCS-DOX	178,96 \pm 2,24	0,073 \pm 0,028	-35,26 \pm 1,06	2,62	Não
NCS	182,26 \pm 0,60	0,11 \pm 0,008	-35,46 \pm 0,24	2,62	Não

Após centrifugação, não houve separação de fases sob as condições utilizadas, as nanocápsulas permaneceram livremente dispersíveis, mas ocorreu pequena deposição no fundo do tubo de um material que deve ser nanocápsulas maiores (figura 8).



Figura 8. Amostras de NCS-DOX (nanocápsulas de selol contendo doxorubicina) (à esquerda) e NCS (nanocápsulas de selol) (à direita) após centrifugação.

A NCS-DOX a 4 °C e em temperatura ambiente (T.A.) apresentou um aumento no DH no primeiro dia, mas se manteve estável ao decorrer dos 375 dias seguintes. A 4 °C a

formulação apresentou diâmetro entre $178,96 \pm 2,24$ nm e $188,1 \pm 1,01$ nm no último dia de análise (figura 9). Para as formulações em T.A. houve uma redução paulatina do DH (figura 9). A formulação a essa temperatura apresentou DH de $179,4 \pm 1,34$ nm no dia da preparação e de $172,8 \pm 1,61$ nm no último dia de análise. Para as formulações em 37 °C houve redução do DH no período de análise de 375 dias, sendo que no dia da preparação o DH foi de $194,5 \pm 0,43$ nm e de $168,3 \pm 1,39$ nm no último dia de análise (figura 9). O PDI, para todas as condições, permaneceu abaixo de 0,2, demonstrando que as nanocápsulas permanecem monodispersas. O PZ permaneceu entre -40,8 e -31,3 mV para todas as condições. As nanocápsulas utilizadas para os ensaios *in vitro* e *in vivo* foram acondicionadas à temperatura de 4 °C.

A estabilidade da formulação também foi avaliada com as nanocápsulas dispersas no meio de cultivo e a 37 °C, sendo observado que não houve alteração aparente do DH, permanecendo por volta de 170 nm. O PDI ficou abaixo de 0,2, e o PZ permaneceu em torno de -19 mV (tabela 6 e figura 9).

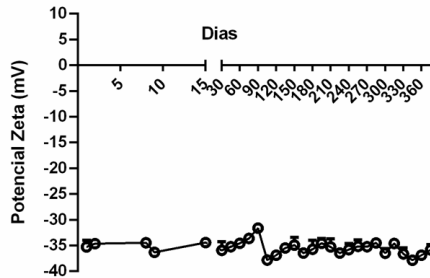
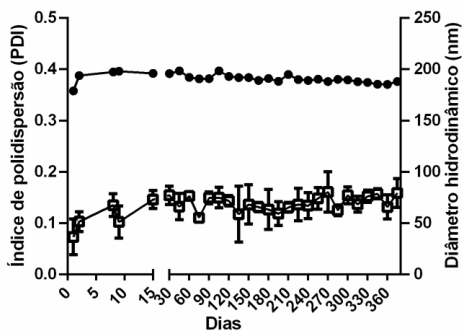
Legenda:

□ Índice de polidispersão

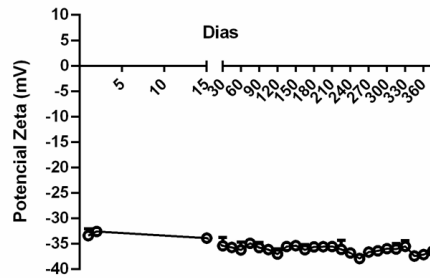
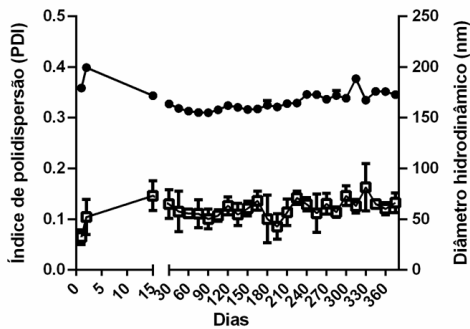
● Diâmetro hidrodinâmico

○ Potencial Zeta

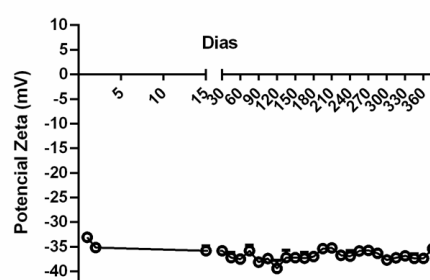
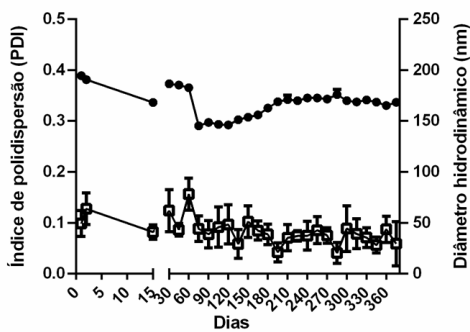
NCS-DOX (4°C)



NCS-DOX (T.A.)



NCS-DOX (37°C)



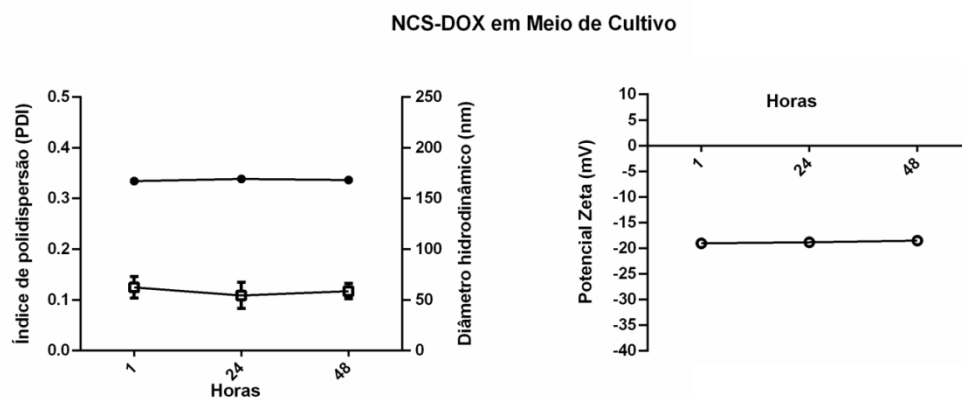


Figura 9. Diâmetro hidrodinâmico (DH - círculo cheio), índice de polidispersão (PDI - quadrado vazio) e potencial zeta (PZ - círculo vazio) das nanocápsulas NCS-DOX a 4 °C , temperatura ambiente (T.A.), 37 °C e em meio de cultivo. Os valores foram expressos como média ± erro padrão da média.

Tabela 6. Diâmetro hidrodinâmico (*z-average*) (DH), índice de polidispersão (PDI) e potencial zeta (PZ) das formulações NCS-DOX (nanocápsulas de selol contendo DOX) em meio de cultivo. Os valores foram expressos como média ± erro padrão da média.

Tempo (horas)	DH (nm)	PDI	PZ (mV)
1	167,2 ± 2,5	0,12 ± 0,017	-19,03 ± 0,679
24	169,3 ± 0,326	0,109 ± 0,020	-18,8 ± 0,496
48	168,1 ± 0,654	0,117 ± 0,012	-18,5 ± 0,616

6.1.2 Análise morfológica da NCS-DOX por microscopia eletrônica

As nanocápsulas NCS-DOX apresentaram forma esférica como visto por MEV e MET, e uma camada externa devido ao invólucro polimérico (figura 10).

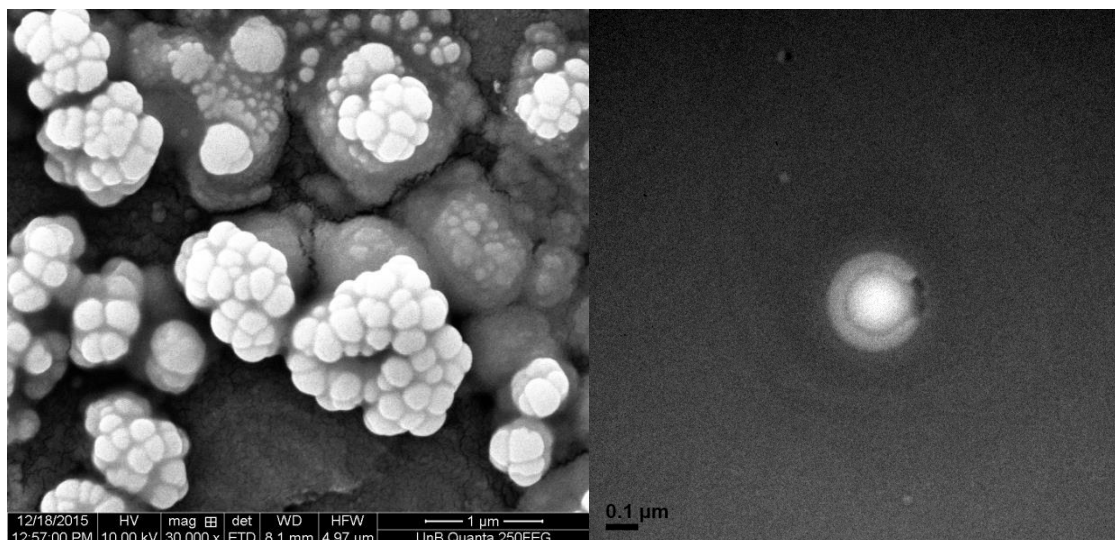


Figura 10. Morfologia das nanocápsulas de selol contendo doxorrubicina (NCS-DOX) avaliada por microscopia eletrônica de varredura (MEV) (à esquerda) e microscopia eletrônica de transmissão (MET) (à direita).

6.1.3 Perfil de liberação da doxorrubicina da NCS-DOX

Para a quantificação da DOX por CLAE, foi preparada uma curva de calibração, e a equação da reta foi obtida por análise de regressão linear. O coeficiente de correlação linear da curva analítica obtida foi de 0,995 (figura 11). O método mostrou-se adequado para o cloridrato de DOX, de acordo com a RE 899/2013 (ANVISA, 2003).

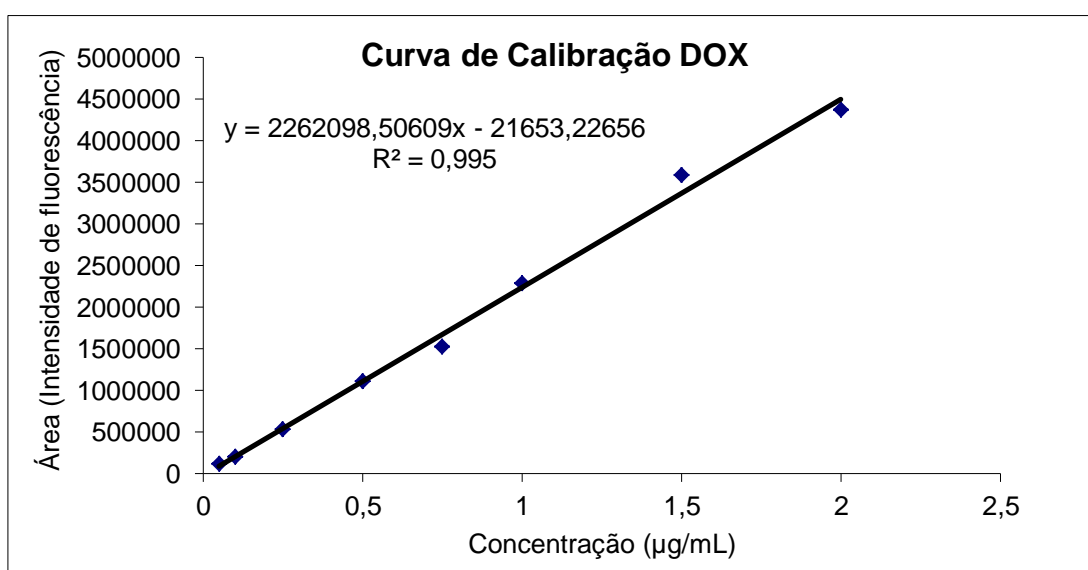


Figura 11. Curva de calibração da doxorrubicina (DOX).

O perfil de liberação da DOX a partir da NCS-DOX e de uma solução de DOX livre está representado graficamente na figura 12. No tempo de 5 minutos, houve liberação de 1,67% da DOX a partir da NCS-DOX, e o máximo de liberação ocorreu no tempo de 10 horas e 35 minutos (17,11% do máximo teórico). Este resultado indicou que a DOX está fortemente associada na nanocápsula. Na diálise de uma solução de DOX livre, 100% deste fármaco foi liberado do saco de diálise já em 2 horas e 35 minutos.

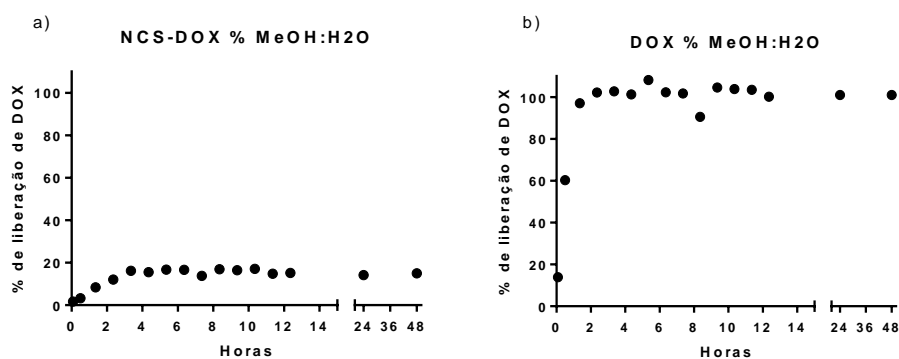


Figura 12. Perfil de liberação de doxorubicina (DOX) por meio do método de diálise em mistura de metanol e água (1:1, v:v). a) NCS-DOX (nanocápsulas de selol contendo doxorubicina) e b) DOX (doxorubicina). A DOX liberada no meio externo foi identificada através de cromatografia líquida de alta eficiência.

6.1.4 Espectroscopia de Transmitância na Região do Infravermelho (*FTIR*) e Espectroscopia Raman intensificada por superfície (*SERS*)

Nos espectros de infravermelho, para o Pol-DOX houve diminuição da intensidade do pico na região próxima a 3000 cm^{-1} em relação à DOX, este pico corresponde a vibrações de estiramento de $-\text{NH}_3^+$ da DOX (Guhagarkar et al., 2010). Este resultado sugere que o grupamento amino está desprotonado ou formou ligação covalente, do tipo amida, com o grupo anidrido do PVM/MA. Nesta mesma região não foi possível verificar diferenças no pico da NCS-DOX, pois o pico do selol ocorre nesta mesma região, mascarando o pico do Pol-DOX (figura 13).

Nos resultados de SERS, comparando o espectro de DOX com os espectros de NCS-DOX e Pol-DOX, foi possível observar a ocorrência de um pico na região de $1686 - 1683\text{ cm}^{-1}$ para NCS-DOX e POL-DOX, respectivamente, indicando possível surgimento de um novo

grupamento químico, provavelmente o grupamento amida (figura 14). Este pico não foi observado para as análises de PVM/MA (dados não mostrados).

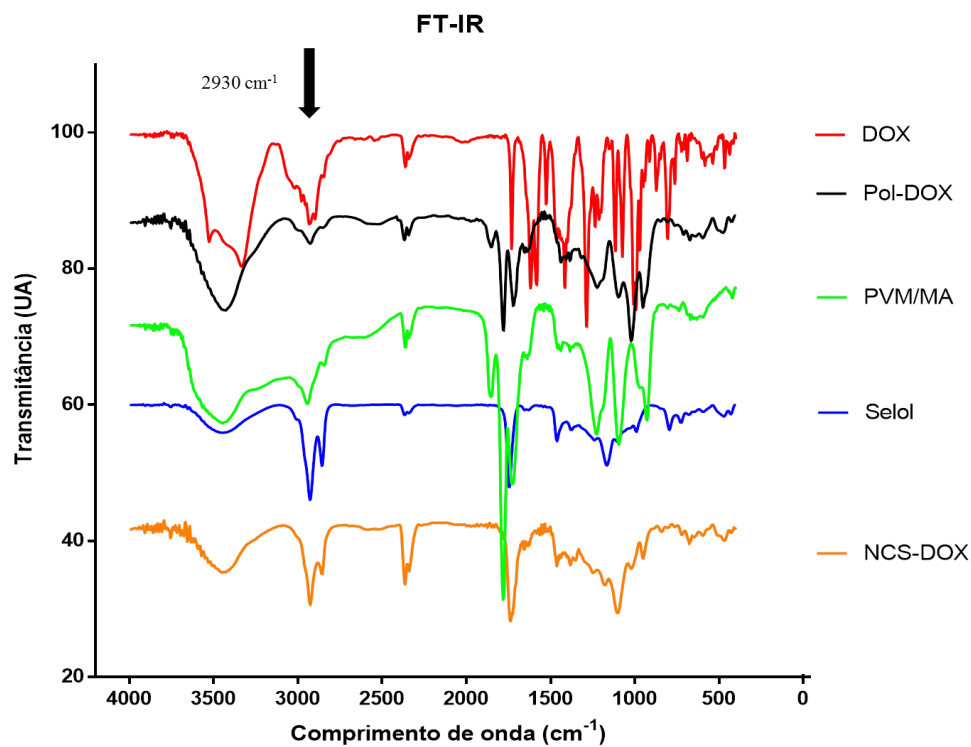


Figura 13. Espectros de infravermelho das amostras DOX (doxorubicina), Pol-DOX (produto da reação entre PVM/MA e doxorubicina), PVM/MA, Selol e NCS-DOX (nanocápsulas de selol contendo doxorubicina).

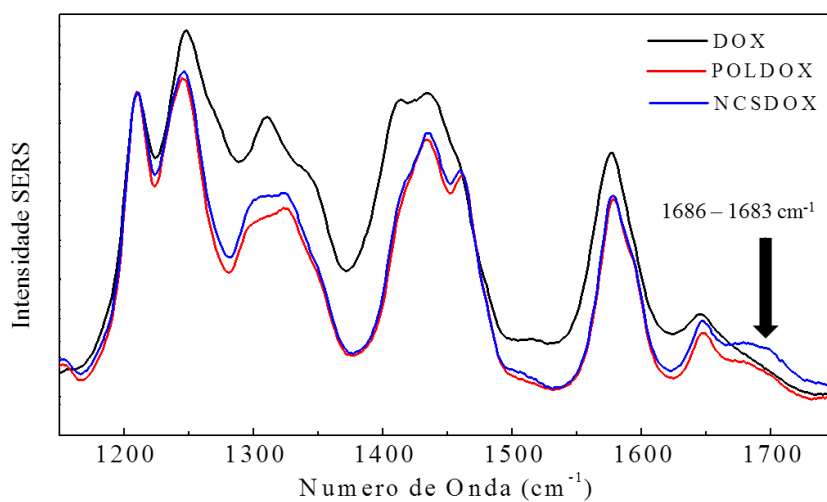
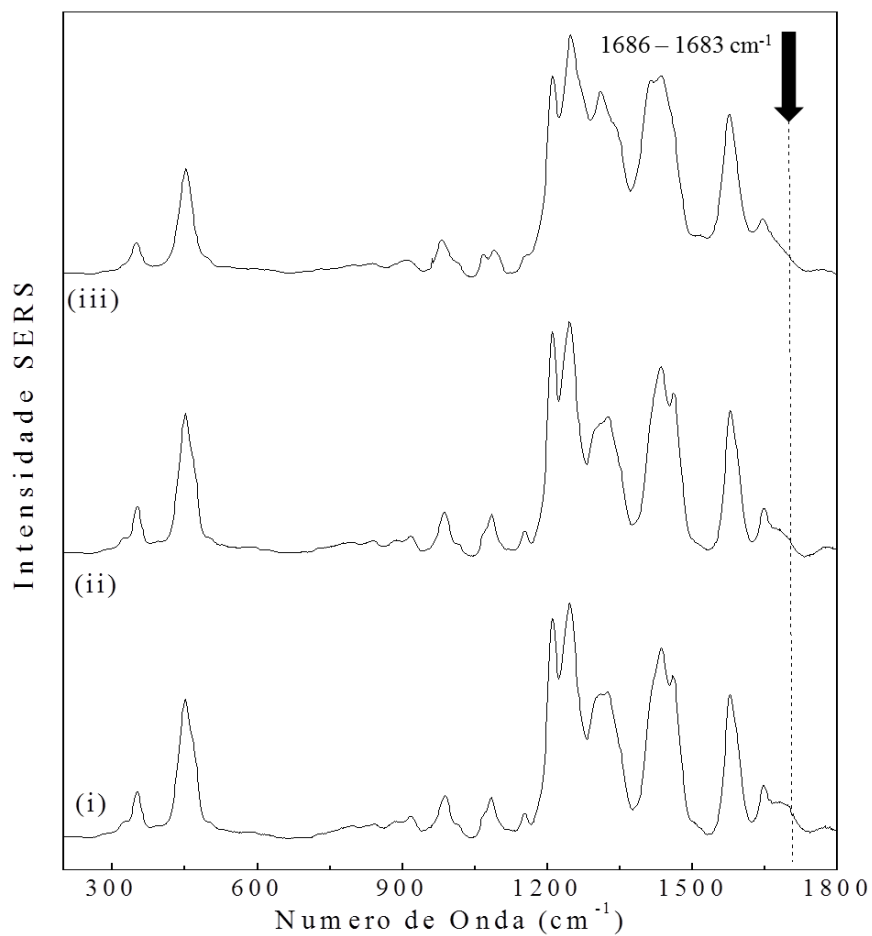


Figura 14. Espectros SERS das amostras (i) NCS-DOX (nanocápsulas de selo contendo doxorubicina), (ii) POLDOX (produto da reação entre PVM/MA e doxorubicina) e (iii) DOX (doxorubicina).

6.2 Avaliações em células *in vitro*

6.2.1 Redução da viabilidade varia entre os diferentes tipos celulares e tratamentos

Na linhagem 4T1, os tratamentos com NCS-DOX, Pol-DOX e DOX causaram significativa redução na viabilidade celular a partir da concentração de 0,1 μg DOX/mL ($p < 0,05$), sendo que para as concentrações de 1 μg DOX/mL a NCS-DOX foi o tratamento que provocou maior redução na viabilidade celular (para $34,4 \pm 3,4$ %) que os tratamentos Pol-DOX e DOX (para $46,5 \pm 2,4$ % e $58,7 \pm 1,7$ %, respectivamente) ($p < 0,05$). O resultado mostra também que o PVM/MA puro (Pol), nas concentrações testadas, não afetou a viabilidade das células estudadas e que as NCS reduziram a viabilidade celular somente na concentração de 216 μg selol/mL (para $66,3 \pm 3,8$ %) (Figura 15). Os valores de IC50 para NCS-DOX, Pol-DOX e DOX foram de 0,37; 0,42 e 0,71 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectivamente.

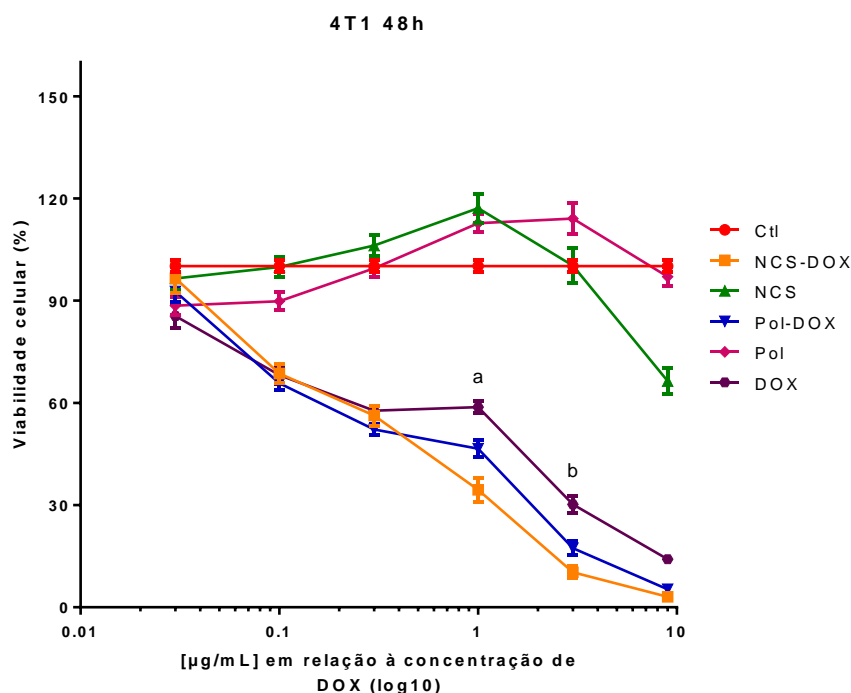


Figura 15. Viabilidade de células 4T1 após exposição à NCS-DOX (nanocápsulas de selol contendo DOX), NCS (nanocápsulas de selol), Pol-DOX (produto da reação entre PVM/MA e doxorubicina), Pol (PVM/MA), DOX (doxorubicina) e meio de cultivo (controle) por 48 horas. Dados expressos como média \pm erro padrão da média. a = $p < 0,05$ na comparação entre os tratamentos NCS-DOX, Pol-DOX e DOX na concentração de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$. b = $p < 0,05$ na comparação entre os tratamentos NCS-DOX e DOX na concentração de 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Análise estatística: ANOVA em duas vias e teste de múltiplas comparações de Tukey's.

Para as células normais (NIH-3T3), os tratamentos que mais reduziram a viabilidade celular também foram NCS-DOX, Pol-DOX e DOX. Foi possível observar pelo ensaio de MTT uma significativa redução da viabilidade celular a partir da concentração de 1 µg/mL para os tratamentos Pol-DOX e NCS-DOX. DOX mostrou-se mais tóxica na concentração de 3 µg/mL. E, nas outras concentrações testadas, NCS-DOX, Pol-DOX e DOX reduziram a viabilidade celular com a mesma intensidade. As células NIH-3T3 foram menos sensíveis a estes tratamentos do que as células tumorais 4T1. O tratamento somente com o polímero (Pol) não provocou redução na viabilidade celular, já as nanocápsulas NCS (nanocápsulas com selol) reduziram significativamente a viabilidade celular na maior concentração (216 µg/mL) (para $68,6 \pm 7,07\%$) (Figura 16). Os valores de IC₅₀ para NCS-DOX, Pol-DOX e DOX foram de 0,46; 0,46 e 0,81 µg/mL, respectivamente.

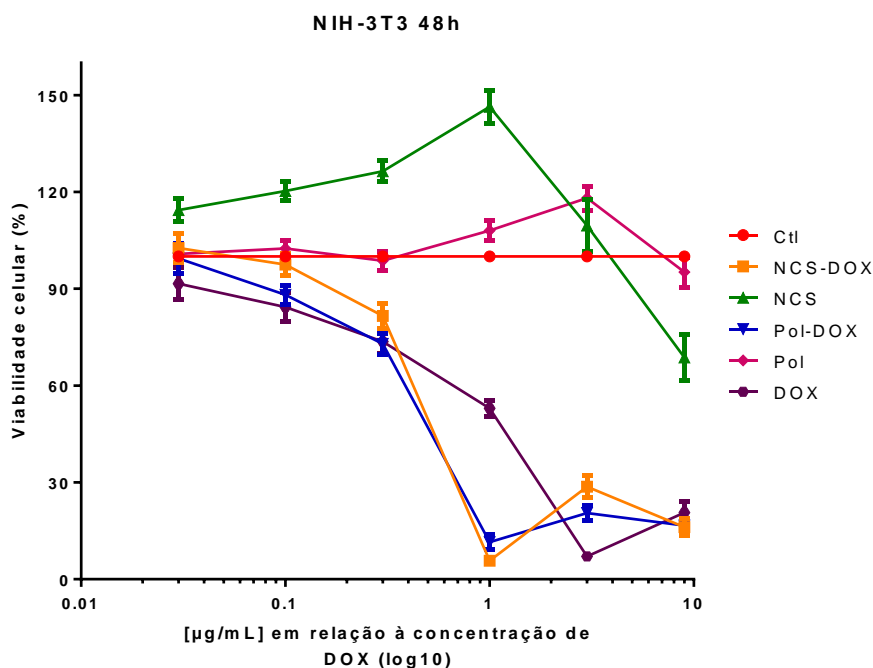


Figura 16. Viabilidade de células NIH-3T3 após exposição à NCS-DOX (nanocápsulas de selol contendo DOX), NCS (nanocápsulas de selol), Pol-DOX (produto da reação entre PVM/MA e doxorubicina), Pol (PVM/MA), DOX (doxorubicina) e meio de cultivo (controle) por 48 horas. Dados expressos como média \pm erro padrão da média. Análise estatística: ANOVA em duas vias e teste de múltiplas comparações de Tukey's.

O efeito do tensoativo utilizado nas formulações sobre a viabilidade das células 4T1 e NIH-3T3 também foi avaliado. Houve uma pequena redução na viabilidade das células 4T1 tratadas somente com o Tween 80 desde a concentração de 0,88 µg/mL (para $86,6 \pm 2,3\%$) à

concentração de 72 $\mu\text{g/mL}$ (para $85,1 \pm 2,6\%$) (figura 17). Porém, comparando a viabilidade das células tratadas com DOX e mistura de Tween 80 + DOX, foi possível verificar IC50 de 0,35 $\mu\text{g/mL}$ tanto para DOX quanto para Tween 80 + DOX, indicando que a redução da viabilidade celular é devida apenas à DOX. Nas células NIH-3T3 o Tween 80 não reduziu a viabilidade celular em relação ao controle, e a IC50 para DOX foi de 0,15 $\mu\text{g/mL}$, e de 0,16 $\mu\text{g/mL}$ para Tween 80 + DOX, indicando que a redução da viabilidade celular é devida à DOX (figura 18).

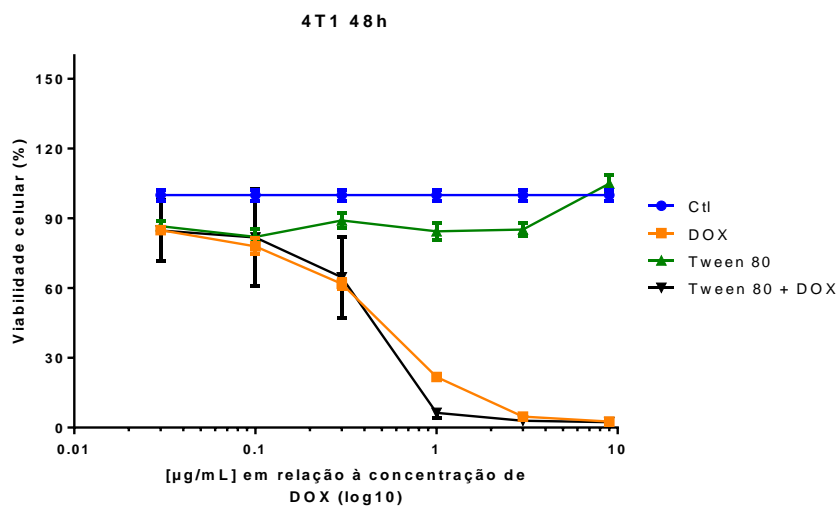


Figura 17. Viabilidade celular de 4T1 após exposição à DOX (doxorubicina livre), Tween 80, Tween 80 + DOX (mistura de Tween 80 e doxorubicina) e meio de cultivo (controle) por 48 horas. Dados expressos como média \pm erro padrão da média. Análise estatística: ANOVA em duas vias e teste de múltiplas comparações de Tukey's.

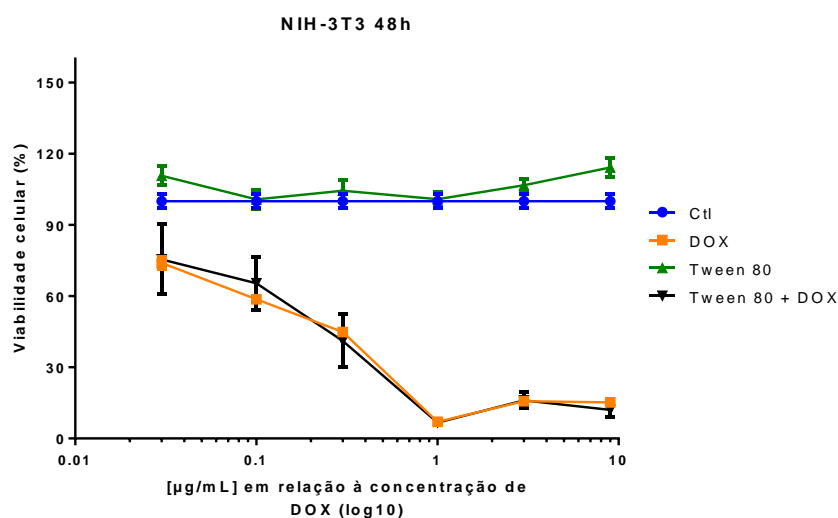


Figura 18. Viabilidade celular de NIH-3T3 após exposição à DOX (doxorubicina livre), Tween 80, Tween 80 + DOX (mistura de Tween 80 e doxorubicina) e meio de cultivo (controle) por 48 horas. Dados expressos como média \pm erro padrão da média. Análise estatística: ANOVA em duas vias e teste de múltiplas comparações de Tukey's.

6.2.2 Morfologia e confluência celular são alteradas por NCS-DOX e DOX

Por microscopia de luz foi possível observar que, para as células 4T1 e NIH-3T3 expostas aos tratamentos, houve alteração do padrão morfológico das células quando comparadas aos seus controles (figura 19 e 20). Também foi possível observar que para a linhagem celular 4T1 os tratamentos causaram aumento celular (figura 19). Houve ainda redução da confluência celular, vista nas duas concentrações dos tratamentos de NCS-DOX e DOX (0,1 e 3 $\mu\text{g/mL}$ de DOX e 72 $\mu\text{g/mL}$ e 2,66 $\mu\text{g/mL}$ de selol na NSC-DOX) após 48 horas, sendo que a maior concentração foi a que mais reduziu a confluência.

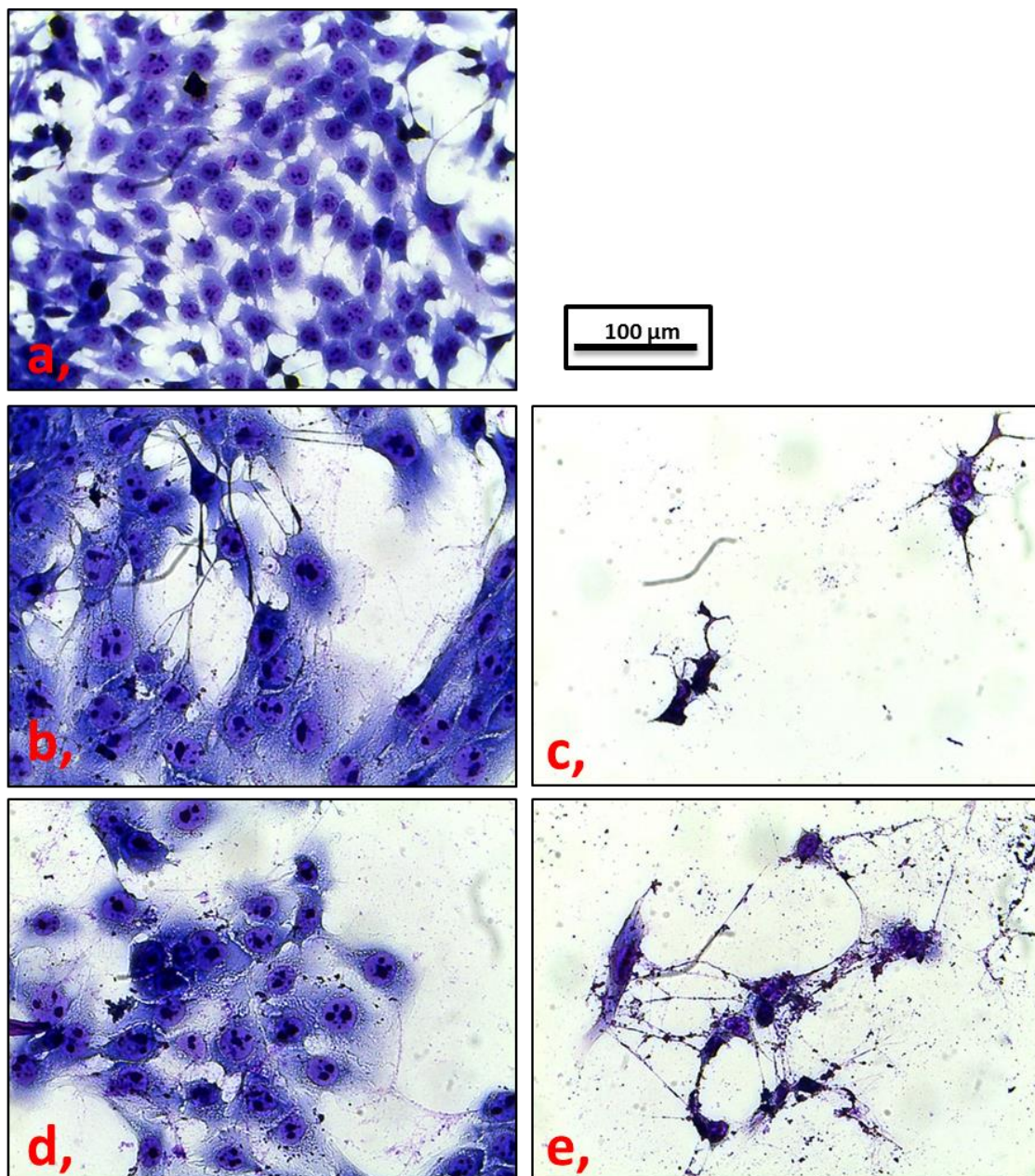


Figura 19. Morfologia das células 4T1 coradas com Giemsa. Controle (meio de cultivo) (a), doxorubicina 0,1 µg/mL (b), doxorubicina 3,0 µg/mL (c), NCS-DOX (nanocápsulas de selol contendo doxorubicina) 0,1 µg/mL (d) e NCS-DOX (nanocápsulas de selol contendo doxorubicina) 3,0 µg/mL (e).

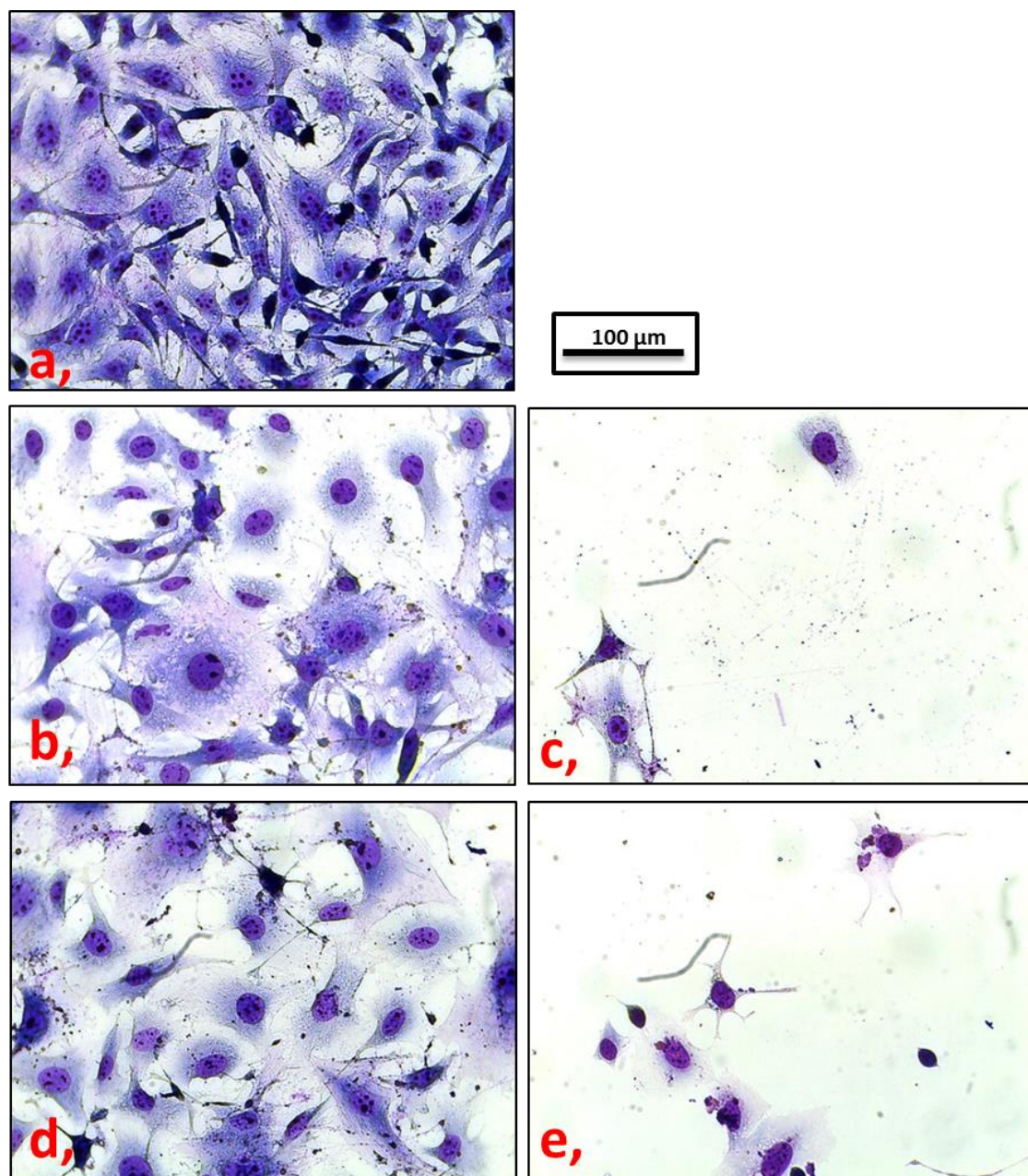


Figura 20. Morfologia de células NIH-3T3 coradas com Giemsa. Controle (meio de cultivo) (a), doxorubicina 0,1 µg/mL (b), doxorubicina 3,0 µg/mL (c), NCS-DOX (nanocápsulas de selol contendo doxorubicina) 0,1 µg/mL (d) e NCS-DOX (nanocápsulas de selol contendo doxorubicina) 3,0 µg/mL (e).

6.2.3 NCS-DOX causa maior redução no índice de adesão celular em tempo real

Para complementar os resultados de viabilidade celular, obtidos através do ensaio de MTT, foi realizado o monitoramento do índice de adesão celular (ou índice celular) em tempo real com as células 4T1 e NIH-3T3. O índice celular é diretamente proporcional à quantidade de células aderidas ao fundo da placa de cultivo.

Nas células 4T1 foi possível observar alterações no índice celular em comparação ao grupo controle. Aproximadamente 12 horas após o tratamento – correspondente ao ponto de 36 horas no gráfico – ocorreu aumento no índice celular e, após 18 horas – correspondente ao ponto de 42 horas no gráfico – ocorreu redução no índice celular que se tornou mais expressiva nos tempos maiores. O tratamento que mais reduziu o índice celular foi o NCS-DOX, principalmente entre 24 e 36 horas após o tratamento – correspondente a 48 e 60 horas no gráfico. Pol-DOX e DOX reduziram o índice celular da mesma forma. Pol não alterou o índice celular, e com o tratamento NCS houve aumento do índice celular. Após 80 horas de análise as células morreram por confluência (figura 21).

Nas células NIH-3T3 também foi observado um aumento do índice celular após 12 horas de tratamento – correspondente ao ponto de 36 horas no gráfico. Após 18 horas de tratamento – correspondente ao ponto de 42 horas no gráfico – ocorreu redução no índice celular, que se tornou mais expressivo nos tempos maiores chegando ao valor 0 (zero) antes de 48 horas. O tratamento que mais reduziu o índice celular foi o NCS-DOX, reduzindo de forma drástica nos tempos de 12 a 24 horas após o tratamento – correspondente a 36 a 48 horas no gráfico. Pol-DOX e DOX reduziram o índice celular da mesma forma. Pol não alterou o índice celular, e com o tratamento com NCS pode-se observar aumento do índice celular. Em 97 horas de análise não foi possível observar morte por confluência (figura 21).

As alterações no índice celular das duas linhagens foram semelhantes. As células 4T1 possuem maior índice celular do que as células NIH-3T3, provavelmente por apresentarem maior taxa de proliferação celular.

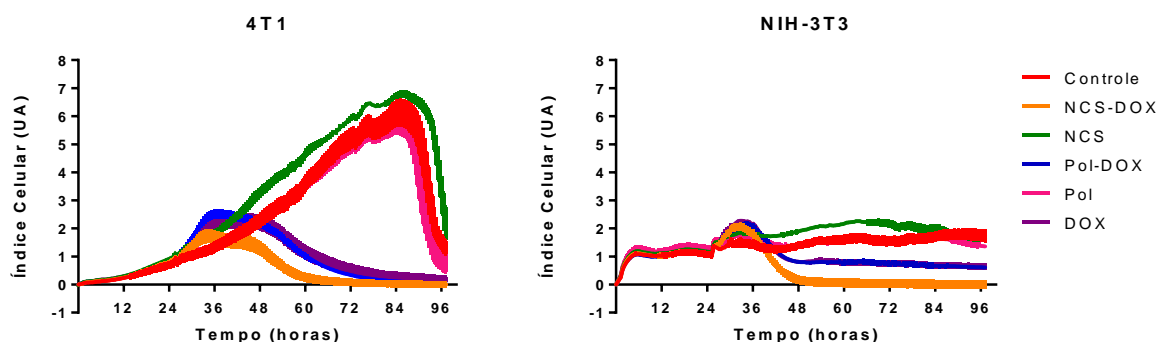


Figura 21. Índices de adesão celular em tempo real das células NIH-3T3 e 4T1. Grupos: controle (meio de cultivo) e tratadas com NCS-DOX (nanocápsulas de selol contendo doxorubicina), NCS (nanocápsulas de selol), Pol-DOX (produto da reação entre PVM/MA e doxorubicina), Pol (PVM/MA) e DOX (doxorubicina) nas concentrações equivalentes a 1 μ g DOX/mL durante 97 horas de monitoramento. Dados expressos como média \pm erro padrão da média.

6.2.4 Pol-DOX e NCS-DOX apresentam maior interiorização por células 4T1

A interiorização de NCS-DOX, Pol-DOX e DOX por células 4T1 foi analisada após incubação por 0,25; 0,5; 1 e 3 horas. O sinal de fluorescência da DOX intracelular medido em citômetro de fluxo foi usado como parâmetro para avaliar este evento. Nos tempos de 0,25 e 0,5 hora não houve diferença significativa na interiorização de NCS-DOX e DOX, e o composto mais interiorizado pelas células nestes tempos foi Pol-DOX ($p < 0,05$). Nos tempos de 1 e 3, horas Pol-DOX continuou sendo o tratamento de maior interiorização seguido de NCS-DOX e posteriormente DOX ($p < 0,05$). Para todos os tempos o sinal do controle foi muito baixo, considerado nulo, já que este não tem presente a DOX (figura 22).

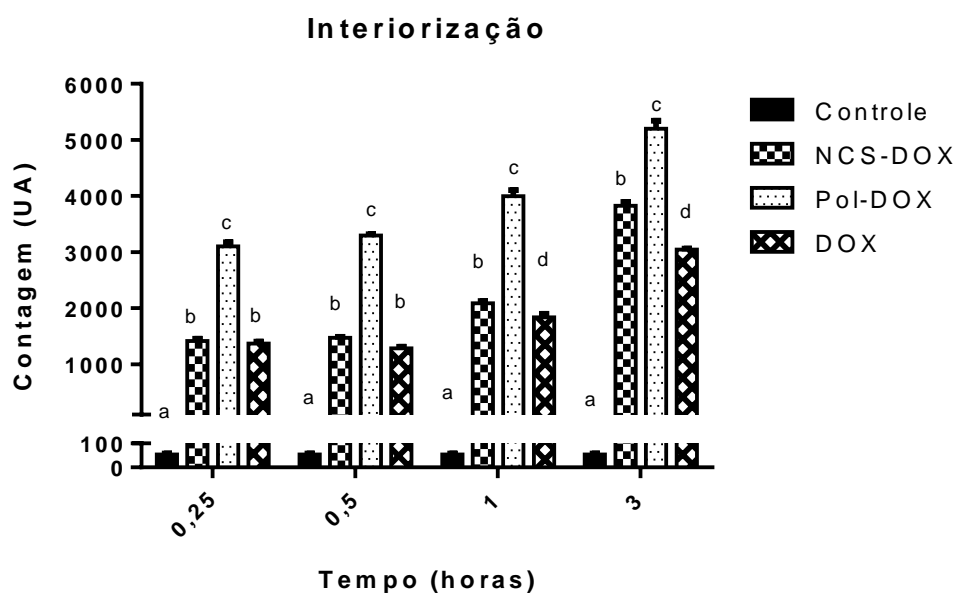


Figura 22. Ensaio de interiorização de NCS-DOX (nanocápsulas de selol contendo DOX), Pol-DOX (produto da reação entre PVM/MA e doxorrubicina), DOX (doxorrubicina) e meio de cultivo (controle) por células 4T1 em diferentes tempos de exposição. Dados expressos como média \pm erro padrão da média. a, b, c e d = $p < 0,05$ na comparação entre os tratamentos controle, NCS-DOX, Pol-DOX e DOX no mesmo tempo. Análise estatística: ANOVA em duas vias e teste de múltiplas comparações de Tukey's.

6.2.5 NCS-DOX e Pol-DOX são interiorizados por vias ativas

Para investigação dos mecanismos de endocitose envolvidos na interiorização dos tratamentos pelas células 4T1, foram utilizados inibidores de diferentes vias endocíticas. Para os três diferentes tipos de tratamentos – NCS-DOS, Pol-DOX e DOX – foram usados os respectivos controles sem inibidores. Apenas a interiorização da DOX foi significativamente reduzida pelo inibidor citocalasina. Na presença do inibidor nistatina e azida sódica houve redução da interiorização de todos os tratamentos ($p < 0,05$). Amilorida e filipina não reduziram significativamente a interiorização dos tratamentos (figura 23).

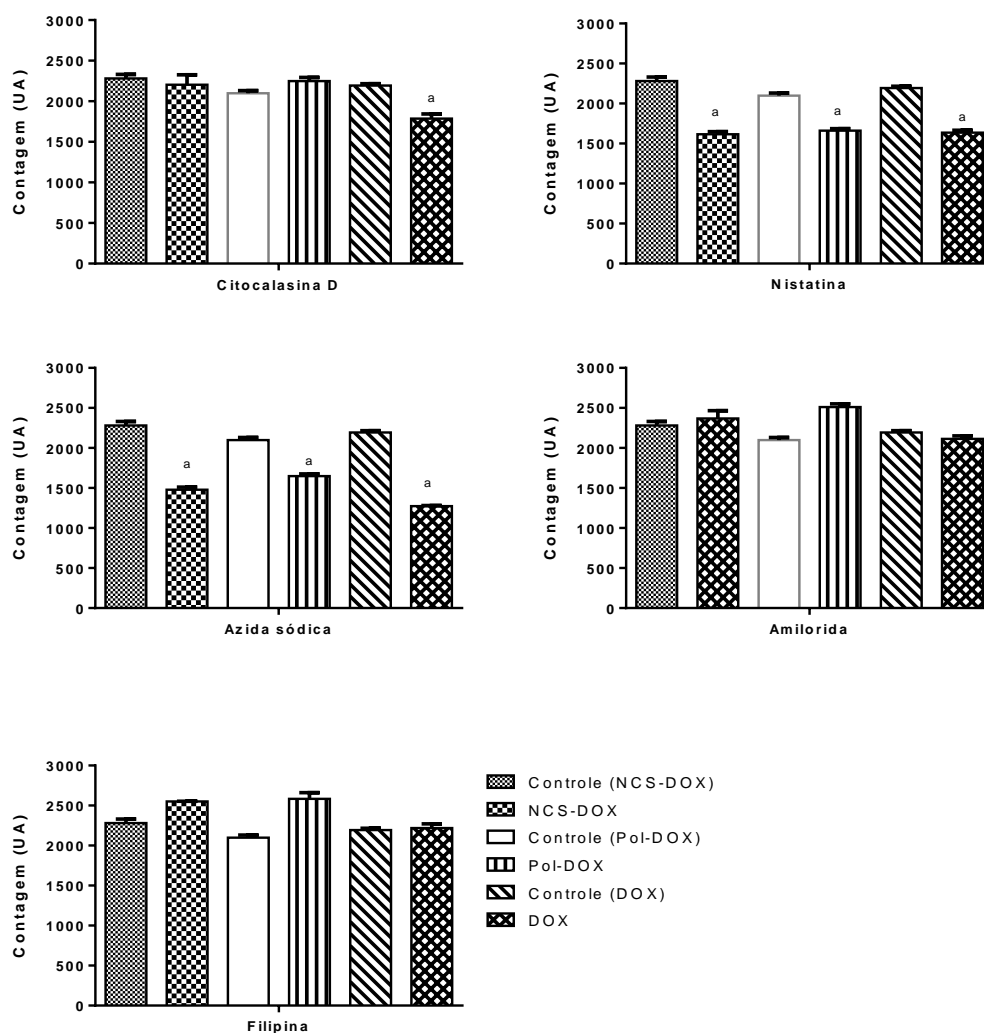


Figura 23. Efeito da inibição de vias de endocitose em células 4T1 sobre a interiorização de NCS-DOX (nanocápsulas com selol contendo DOX), Pol-DOX (produto da reação entre PVM/MA e doxorubicina) e DOX (doxorubicina) por 3 horas. Dados expressos como média \pm erro padrão da média. a = $p < 0,05$ na comparação entre os controles de cada um dos tratamentos. Análise estatística: ANOVA em uma via e teste de múltiplas comparações de Tukey's.

6.2.6 NCS-DOX causa maior fragmentação de DNA do que DOX

Fragmentação de DNA foi detectada somente após 48 horas de tratamento (NCS-DOX, Pol-DOX e DOX) ($p < 0,05$). Em 24 horas, as diferenças nos valores de fragmentação de DNA entre os grupos não foram estatisticamente significativas. Em 48 horas houve $50,2\% \pm 2,6$ de fragmentação de DNA causada por NCS-DOX. A fragmentação causada por Pol-DOX e DOX também foi estatisticamente diferente do controle, sendo de $29,2\% \pm 1,2$ e $23,1\% \pm 3,1$, respectivamente (figura 24, 25 e 26).

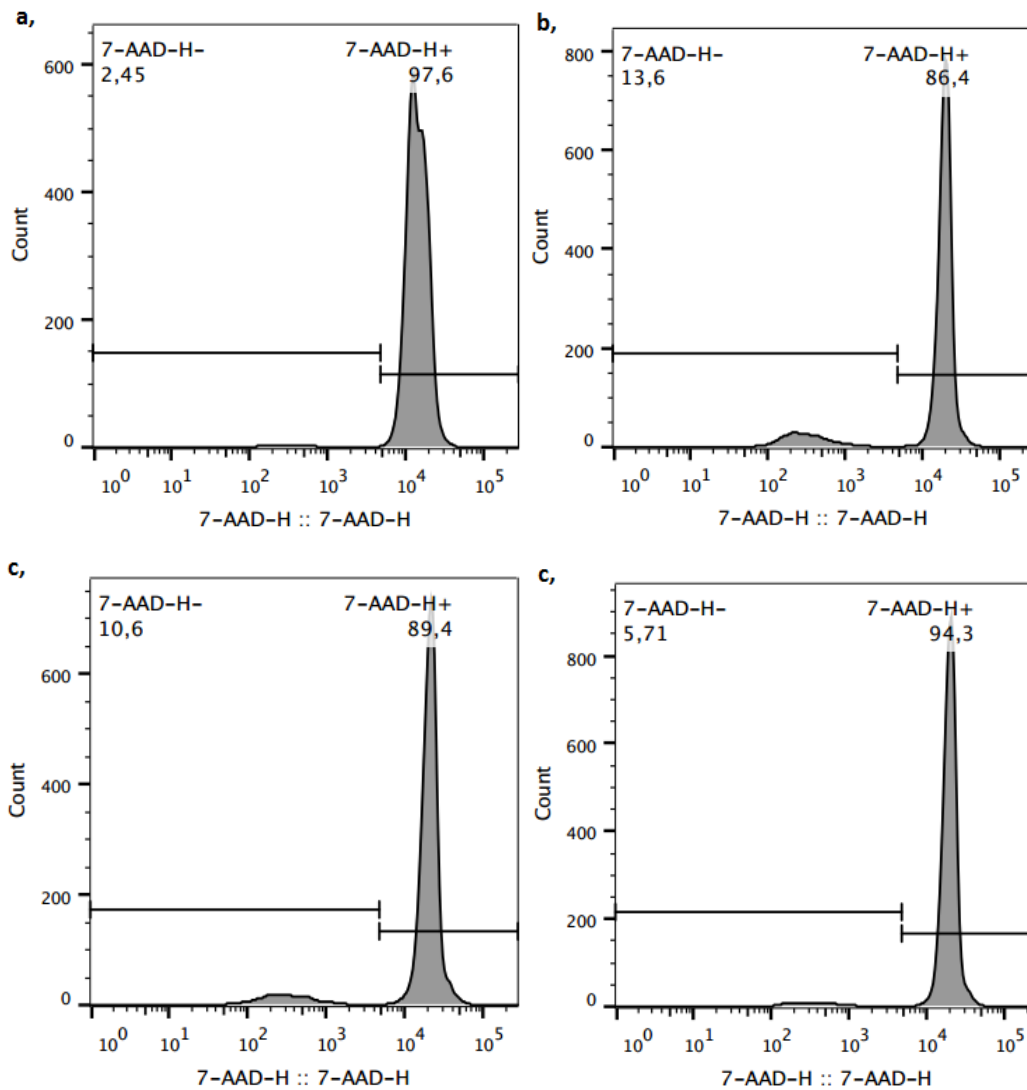


Figura 24. Histogramas de fragmentação de DNA em células 4T1 após exposição à DOX (doxorubicina), NCS-DOX (nanocápsulas com selol contendo DOX), Pol-DOX (produto da reação entre PVM/MA e doxorubicina) e controle (meio de cultivo) por 24 horas. a, controle. b, DOX. c, NCS-DOX. d, Pol-DOX. Imagens escolhidas de somente uma amostra das triplicatas.

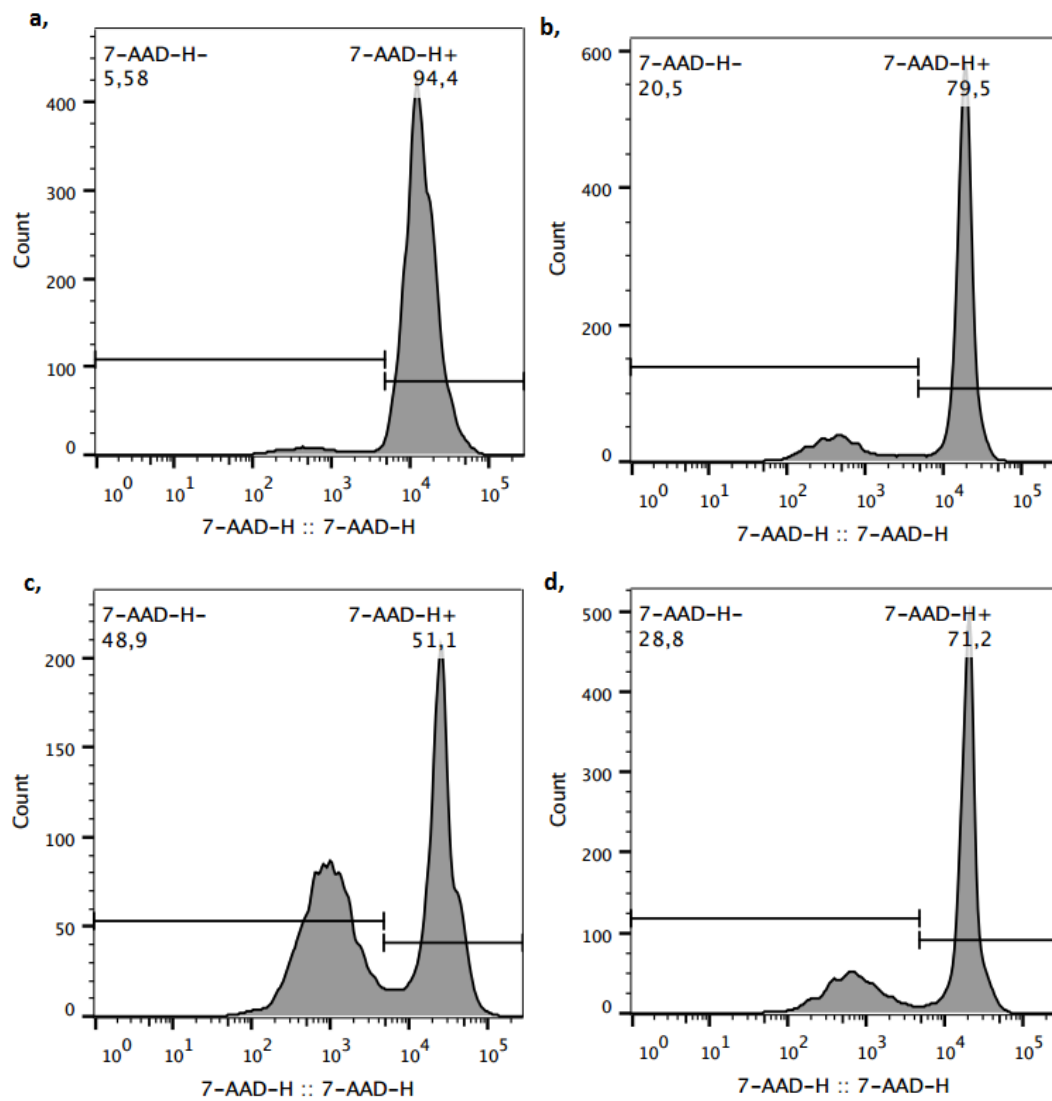


Figura 25. Histogramas de fragmentação de DNA em células 4T1 após exposição à DOX (doxorubicina), NCS-DOX (nanocápsulas com selo contendo DOX), Pol-DOX (produto da reação entre PVM/MA e doxorubicina) e controle (meio de cultivo) por 48 horas. a, controle. b, DOX. c, NCS-DOX. d, Pol-DOX. Imagens escolhidas de somente uma amostra das triplicatas.

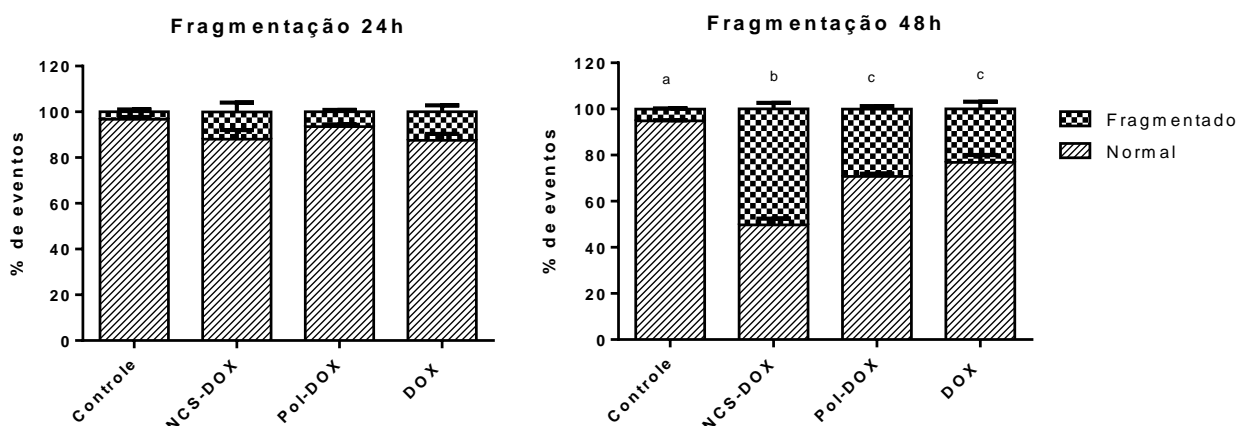


Figura 26. Fragmentação de DNA em células 4T1 após exposição à DOX (doxorubicina), NCS-DOX (nanocápsulas com selol contendo DOX), Pol-DOX (produto da reação entre PVM/MA e doxorubicina) e controle (meio de cultivo), por 24 ou 48 horas. Dados expressos como média \pm erro padrão da média. Letras diferentes sobre as colunas em um mesmo gráfico indicam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$). Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos no tempo de 24 horas. Análise estatística: ANOVA em duas vias e teste de múltiplas comparações de Tukey's.

6.2.7 NCS-DOX e DOX causam exposição de fosfatidilserina

NCS-DOX, Pol-DOX e DOX podem ter induzido apoptose inicial, revelada pela exposição da fosfatidilserina na face externa da membrana plasmática (quadrante Q3 – anexina V+), em $13,9\% \pm 0,7$, $11,4\% \pm 0,6$ e $15,6\% \pm 0,2$, respectivamente, após 48 horas de tratamento ($p < 0,05$ vs controle). A integridade da membrana (quadrante Q1 – 7AAD+) não foi danificada por nenhum dos tratamentos nas células 4T1, em relação ao grupo controle. Apoptose tardia (quadrante Q2 – anexina V+/7AAD+) foi observada em células tratadas com NCS-DOX e DOX, mas em uma discreta porcentagem de células 4T1 ($7,7\% \pm 0,2$ e $7,1\% \pm 0,5$, respectivamente). No quadrante Q4 é possível observar discreta redução na quantidade de células 4T1 normais nas populações tratadas com NCS-DOX, Pol-DOX e DOX em relação ao grupo controle, sendo que NCS-DOX e DOX causaram maior redução ($p < 0,05$) (figura 27 e 28).

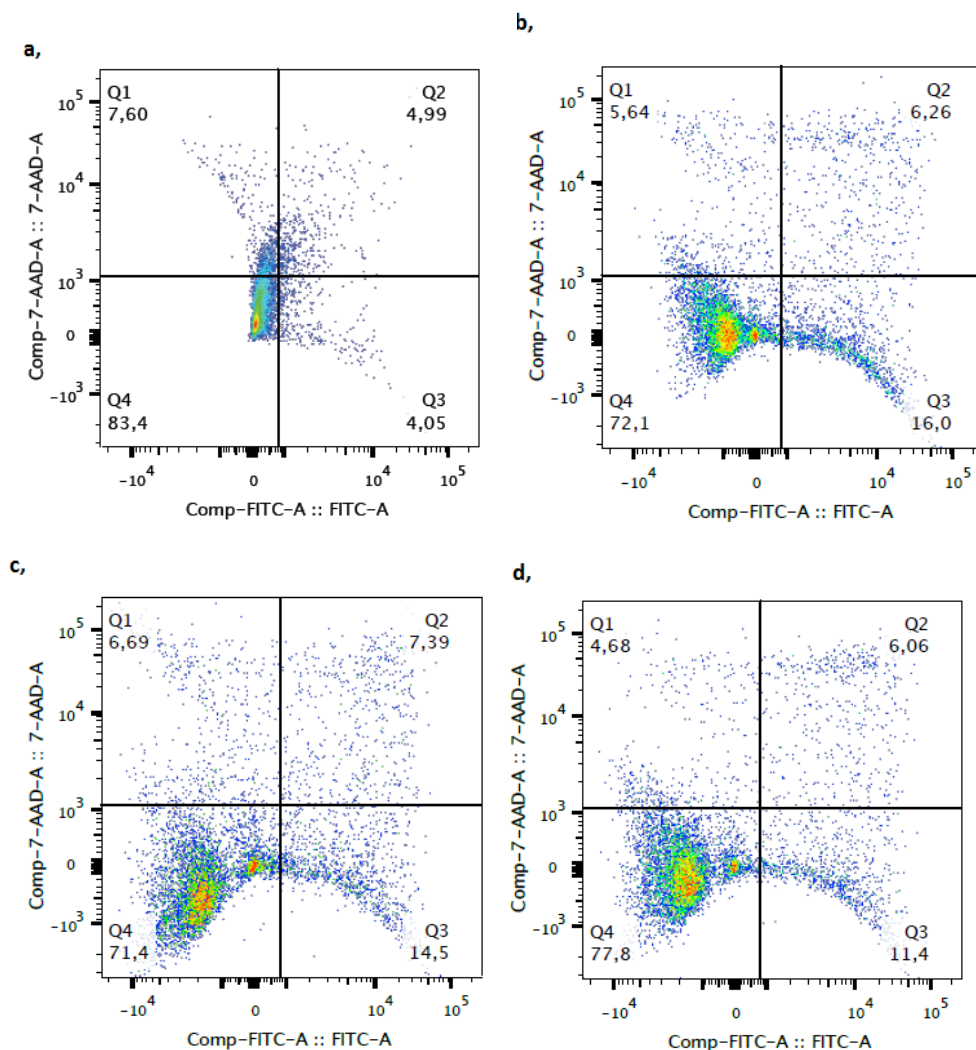


Figura 27. Influência dos tratamentos com DOX (doxorubicina), NCS-DOX (nanocápsulas com selol contendo DOX), Pol-DOX (produto da reação entre PVM/MA e doxorubicina) e meio de cultivo (controle) por 48 horas, em células 4T1, sobre a integridade de membrana plasmática (quadrante Q1 – 7AAD+), indução de apoptose tardia (quadrante Q2 – anexina V+/7AAD+), exposição da fosfatidilserina na face externa da membrana plasmática (quadrante Q3 – anexina V+); e células que não sofreram estes eventos (quadrante Q4 – duplo negativo). a, controle. b, DOX. c, NCS-DOX. d, Pol-DOX. Imagens escolhidas de somente uma amostra das triplicatas.

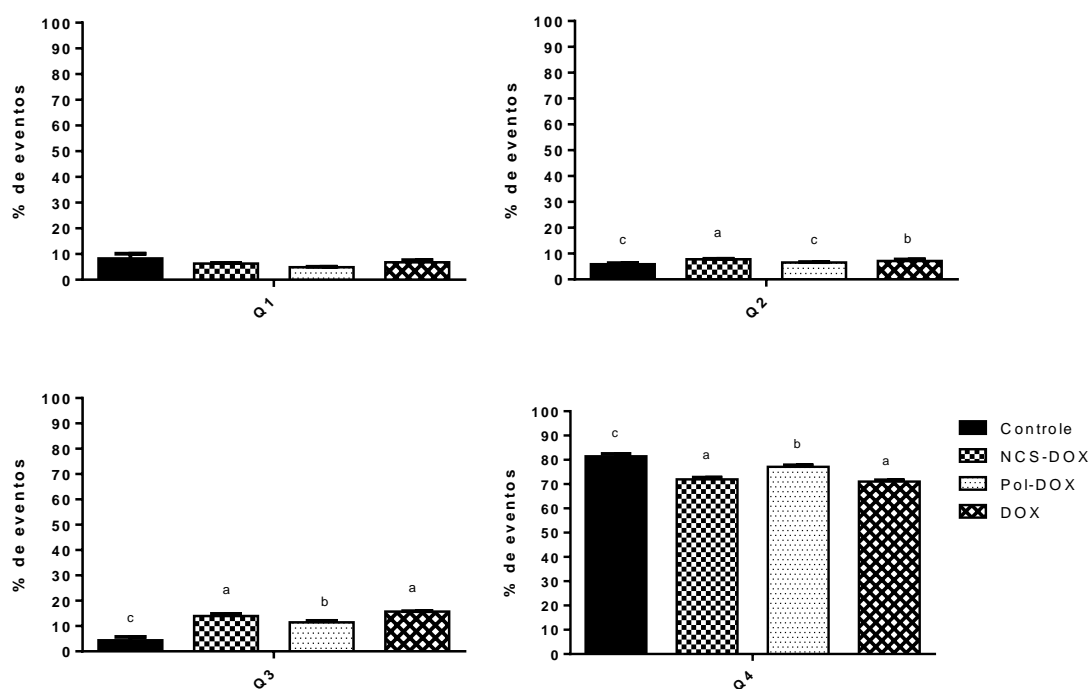


Figura 28. Influência dos tratamentos com DOX (doxorubicina), NCS-DOX (nanocápsulas de selol contendo DOX), Pol-DOX (produto da reação entre PVM/MA e doxorubicina) e meio de cultivo (controle) por 48 horas, em células 4T1, sobre a integridade de membrana plasmática (quadrante Q1 – 7AAD+), indução de apoptose tardia (quadrante Q2 – anexina V+/7AAD+), exposição da fosfatidilserina na face externa da membrana plasmática (quadrante Q3 – anexina V+); e células que não sofreram estes eventos (quadrante Q4 – duplo negativo). Dados expressos como média \pm erro padrão da média. Letras diferentes sobre as colunas em um mesmo gráfico indicam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$). Análise estatística: ANOVA em uma via e teste de múltiplas comparações de Tukey's.

6.2.8 Alterações na morfologia celular

As células 4T1 foram avaliadas quanto às diferenças em relação a seu tamanho e granulosidade, após serem tratadas com NCS-DOX, Pol-DOX e DOX por 24 e 48 horas. Nos gráficos adquiridos, as células com morfologia normal – observadas no grupo controle – permaneceram no quadrante 3 (Q3). O quadrante Q1 indica células com aumento na granulosidade e diminuição de tamanho celular. O quadrante Q2 indica aumento na granulosidade celular, e o quadrante Q4 indica diminuição na granulosidade e tamanho celular (debris).

Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas nas células no quadrante Q1 após 24 horas de tratamento. No quadrante Q2, após 24 horas de tratamento, a DOX induziu um aumento da granulosidade nas células ($51,6\% \pm 0,1$; $p < 0,05$). Não foi possível identificar aumento de tamanho quando realizada comparação com o grupo controle (figura 29 e 30). A quantidade de células no quadrante Q3 (células com morfologia normal) foi reduzida significativamente pelo tratamento com DOX por 24 horas ($28,2\% \pm 0,2$ do total de células, $p < 0,05$). Os tratamentos com NCS-DOX e DOX promoveram um aumento do número de células no quadrante Q4, indicando diminuição no tamanho celular ou a formação de debris celulares ($19,8\% \pm 1,4$ e $19,6\% \pm 0,2$, $p < 0,05$) (figura 29 e 30).

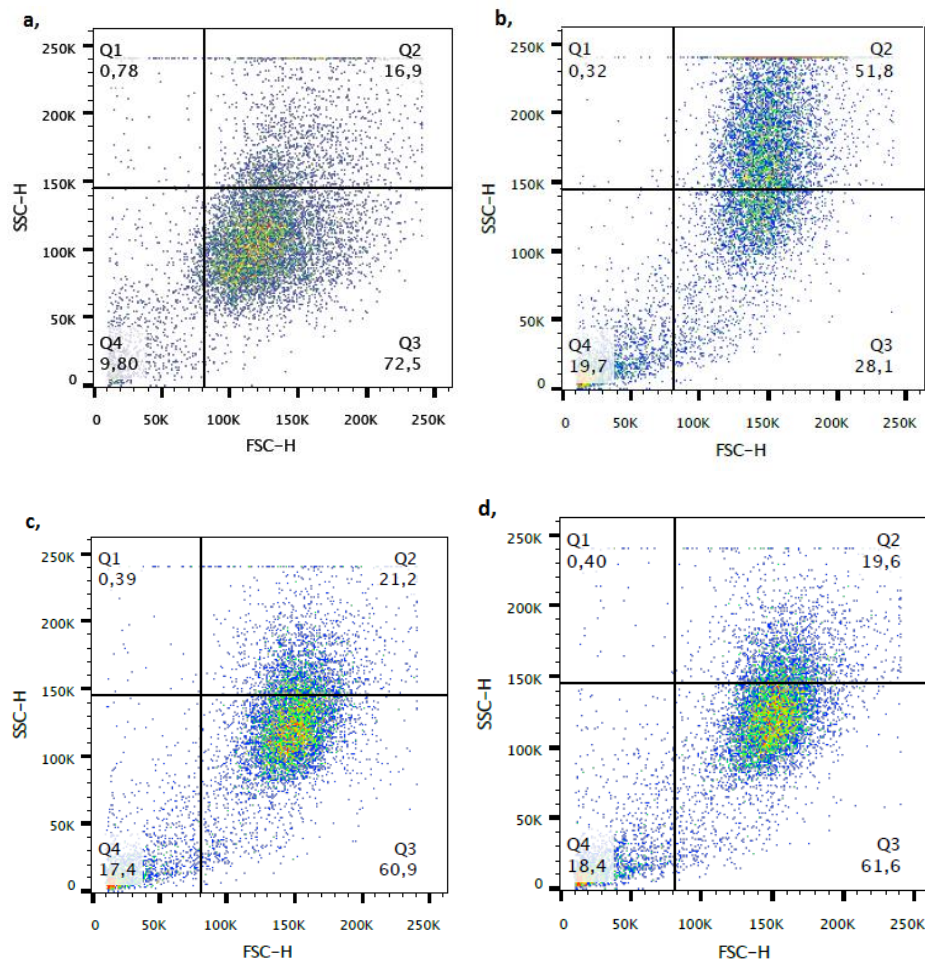


Figura 29. Influência dos tratamentos NCS-DOX (nanocápsulas com selol contendo DOX), Pol-DOX (produto da reação entre PVM/MA e doxorrubicina), DOX (doxorrubicina) e controle (meio de cultivo) na morfologia de células 4T1 por 24 horas. Células com diminuição de tamanho e aumento de granulosidade: Q1. Células com aumento de granulosidade: Q2. Células normais: Q3. Células com diminuição de tamanho e granulosidade: Q4. a, controle. b, DOX. c, NCS-DOX. d, Pol-DOX. Imagens escolhidas de somente uma amostra das triplicatas.

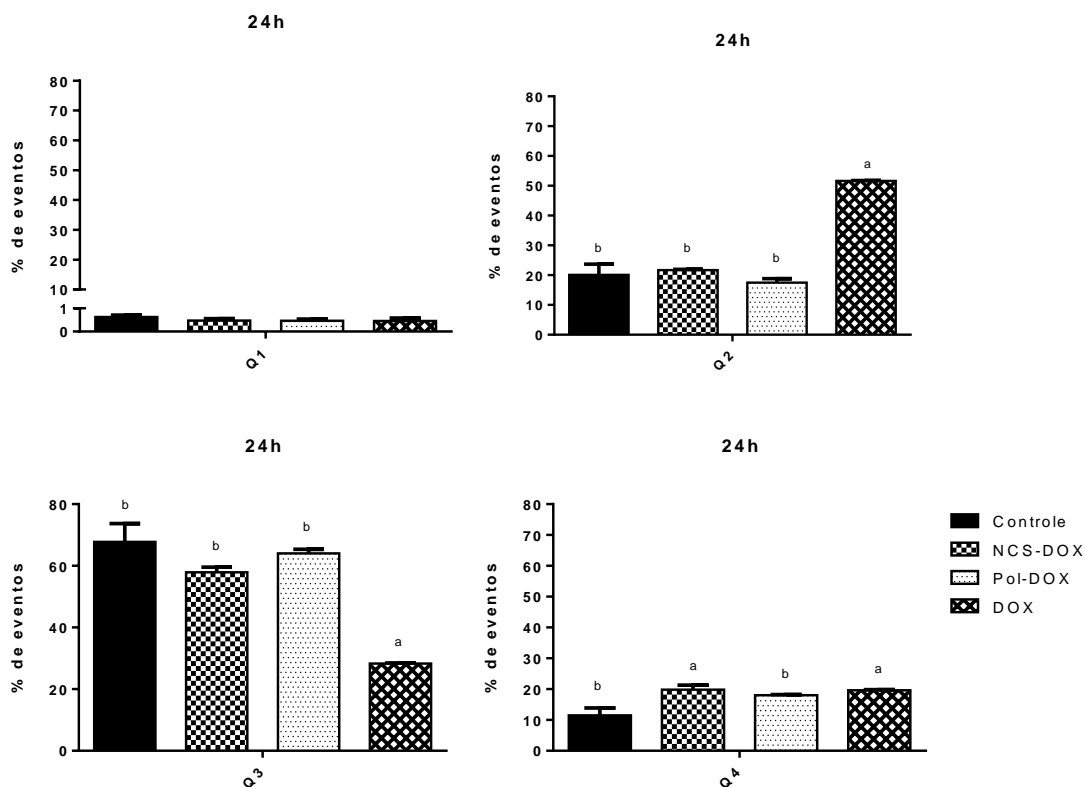


Figura 30. Influência dos tratamentos NCS-DOX (nanocápsulas de selol contendo DOX), Pol-DOX (produto da reação entre PVM/MA e doxorrubicina), DOX (doxorrubicina) e meio de cultivo (controle) na morfologia de células 4T1 por 24 horas. Q1: Células com diminuição de tamanho e aumento de granulosidade. Q2: Células com aumento de granulosidade. Q3: Células normais. Q4: Células com diminuição de tamanho e granulosidade. Dados expressos como média \pm erro padrão da média. Letras diferentes sobre as colunas em um mesmo gráfico indicam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$). Análise estatística: ANOVA em uma via e teste de múltiplas comparações de Tukey's.

Estas mesmas análises também foram feitas após 48 horas de tratamento. Houve um discreto aumento na porcentagem de células com maior granulosidade e diminuição de tamanho no grupo tratado com Pol-DOX e DOX ($0,6\% \pm 0,09$ e $0,5\% \pm 0,04$, respectivamente; $p < 0,05$). No quadrante Q2 é possível observar que as células 4T1 tratadas com NCS-DOX, Pol-DOX e DOX apresentaram aumento na granulosidade ($19,9\% \pm 1,4$; $21,3\% \pm 3,3$ e $36,7\% \pm 1,6$, respectivamente – figuras 31 e 32). Foi ainda observada uma redução na porcentagem de células com morfologia normal (Q3) após os tratamentos NCS-DOX, Pol-DOX e DOX ($24,4\% \pm 1,6$, $25,1\% \pm 0,4$ e $17,9\% \pm 0,3$, respectivamente; $p < 0,05$). Os grupos tratados com NCS-DOX, Pol-DOX e DOX também demonstraram diminuição do

tamanho celular (Q4), provavelmente refletindo um aumento na proporção de debris celulares, para $55,2\% \pm 1,5$; $52,9\% \pm 3,1$ e $44,7\% \pm 1,8$, respectivamente (figuras 31 e 32).

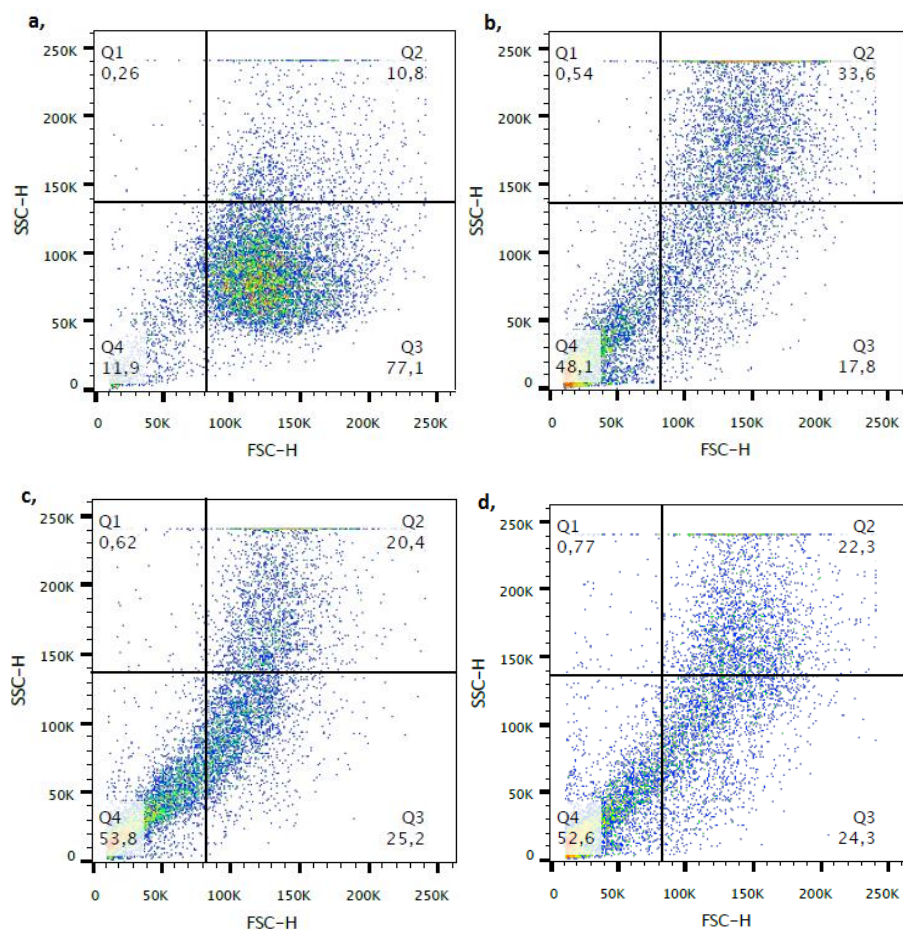


Figura 31. Influência dos tratamentos NCS-DOX (nanocápsulas com selol contendo DOX), Pol-DOX (produto da reação entre PVM/MA e doxorrubicina), DOX (doxorrubicina) e controle (meio de cultivo) na morfologia de células 4T1 por 48 horas. Células com diminuição de tamanho e aumento de granulosidade: Q1. Células com aumento de granulosidade: Q2. Células normais: Q3. Células com diminuição de tamanho e granulosidade: Q4. a, controle. b, DOX. c, NCS-DOX. d, Pol-DOX. Imagens escolhidas de somente uma amostra das triplicatas.

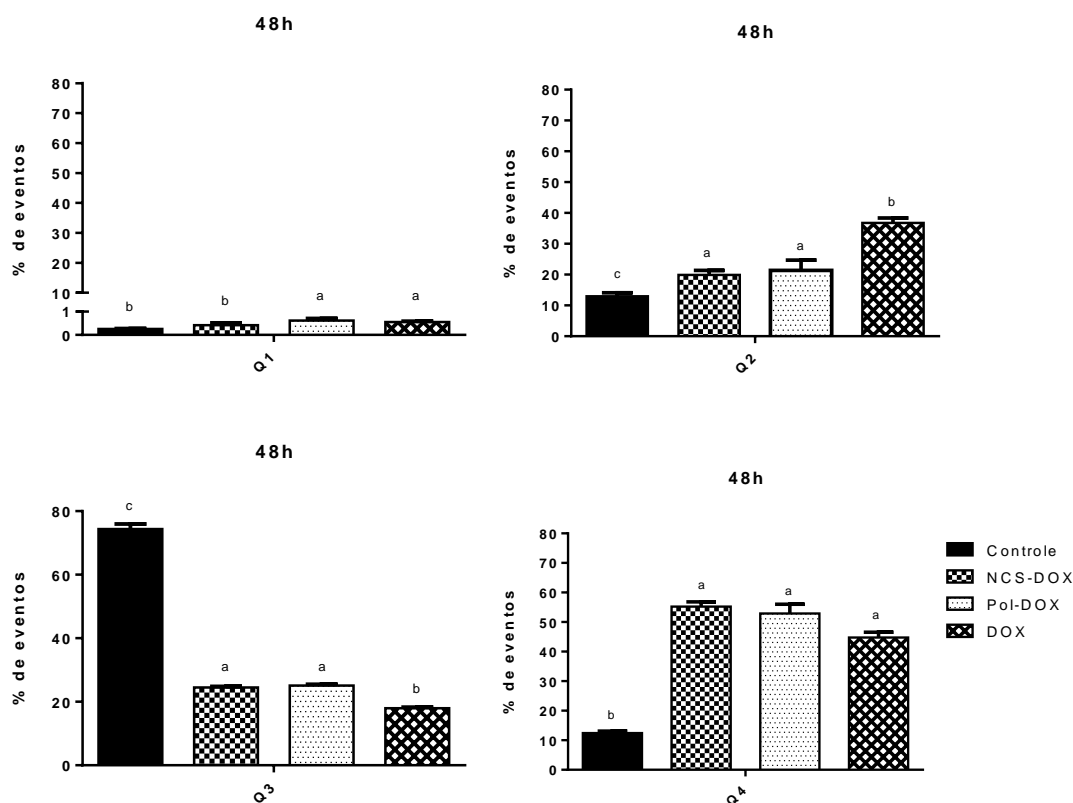


Figura 32. Influência dos tratamentos NCS-DOX (nanocápsulas com selol contendo DOX), Pol-DOX (produto da reação entre PVM/MA e doxorrubicina), DOX (doxorrubicina) e controle (meio de cultivo) na morfologia de células 4T1 por 44 horas. Q1: Células com diminuição de tamanho e aumento de granulosidade. Q2: Células com aumento de granulosidade. Q3: Células normais. Q4: Células com diminuição de tamanho e granulosidade. Dados expressos como média \pm erro padrão da média. Letras diferentes sobre as colunas em um mesmo gráfico indicam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$). Análise estatística: ANOVA em uma via e teste de múltiplas comparações de Tukey's.

6.2.9 Alterações no potencial de membrana mitocondrial

Os tratamentos NCS-DOX, Pol-DOX e DOX causaram redução do potencial de membrana mitocondrial interna em células 4T1 apenas após 48 horas de tratamento. NCS-DOX provocou despolarização em $32,06\% \pm 0,7$ das células, Pol-DOX em $24,6\% \pm 0,6$ e DOX em $26,8\% \pm 1,4$ ($p < 0,05$ vs controle). Pol-DOX e DOX não apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre si. O peróxido de hidrogênio, utilizado como controle positivo, despolarizou $11,7 \pm 0,7\%$ das células e provocou significativa hiperpolarização nas células ($18,5\% \pm 3,2$; $p < 0,05$ vs controle). NCS-DOX reduziu a porcentagem de células com

potencial de membrana mitocondrial normal para $64,6\% \pm 0,3$, Pol-DOX reduziu para $67,6\% \pm 0,9$, DOX reduziu para $65,6\% \pm 1,3$ e peróxido de hidrogênio (controle positivo) reduziu para $67,6\% \pm 3,1$ (figura 33, 34 e 35).

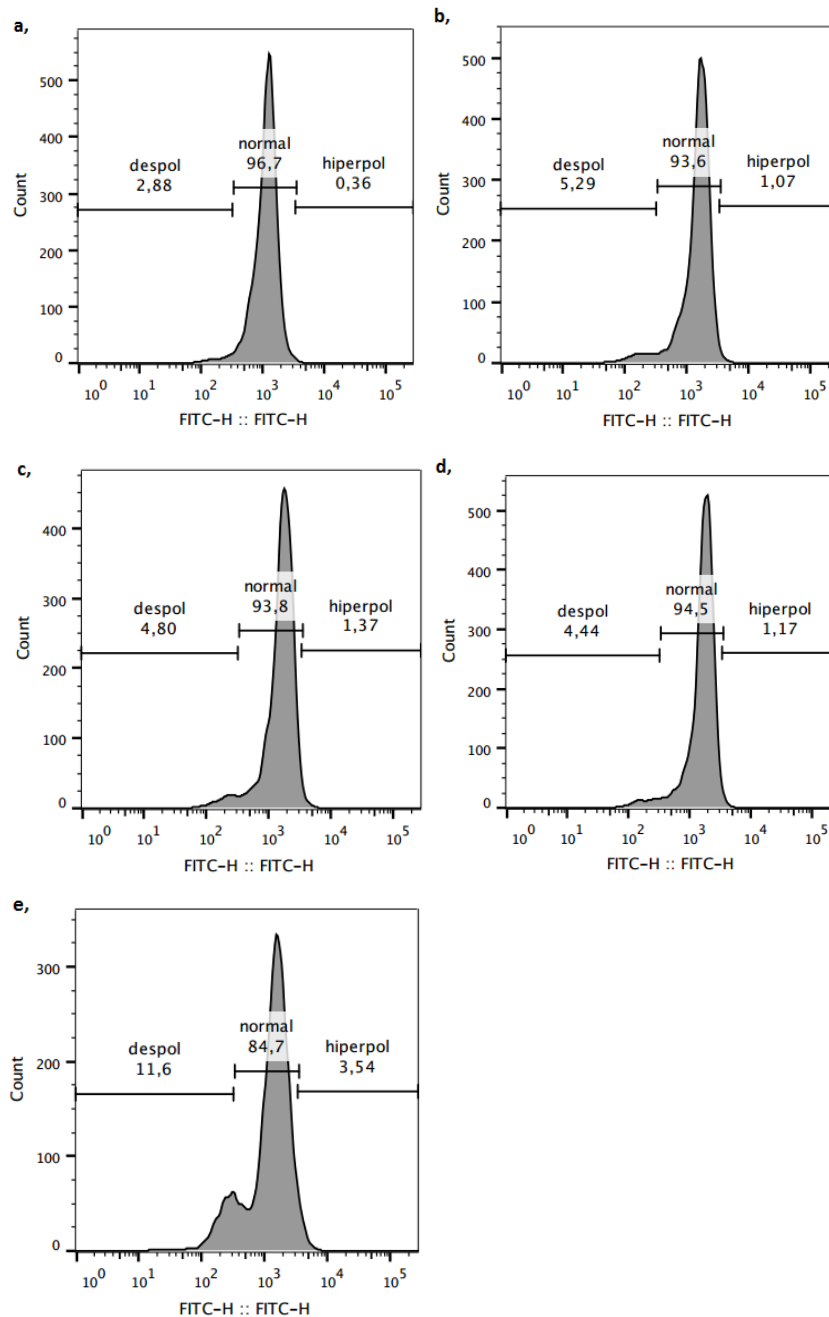


Figura 33. Histogramas da análise de potencial de membrana mitocondrial em células 4T1 após exposição à DOX (doxorubicina), NCS-DOX (nanocápsulas com selo contendo DOX), Pol-DOX (produto da reação entre PVM/MA e doxorubicina) e controle (meio de cultivo) por 24 horas. a, controle. b, DOX. c, NCS-DOX. d, Pol-DOX. e, peróxido de hidrogênio. Imagens escolhidas de somente uma amostra das triplicatas.

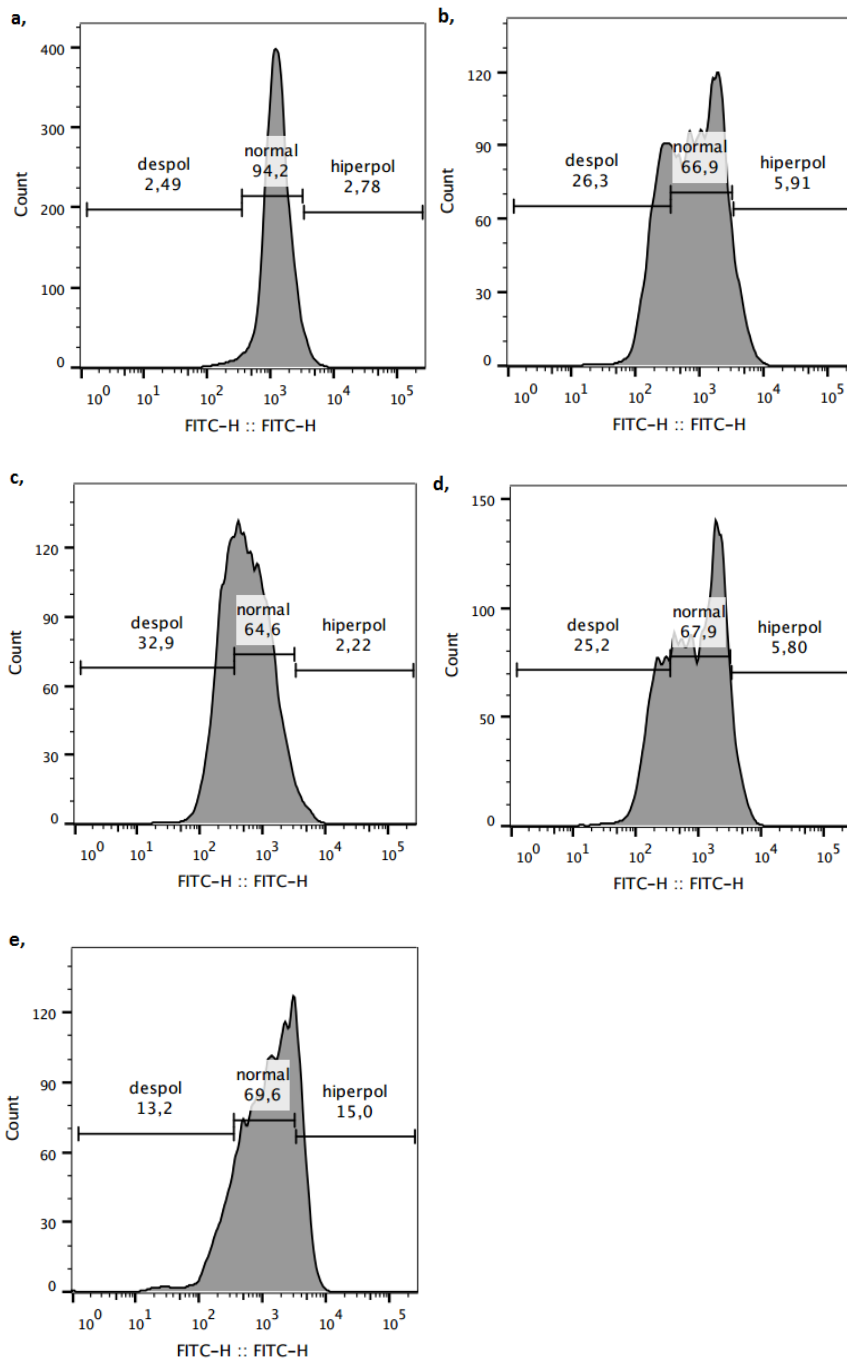


Figura 34. Histogramas da análise de potencial de membrana mitocondrial em células 4T1 após exposição à DOX (doxorubicina), NCS-DOX (nanocápsulas com selol contendo DOX), Pol-DOX (produto da reação entre PVM/MA e doxorubicina) e controle (meio de cultivo) por 48 horas. a, controle. b, DOX. c, NCS-DOX. d, Pol-DOX. e, peróxido de hidrogênio. Imagens escolhidas de somente uma amostra das triplicatas.

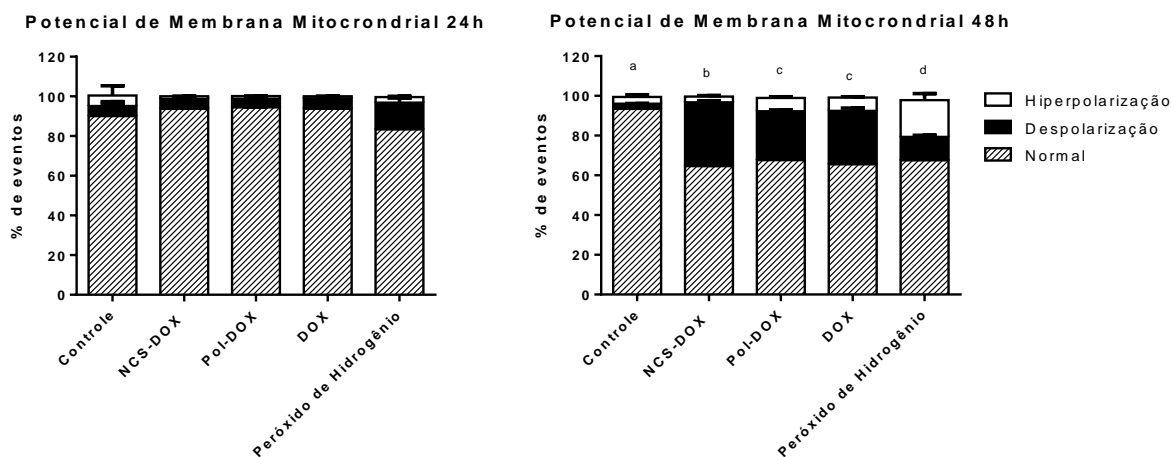


Figura 35. Potencial de membrana mitocondrial nas células 4T1 após os tratamentos NCS-DOX (nanocápsulas com selol contendo doxorubicina), Pol-DOX (produto da reação entre PVM/MA e doxorubicina), DOX (doxorubicina), peróxido de hidrogênio (controle positivo) e controle (meio de cultivo) por 24 e 48 horas. Dados expressos como média \pm erro padrão da média. Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) para a análise de despolarização. Análise estatística: ANOVA em duas vias e teste de múltiplas comparações de Tukey's.

6.2.10 Produção de espécies reativas de oxigênio por células 4T1

A produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) foi investigada após 3, 24 e 48 horas de exposição aos tratamentos. No tempo de 3 horas, o tratamento com peróxido de hidrogênio (controle positivo) foi o que causou maior produção de EROs, seguido do tratamento NCS-DOX ($p < 0,05$ vs controle). Os tratamentos com Pol-DOX e DOX não causaram produção de EROs estatisticamente significativa em relação ao grupo controle. Após 24 horas de exposição aos tratamentos peróxido de hidrogênio (controle positivo), NCS-DOX e Pol-DOX, houve aumento significativo na produção de EROs quando comparados com o grupo controle ($p < 0,05$). Já o tratamento DOX não levou a um aumento de EROs quando comparado com o grupo controle. Em 48 horas foi possível observar aumento na produção de EROs, em relação ao grupo controle, para Pol-DOX, DOX e peróxido de hidrogênio (controle positivo). Em 48 horas, o grupo tratado com NCS-DOX apresentou mesma produção de EROs que o grupo controle ($p < 0,05$) (figura 36).

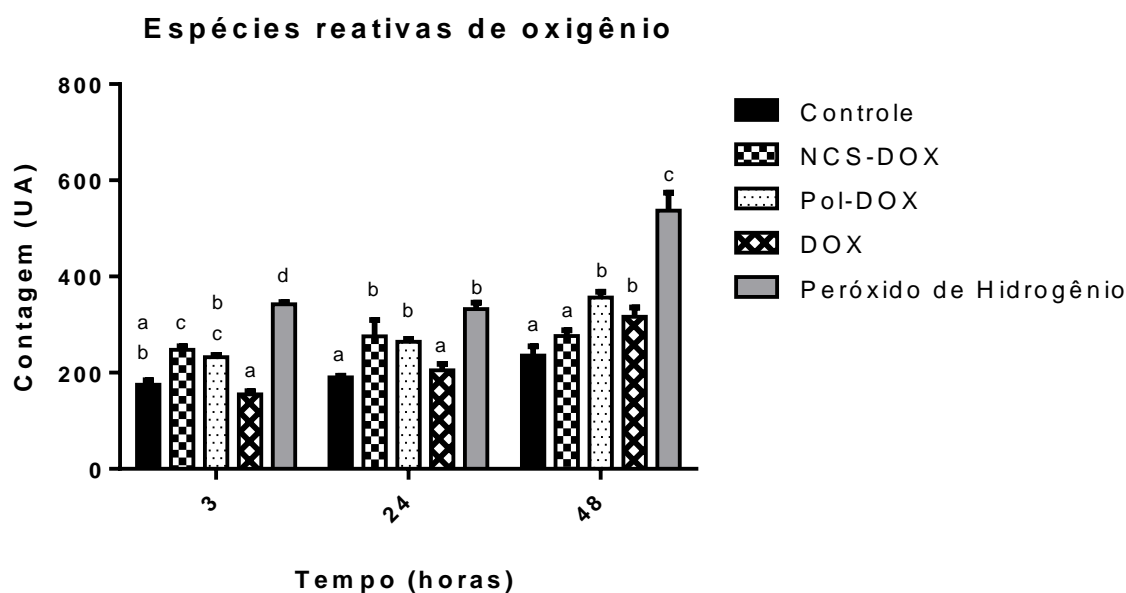


Figura 36. Produção de espécies reativas de oxigênio por células 4T1 após os tratamentos com DOX (doxorubicina), NCS-DOX (nanocápsulas com selol contendo doxorubicina), Pol-DOX (produto da reação entre PVM/MA e doxorubicina), peróxido de hidrogênio (controle positivo) e meio de cultivo (controle) por 3, 24 ou 48 horas. Dados expressos como média \pm erro padrão da média. Letras diferentes sobre as colunas para um mesmo tempo de tratamento indicam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$). Análise estatística: ANOVA em duas vias e teste de múltiplas comparações de Tukey's.

6.2.11 NCS-DOX e Pol-DOX alteram a localização sub-celular da DOX

A localização subcelular (núcleo, retículo endoplasmático, lisossomo e mitocôndria) da DOX em células 4T1 foi analisada após 6 horas de exposição aos tratamentos NCS-DOX, Pol-DOX e DOX. A DOX livre se acumulou mais intensamente no núcleo ($45,6\% \pm 0,8$), seguido de menores intensidades no retículo endoplasmático ($25,2\% \pm 1,7$), mitocôndria ($16,3\% \pm 1,2$) e lisossomos ($12,7\% \pm 0,7$). Após os tratamentos com NCS-DOX e Pol-DOX, a DOX se concentrou com maior intensidade na mitocôndria ($43,4\% \pm 6,4$ e $44,6\% \pm 3,4$, respectivamente) e com menor intensidade no núcleo ($23,7\% \pm 3,7$ e $27,7\% \pm 2,1$, respectivamente), lisossomo ($17,1\% \pm 2,5$ e $16,3\% \pm 0,6$, respectivamente) e retículo endoplasmático ($15,5\% \pm 1,6$ e $11,1\% \pm 1,1$, respectivamente, figuras 37, 38, 39 e 40). Este resultado indica que quando a DOX está conjugada ao PVM/MA, tanto no produto da reação entre PVM/MA e DOX (Pol-DOX) quanto nas nanocápsulas de selol (NCS-DOX), a sua distribuição intracelular é modificada.

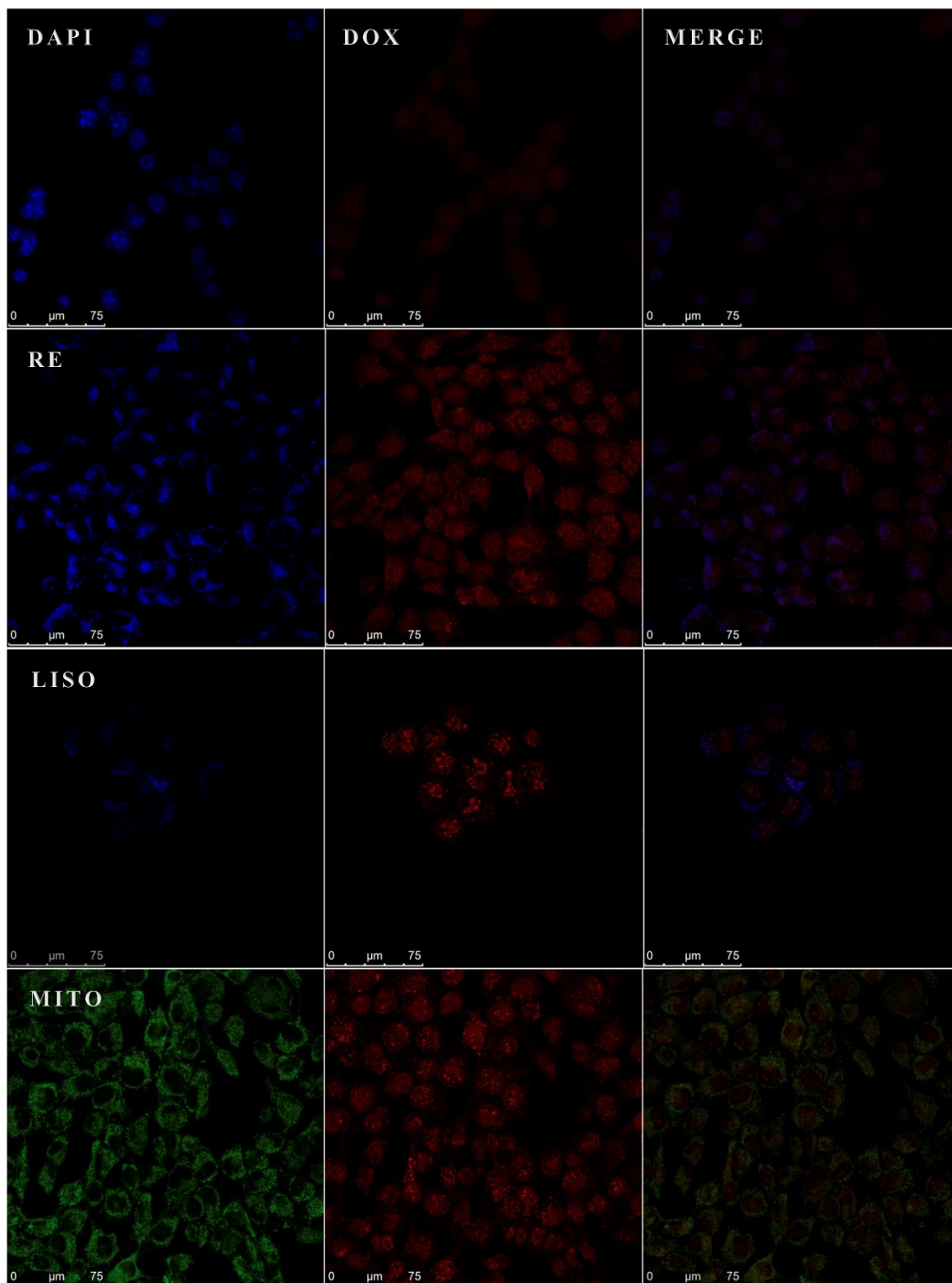


Figura 37. Imagens de microscopia confocal de varredura a laser de células 4T1 tratadas com DOX (doxorubicina) com na concentração de 9 μg DOX/mL por 6 horas. O núcleo foi marcado com DAPI (azul), retículo endoplasmático com ER-Tracker® (azul), lisossomo com LysoTracker® (azul) e mitocôndria com MitoTracker® (verde). A DOX é indicada por fluorescência vermelha. Imagens tratadas no *software Adobe Photoshop CC 2015*.

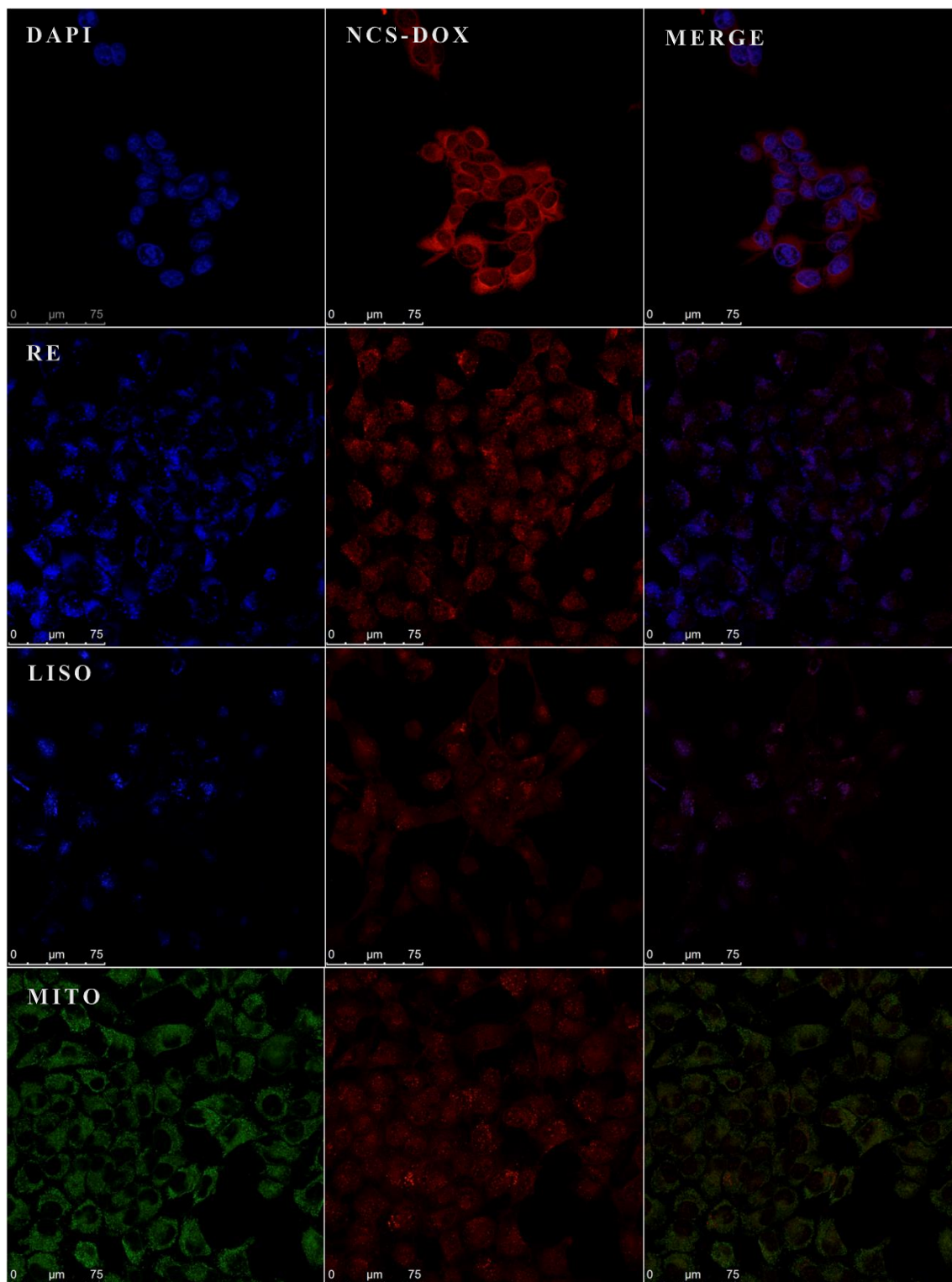


Figura 38. Imagens de microscopia confocal de varredura a laser de células 4T1 tratadas com NCS-DOX (nanocápsula de selol contendo doxorubicina) na concentração de 9 μg DOX /mL por 6 horas. O núcleo foi marcado com DAPI (azul), retículo endoplasmático com ER-Tracker® (azul), lisossomo com LysoTracker® (azul) e mitocôndria com MitoTracker® (verde). A DOX é indicada por fluorescência vermelha. Imagens tratadas no *software Adobe Photoshop CC 2015*.

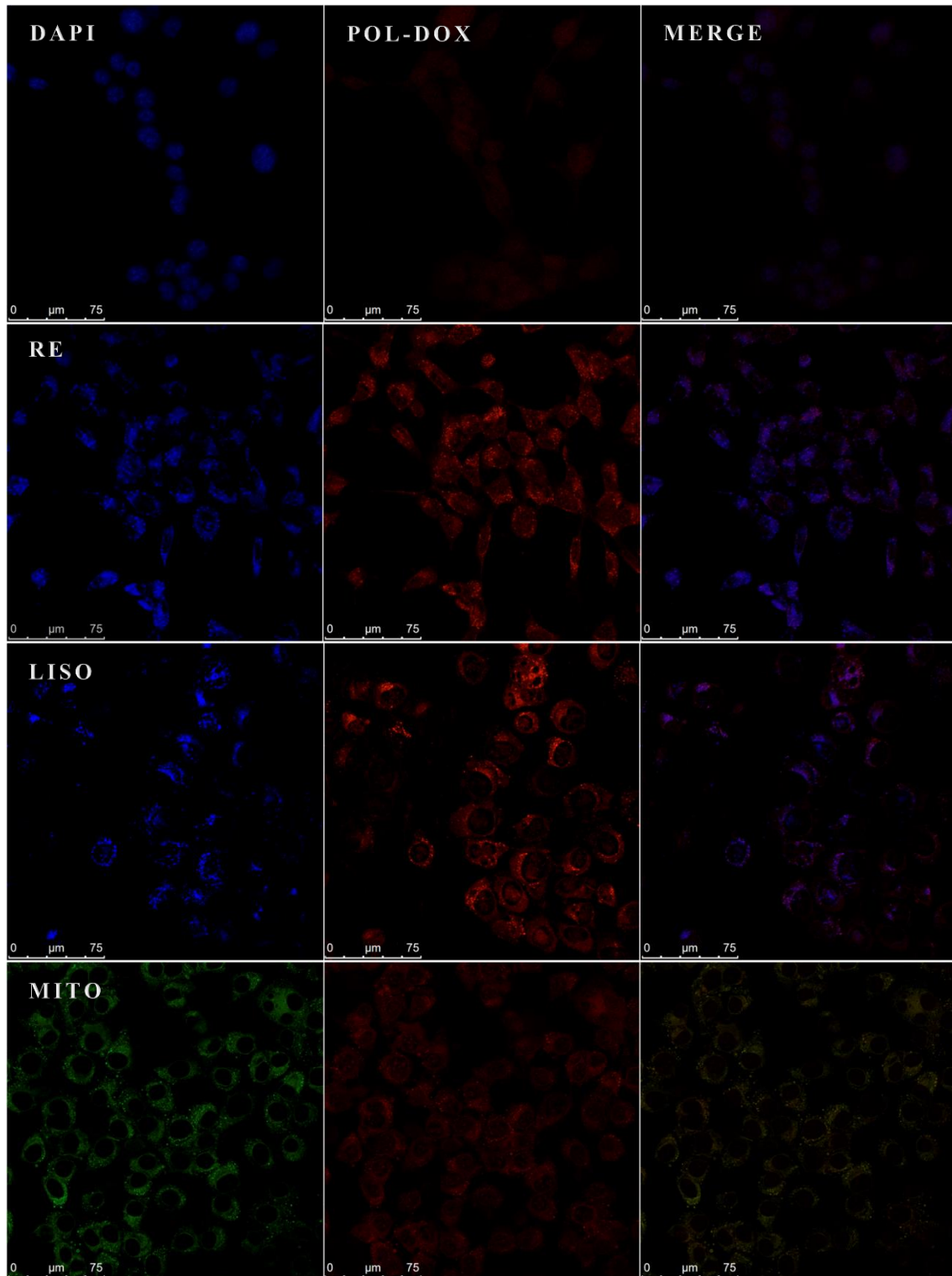


Figura 39. Imagens de microscopia confocal de varredura a laser de células 4T1 tratadas com Pol-DOX (produto da reação entre PVM/MA e doxorubicina) com concentração de 9 µg DOX /mL por 6 horas. O núcleo foi marcado com DAPI (azul), retículo endoplasmático com ER-Tracker® (azul), lisossomo com LysoTracker® (azul) e mitocôndria com MitoTracker® (verde). A DOX é indicada por fluorescência vermelha. Imagens tratadas no *software Adobe Photoshop CC 2015*.

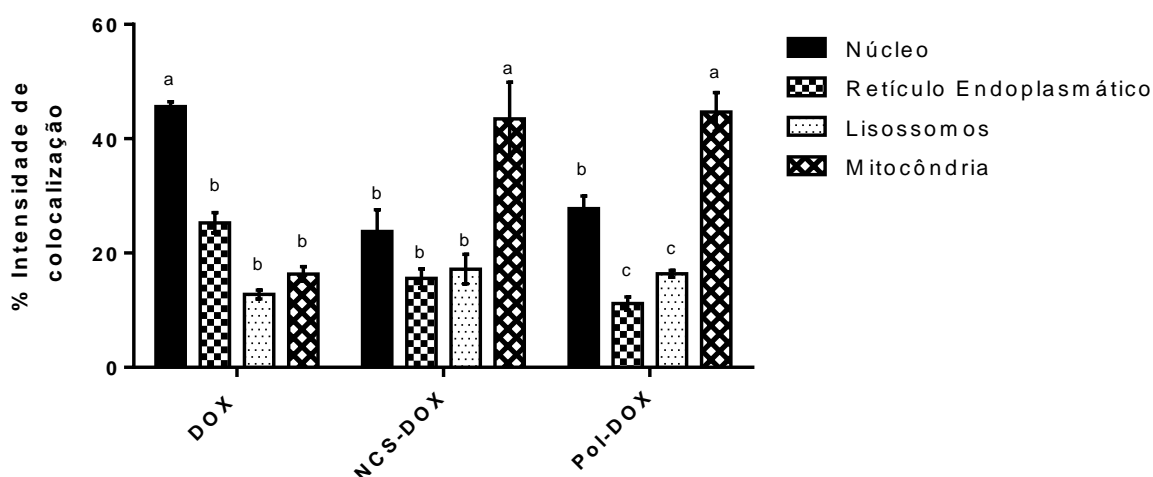


Figura 40. Intensidade de colocalização da doxorubicina (DOX) com organelas de células 4T1 após os tratamentos com NCS-DOX (nanocápsulas com selo contendo DOX), Pol-DOX (produto da reação entre PVM/MA e doxorubicina) e DOX (doxorubicina) por 6 horas. Dados expressos como média \pm erro padrão da média. Dados obtidos através de análises de imagens no *software* ImageJ. Letras diferentes sobre as colunas em um mesmo tratamento indicam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$). Análise estatística: ANOVA em duas vias e teste de múltiplas comparações de Tukey's.

6.3 Avaliações *in vivo*

6.3.1 NCS-DOX, NCS e DOX controlam o volume tumoral

Quinze dias após a indução tumoral, os animais foram tratados por via endovenosa (dia 0) e, a partir deste momento, foram avaliados quanto ao volume do tumor e massa corporal por 21 dias. A partir do 15^o dia de tratamento em diante, o crescimento tumoral do grupo controle foi estatisticamente diferente dos grupos tratados ($p < 0,05$) (figura 41).

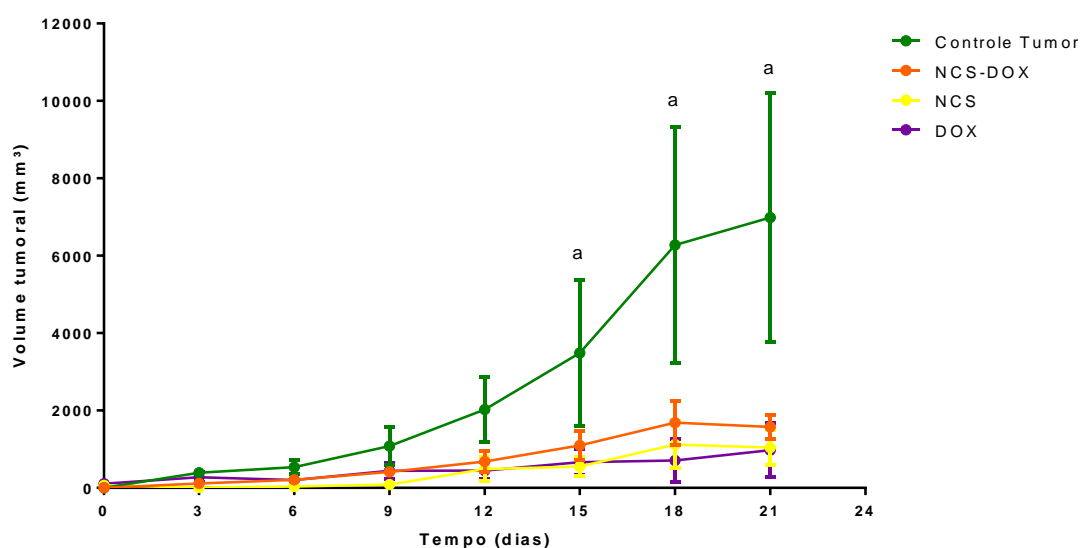


Figura 41. Evolução do volume de tumores 4T1 de camundongos tratados com DOX (doxorubicina), NCS-DOX (nanocápsulas de selol contendo DOX), NCS (nanocápsulas de selol) e do grupo controle (solução aquosa de glicose 5% m:v). Os tratamentos foram realizados no dia 0, 3, 6 e 9. Dados expressos como média \pm erro padrão da média. Foram usados 6 animais por grupo. a = $p < 0,05$ versus todos os outros tratamentos. Análise estatística: ANOVA em duas vias e teste de múltiplas comparações de Tukey's.

Os valores de massa corpórea dos camundongos nos diferentes grupos não apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos (figura 42).

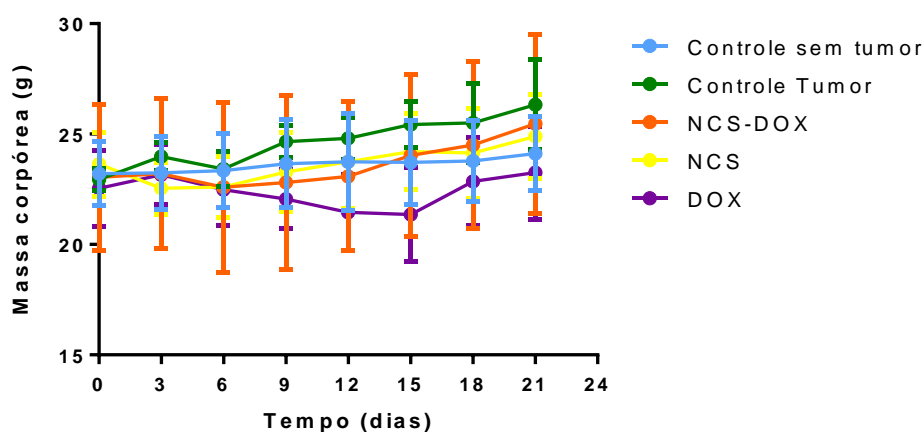


Figura 42. Massa corpórea dos camundongos tratados com NCS-DOX (nanocápsulas de selol e DOX), NCS (nanocápsulas de selol) e DOX (DOX) e do grupo controle (solução aquosa de glicose 5% m:v). Os tratamentos foram realizados no dia 0, 3, 6 e 9. Dados expressos como média \pm erro padrão da média. Foram usados 6 animais por grupo. Análise estatística: ANOVA em duas vias e teste de múltiplas comparações de Tukey's.

6.3.2 Atividade da enzima creatina cinase MB (CK-MB)

Após 21 dias de observação do tamanho tumoral e da massa corpórea dos camundongos, estes foram sacrificados e o sangue foi recolhido para análise dos níveis de CK-MB (creatina cinase presente no músculo cardíaco). Somente o grupo de camundongos tratados com DOX teve atividade elevada de CK-MB no soro ($345,5 \pm 50,5$ U/L) em relação ao grupo controle sem e com tumor ($p < 0,05$; figura 43).

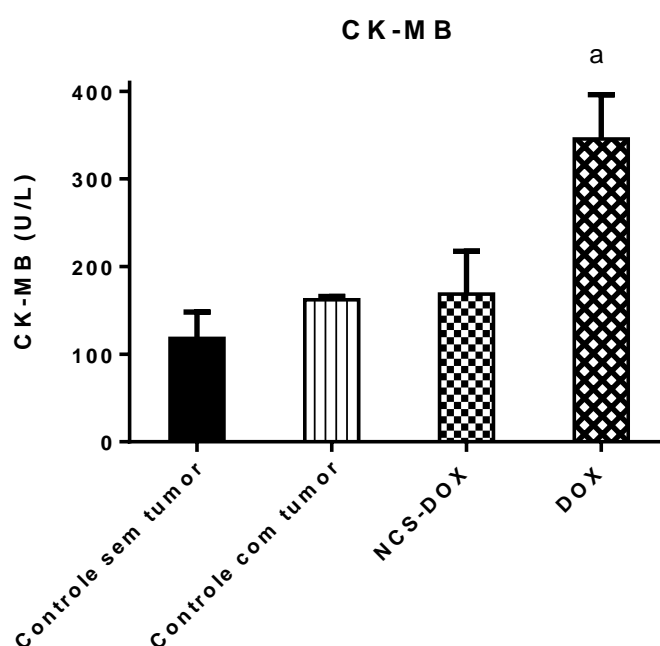


Figura 43. Análise da atividade da enzima creatina cinase MB (CK-MB) de camundongos tratados com DOX (doxorubicina), NCS-DOX (nanocápsulas de selol contendo doxorubicina) ou NCS (nanocápsulas de selol), e dos grupos controles com e sem tumor (solução aquosa de glicose 5% m:v). Os tratamentos foram realizados no dia 0, 3, 6 e 9 e 21 pós-inóculo de tumor os mesmos foram sacrificados e recolhidos o sangue no dia 21. Dados expressos como média \pm erro padrão da média. a = $p < 0,05$ na comparação com os outros grupos. Foram usados 6 animais por grupo. Análise estatística: ANOVA em uma via e teste de múltiplas comparações de Tukey's.

6.3.3 NCS-DOX apresenta maior biodistribuição no tumor

Os resultados de biodistribuição mostraram que não houve diferenças significativas na biodistribuição dos tratamentos NCS-DOX e DOX nos seguintes órgãos: fígado, baço, rins, pulmão e coração, após 2, 4 e 8 horas ($p < 0,05$). NCS-DOX e DOX não apresentaram diferenças significativas de biodistribuição no tumor após 2 e 4 horas de administração, mas após 8 horas a NCS-DOX se acumulou mais no tumor do que DOX livre ($p < 0,05$; figura 46). Estes dois tratamentos se acumularam preferencialmente no fígado e no tumor ($p < 0,05$; figura 44, 45 e 46).

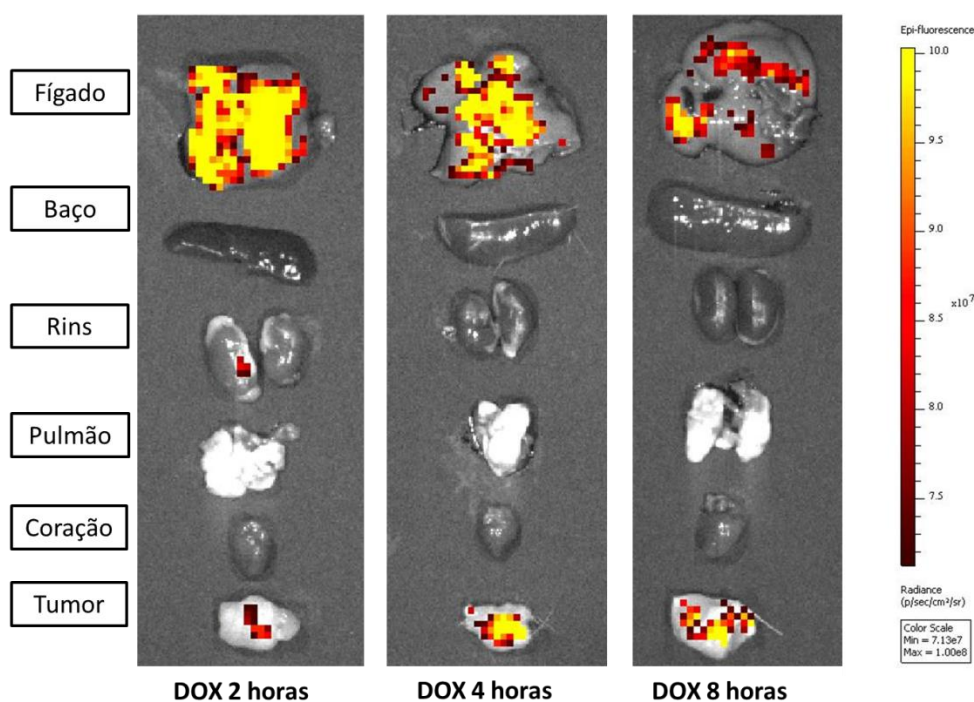


Figura 44. Fluorescência específica da doxorubicina (DOX) *ex vivo* de órgãos recolhidos de camundongos tratados com DOX (doxorubicina) por 2, 4 e 8 horas. Figuras escolhidas da triplicata.

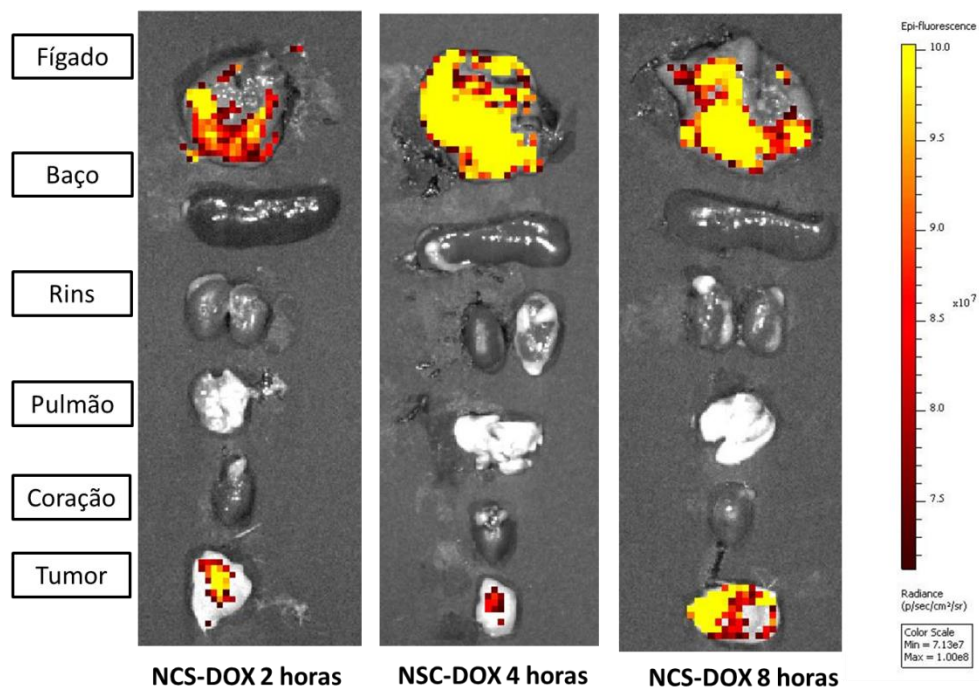


Figura 45. Fluorescência específica da doxorubicina (DOX) *ex vivo* de órgãos recolhidos de camundongos tratados com NCS-DOX (nanocápsulas de selol contendo DOX) por 2, 4 e 8 horas. Figuras escolhidas da triplicata.

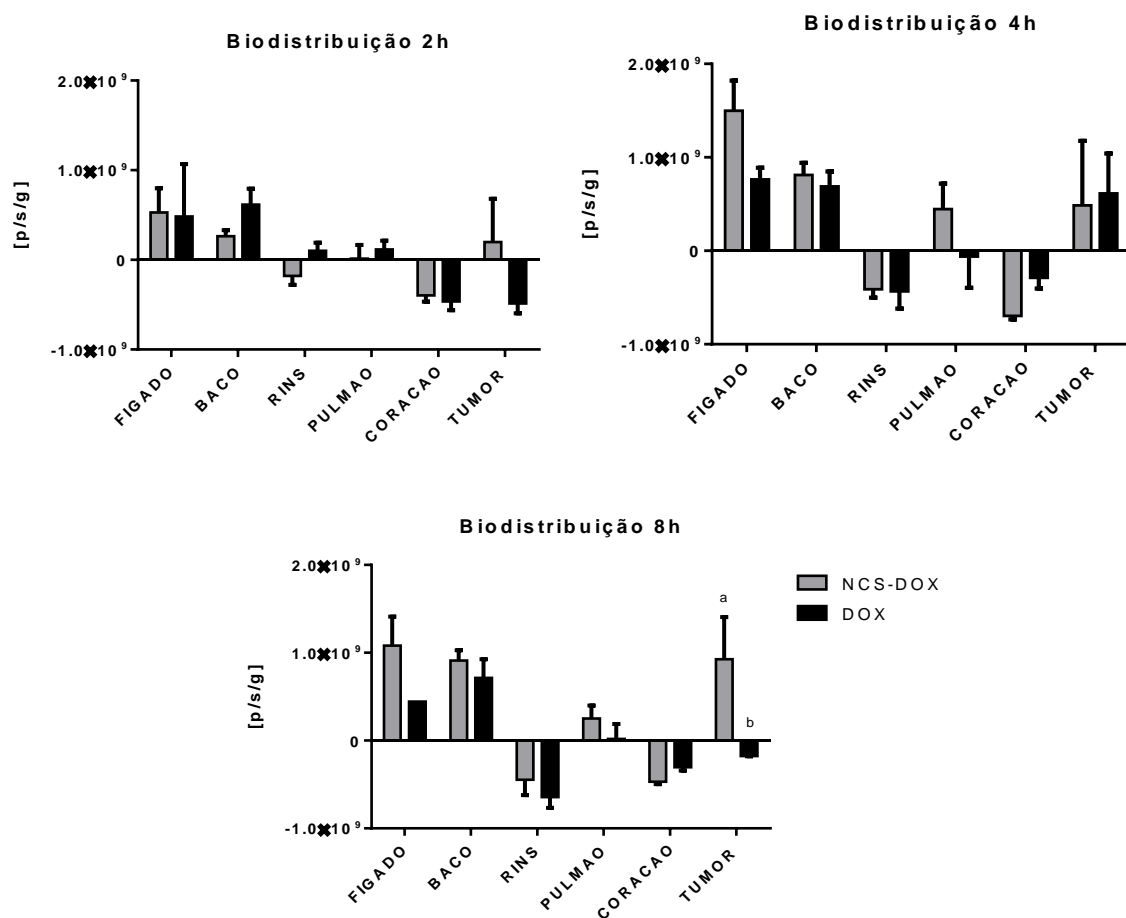


Figura 46. Biodistribuição *ex vivo* de camundongos tratados com NCS-DOX (nanocápsulas de selol e DOX) e DOX (doxorubicina) por 2, 4 e 8 horas. Dados expressos como média \pm erro padrão da média. a e b = $p < 0,05$ na comparação entre os tratamentos. Foram usados 3 animais por grupo. Análise estatística: ANOVA em duas vias e teste de múltiplas comparações de Sidak's.

7. DISCUSSÃO

Os principais problemas apresentados por agentes anticâncer são a ineficácia contra determinadas células que desenvolvem mecanismos de resistência e o baixo índice terapêutico (de Souza et al., 2014; Parhi, Mohanty, & Sahoo, 2012). Apesar dos crescentes estudos para aprimorar a terapêutica contra o câncer, os quais levaram a um aumento na sobrevivência dos pacientes, ainda há uma necessidade de melhoria (Brannon-Peppas & Blanchette, 2012). Neste contexto, a nanotecnologia, que pode ser definida como a tecnologia que permite o controle, manipulação, estudo e desenvolvimento de estruturas na escala manométrica, possibilita a criação de novas aplicações biomédicas por ser capaz de desenhar dispositivos para diagnosticar ou tratar doenças como o câncer (Singh & Lillard, 2009).

O termo nanopartícula abrange estruturas como nanoesferas e nanocápsulas. As nanocápsulas são sistemas vesiculares, que possuem dois compartimentos: 1) núcleo ou cavidade e 2) superfície ou invólucro (Pinto Reis, Neufeld, Ribeiro, & Veiga, 2006). As nanocápsulas recebem considerável atenção na área de medicina pela capacidade de carrear fármacos em seus dois compartimentos (Pinto Reis et al., 2006). Particularmente, as nanocápsulas poliméricas são exploradas na área médica por sua estabilidade e possibilidade de modificação da superfície. Sendo assim, é possível desenvolver uma nanocápsula para controlar a liberação dos fármacos e direcioná-los a um local específico (Singh & Lillard, 2009).

As nanocápsulas de selol e doxorrubicina foram obtidas neste trabalho pelo método de nanoprecipitação. Neste método, geralmente é utilizado um solvente orgânico (ex: acetona) para dissolver o polímero e o fármaco. Em sequência é adicionada a fase aquosa e, posteriormente, a fase orgânica é evaporada sob baixa pressão (A., S.K., & S.C., 2010). Uma das grandes vantagens deste método é o não requerimento de altas quantidades de energia (Pinto Reis et al., 2006). Esta técnica é rápida e facilmente aplicada na preparação de nanocápsulas, pois requer apenas dois solventes miscíveis, sem a necessidade de agitação intensa, aquecimento ou sonicação (Bagheri, Madadlou, Yarmand, & Mousavi, 2013).

Todas as nanocápsulas testadas neste trabalho tiveram baixo PDI ($<0,2$), sendo que a formulação escolhida para os testes em células, NCS-DOX, apresentou PDI por volta de 0,1. O cálculo do PDI leva em consideração o tamanho das nanopartículas, o índice de refração do solvente, o ângulo de medição e a variância da distribuição do tamanho das nanopartículas. De uma escala de 0 a 1, o PDI inferior a 0,1 pode ser considerado indicativo de uma elevada

homogeneidade nos diâmetros da população de nanopartículas (Gaumet, Vargas, Gurny, & Delie, 2008). Uma estreita distribuição de tamanho das nanopartículas – baixo PDI – é importante para evitar o efeito chamado “maturação de Ostwald”, que leva ao desenvolvimento de heterogeneidade de diâmetro de partículas, onde partículas menores se coalescem com partículas maiores, aumentando o DH da formulação ao decorrer do tempo (Lin & Chern, 2015; Piwoński et al., 2016). O tensoativo presente na formulação, além de auxiliar na redução de tamanho das nanocápsulas, também é responsável por impedir esta coalescência entre as nanopartículas, aumentando assim a estabilidade da formulação (Lin & Chern, 2015).

O PVM/MA é fracamente solúvel em água, mas na presença de água seus grupos anidridos são hidrolisados a ácidos carboxílicos, os quais apresentam pKa próximo a 4, e que por isso se apresentam majoritariamente desprotonados em valores de pH em torno de 7, no qual a maioria dos experimentos foi realizada (Figura 47). Nas nanocápsulas NCS-DOX espera-se que o PVM/MA não esteja completamente exposto à fase aquosa, mas que suas porções hidrofílicas, com grupamentos carboxilato, estejam expostas na interface água-invólucro da nanocápsula. Já as suas porções hidrofóbicas, contendo grupos anidrido, devem compor o invólucro e estar parcialmente imersas no núcleo de selol (de Souza et al., 2014).

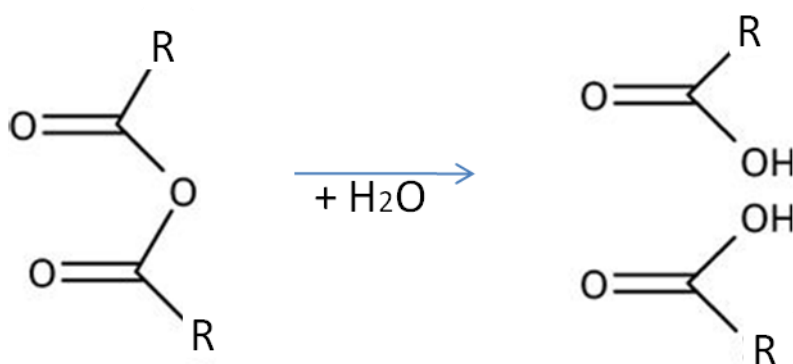


Figura 47. Equação genérica da hidrólise de um anidrido.

Todas as nanocápsulas apresentaram PZ por volta de -35 mV, provavelmente devido aos grupos carboxilato do PVM/MA (Guhagarkar, Majee, Samad, & Devarajan, 2011). O PZ é um termo científico para o potencial eletrocinético em sistemas coloidais, ie, um valor eletrocinético associado à magnitude da carga de superfície das partículas em um sistema coloidal, onde este potencial existe entre a superfície da partícula e o líquido dispersante (Honary & Zahir, 2013). A literatura relata que valores de potencial zeta negativos favorecem

a endocitose por interação eletrostática entre a carga negativa da partícula e sítios positivos presentes na membrana celular (Honary & Zahir, 2013). A carga de superfície das nanopartículas é um parâmetro importante envolvido na sua interiorização por células. Nanopartículas de cério com carga de superfície negativa mostraram resistência à adsorção de proteínas presentes em soro fetal bovino, evento que favorece sua interiorização por células de adenocarcinoma de pulmão (Cao et al., 2014). Além disso, os grupamentos carboxilato das nanocápsulas também poderiam interagir por ligação de hidrogênio com moléculas polares da superfície celular (Krassimira Yoncheva, Lizarraga, et al., 2005).

As nanocápsulas NCS-DOX apresentaram morfologia esférica como indicado pelas análises MET e MEV. Nanopartículas esféricas são próprias à administração parenteral (Conway, Madrigal-estebas, Mcclean, Brayden, & Mills, 2001), a qual foi a via empregada nos estudos *in vivo* descritos neste trabalho. Na análise de MET é possível observar uma camada externa mais densa que o núcleo, correspondente à trama polimérica que envolve a gotícula de selol. Em estudo anterior foi possível observar a formação desta nanoestrutura utilizando apenas o PVM/MA e o selol (de Souza et al., 2014).

Variações nas concentrações dos diferentes componentes utilizados para preparar as formulações produziram diferenças no DH e no PDI das nanocápsulas obtidas. Por exemplo, a NC-1 apresentou DH por volta de 300 nm enquanto que a NC-2 apresentou DH por volta de 260 nm e a NC-3 apresentou DH por volta de 290 nm. Este aumento do DH pode estar relacionado ao aumento na concentração do solvente DMSO na NC-1, já que a concentração de polímero para as duas formulações – NC-1 e NC-2 – é a mesma. Outra formulação que apresentou maior DH, por volta de 400 nm, e que contém maior quantidade de DMSO é a NC-7. O DMSO, dimetil sulfoxido, é um solvente orgânico comumente utilizado em sínteses orgânicas e inorgânicas de nanopartículas, pois possui habilidade de solubilizar diversas moléculas (Saldías et al., 2015). Este foi utilizado para solubilizar o PVM/MA e DOX antes da adição de acetona.

As formulações NC-4 e NC-5 apresentaram DH por volta de 300 nm, mesmo com diferenças na concentração de PVM/MA – a NC-5 possui o dobro da concentração de polímero. A formulação NC-6 também apresentou DH por volta de 300, mesmo tendo a metade da concentração de PVM/MA da NC-5 e também metade da concentração de doxorubicina de todas as outras formulações. Este resultado sugere que o invólucro de PVM/MA formado nas nanocápsulas requer uma quantidade limitada de polímero, e a adição de um excesso de PVM/MA não leva necessariamente a um aumento do invólucro e do

diâmetro da nanocápsula. Um estudo mostrou que o aumento da quantidade de polímero, no método de nanoprecipitação e dependendo do uso do solvente para dissolução do polímero, não aumenta o DH das nanopartículas até certo ponto, em que é considerado o efeito Ouzo, efeito pelo qual são obtidas nanopartículas com baixo PDI (Aubry, Ganachaud, Addad, & Cabane, 2009).

Para a maioria das formulações foi possível observar um aumento no DH 24 h após o preparo devido ao intumescimento da trama polimérica do invólucro, ocasionada pela hidrólise do PVM/MA que a compõe (de Souza et al., 2014). Já a principal formulação – NCS-DOX – possui menor concentração de doxorubicina e menor quantidade de polímero dentre as proporções testadas. Esta formulação apresentou nanocápsulas de menor tamanho – em torno de 190 nm – dentre todas as desenvolvidas. Por esta característica, a NCS-DOX foi escolhida para os testes que se seguiram ao desenvolvimento, pois este valor de diâmetro possibilita, em teoria, seu acúmulo passivo em tumores sólidos. Este fenômeno decorre do fato de os capilares que nutrem certos tumores sólidos possuírem fenestras com diâmetros entre 200 e 800 nm (Paszko, Ehrhardt, Senge, Kelleher, & Reynolds, 2011), as quais são muito maiores que as fenestras de tecidos saudáveis – por volta de 6 nm (Xiang & Anderson, 2006). De fato, experimentos mostram que nanoestruturas com diâmetro de até 400 nm podem se acumular preferencialmente em certos tumores (Yuan et al., 1995).

A NCS-DOX apresentou-se satisfatoriamente estável nas condições testadas, ie, não apresentou mudanças importantes no DH, PDI e PZ durante 375 dias de análise. O PVM/MA pode ser o responsável por esta estabilidade (Arbós et al., 2002; de Souza et al., 2014), pois o mesmo é responsável pela carga negativa na superfície da nanocápsula e, como relatado na literatura, um potencial zeta maior que [30 mV] (em módulo) é indicativo de um sistema coloidal estável (Preetz, Hauser, Hause, Kramer, & Mader, 2010; Silva, Cerqueira, & Vicente, 2012). Em meio de cultivo as nanocápsulas apresentaram tamanho menor. Isto pode ser devido à ligação de água pelos componentes do meio, tais como proteínas, aminoácidos, íons, etc, o que reduziria a quantidade de água disponível para formar a camada de solvatação das nanocápsulas, reduzindo desta maneira seu DH.

Na nanocápsula NCS-DOX, especula-se que a DOX esteja majoritariamente associada ao polímero do invólucro, visto que as porções hidrofílicas desta molécula dificultam a sua dissolução no núcleo oleoso. O PVM/MA é indicado como um polímero adequado para a complexação e a ligação covalente com fármacos em nanoestruturas (Guhagarkar et al., 2010, 2011). A análise dos espectros de infravermelho e SERS permite fazer algumas inferências

sobre a forma como a DOX interage com o PVM/MA. A ausência de vibrações de estiramento de $-\text{NH}_3^+$ ($3160\text{-}2300\text{ cm}^{-1}$) da DOX no espectro de infravermelho da amostra Pol-DOX sugere que houve formação de ligação química entre o PVM/MA e a DOX, que deve ser do tipo amida, decorrente da reação entre o grupamento amino da DOX e o grupo anidrido do PVM/MA (figura 48). De fato, o grupamento amina é um nucleófilo forte, que deve reagir com o grupamento anidrido por meio de um ataque nucleofílico. Outra hipótese é que o grupamento amina protonado esteja interagindo ionicamente com grupos carboxilato gerados por hidrólise do PVM/MA (Guhagarkar et al., 2010). A interação entre a DOX catiônica e o grupo COO^- do PVM/MA resulta na formação de um complexo aniônico (Benival & Devarajan, 2012). Já no espectro de SERS, a banda localizada em 1688 cm^{-1} indica a presença do grupamento químico amida (Liang et al., 2015) no composto formado pela reação da DOX com o PVM/MA. Este grupamento surgiu nos espectros Raman de NCS-DOX e Pol-DOX e não ocorreu no espectro de DOX.

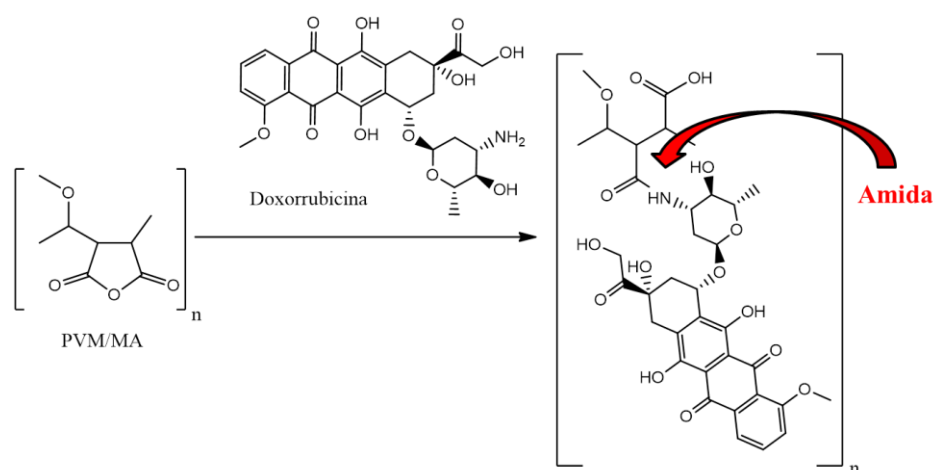


Figura 48. Reação entre o PVM/MA e doxorubicina formando a ligação amida.

De fato, a DOX está fortemente associada às nanocápsulas, já que os ensaios de diálise mostram que apenas uma pequena porcentagem da DOX é capaz de se dissociar destas nanoestruturas. O método de diálise pode ser usado para separar nanopartículas de fármacos pelo uso de, por exemplo, bolsa ou membrana de diálise (Xie, Beyer, Vogel, Wacker, & Mantele, 2015). No método utilizado, a DOX livre foi totalmente liberada da membrana de diálise em poucas horas, enquanto que a DOX presente na NCS-DOX não foi totalmente liberada até o último tempo de análise (apenas 17% em 48 horas). A DOX provavelmente não teria sua liberação aumentada se o experimento fosse realizado com maior tempo que 48

horas, pois desde o tempo próximo a 4 horas a liberação de DOX atingiu um platô. Este resultado indica que 83% da DOX está fortemente conjugada à nanocápsula, provavelmente por ligações covalentes, ao invólucro das nanocápsulas. Neste caso, somente foi avaliado a liberação de DOX das nanocápsulas, mas também seria interessante avaliar a degradação do polímero que levaria posterior liberação do selol.

A toxicidade da NCS-DOX, bem como seus mecanismos de toxicidade, foi avaliada em células tumorais e não tumorais por diversos ensaios *in vitro*. As doses utilizadas foram escolhidas de acordo com estudos anteriores (Kaminskas et al., 2012; Park et al., 2009). A avaliação *in vitro* e *in vivo* de uma nanoestrutura com os fármacos anticâncer selol e DOX associados ainda não foi descrita na literatura. A DOX é comumente utilizada na prática clínica para o tratamento de diversos tipos de cânceres, mas devido ao seu baixo índice terapêutico, métodos para melhorar seu desempenho clínico continuam sendo amplamente estudados (Perche et al., 2012). Neste trabalho, a DOX foi combinada ao selol, já que a literatura sugere que esta abordagem poderia aumentar a atividade anticâncer da DOX (Piotr Suchocki et al., 2007). Neste contexto, a eficácia da NCS-DOX foi comparada à dos tratamentos isolados, i.e., selol apenas e DOX apenas. No ensaio de viabilidade celular pelo método do MTT para as células 4T1, foi possível observar que a NCS-DOX foi o tratamento que causou maior redução na viabilidade celular a partir da concentração de 1 µg/mL, indicando sinergismo entre DOX e selol da nanocápsula. Pol-DOX também causou maior redução na viabilidade celular que a DOX a partir desta concentração. Os valores de IC50 para NCS-DOX, Pol-DOX e DOX foram de 0,37; 0,42 e 0,71 µg/mL, respectivamente, indicando a maior toxicidade causada pela NCS-DOX. Como pode ser observado pelo tratamento apenas com o polímero, a toxicidade não advém do PVM/MA, já que este sozinho não reduziu a viabilidade celular.

Os ensaios de interiorização mostraram que, para todos os tempos, o composto Pol-DOX, seguido da NCS-DOX, foi mais interiorizado que os outros tratamentos. Este evento pode ser parte da resposta para a maior redução da viabilidade celular observada com Pol-DOX e NCS-DOX em relação à DOX. Ainda, observou-se que a NCS reduziu a viabilidade celular para 66% somente na última concentração (216 µg selol/mL), assim, podemos verificar o potencial do selol nas nanocápsulas em reduzir a viabilidade celular e seu potencial em provocar sinergismo juntamente com a DOX. Estudos anteriores mostraram que nanocápsulas de selol possuem potencial de reduzir a viabilidade de células A549 (células de

adenocarcinoma de pulmão humano) na concentração de 100 e 150 µg selol/mL em 48 horas (de Souza et al., 2014). No ensaio de MTT, as células NIH-3T3 se mostraram menos sensíveis aos tratamentos do que as células 4T1. Os valores de IC50 para NCS-DOX, Pol-DOX e DOX foram de 0,46; 0,46 e 0,81 µg/mL, respectivamente. Isso pode ser devido ao fato de que células tumorais têm maiores taxas proliferativas, uma vez que os fármacos utilizados, DOX e selol, agem na inibição da proliferação celular (de Souza et al., 2014; Yang et al., 2014). Além disso, já foi reportado na literatura que as células não tumorais ativam mecanismos de reparo frente a algum dano causado por fármacos, enquanto algumas células tumorais são deficientes nestes mecanismos (Tian et al., 2013).

O tratamento com NCS-DOX causou a maior redução na adesão de células 4T1 quando comparado aos outros tratamentos, confirmando o efeito sinérgico entre DOX e selol. Diferentemente do observado no ensaio de MTT, na análise do índice de adesão celular foi possível observar que as células NIH-3T3 foram mais sensíveis ao tratamento NCS-DOX. Os tratamentos com NCS e Pol, tanto para 4T1 quanto para NIH-3T3, não reduziram o índice celular em comparação ao grupo controle. A literatura mostra que nanocápsulas de selol reduzem de fato a proliferação de células cancerosas, sugerindo que a combinação do efeito citostático do selol com o efeito citotóxico de um segundo fármaco pode ser uma alternativa eficaz de combate de tumores (de Souza et al., 2014). A DOX, em ensaios *in vitro*, provoca intensa redução do índice de adesão celular em tempo real, efeito que é dependente do tempo de exposição e da concentração da DOX (Moraes et al., 2012). Os dados experimentais deste trabalho sugerem um sinergismo entre selol e DOX, ocasionando uma maior atividade anticâncer das nanocápsulas NCS-DOX em relação a estes fármacos isolados. A morfologia e a confluência celulares foram afetadas pelas duas concentrações estudadas de DOX e NCS-DOX. Como o esperado, a maior concentração (3 µg DOX/mL) provocou maiores alterações na confluência e morfologia das células, tanto para as células 4T1 quanto para NIH-3T3. As alterações na confluência das células observadas sob microscopia óptica de luz são corroboradas pelos experimentos de índice de adesão celular em tempo real. As células 4T1 sofreram redução da adesão celular, para os tratamentos com DOX e NCS-DOX, apenas em 48 horas. Já para as células NIH-3T3, a redução na adesão celular começou em 36 horas para os dois tratamentos e, em 48 horas, o índice de adesão celular chegou a 0 (zero) para NCS-DOX.

Tanto NCS-DOX quanto DOX, na maior concentração testada, induziram retração do volume celular de NIH-3T3 e de 4T1, o que pode ser um indicativo de morte (Sinha, Pal, & Sil, 2014). Na concentração de 0,1 µg DOX/mL, os dois tratamentos induziram aumento do volume celular nas linhagens 4T1 e NIH-3T3. Isto ocorre porque nos grupos controle a alta confluência celular faz com que as células se comprimam, mas também pode ser devido à indução de apoptose, que é observada no tratamento com DOX (Yang et al., 2014). Na concentração de 0,1 µg/mL de DOX também foi possível identificar nas duas linhagens celulares a presença de vacúolos. É bem relatado na literatura que o uso de DOX provoca a formação de vacúolos no citoplasma tanto em células analisadas em tecidos quanto em análises nas próprias células (Granados-Principal et al., 2014; Hill et al., 2014; Kulbacka et al., 2014; Mohamed, Karam, Hagrass, Amer, & Abd El-Haleem, 2015) e, em cardiomiócitos murinos, leva à formação de vacúolos relacionados ao mecanismo de autofagia, que leva à degradação de componentes celulares e que pode eventualmente levar à morte celular (X. Wang et al., 2014). Não foi possível identificar, em nenhuma das linhagens testadas, diferenças morfológicas entre as células tratadas com NCS-DOX e DOX.

Após a avaliação da eficácia da NCS-DOX, alguns processos básicos do seu mecanismo de ação foram investigados. Neste contexto, a interiorização do fármaco é geralmente um processo chave no seu mecanismo de citotoxicidade quando os alvos moleculares estão no citosol ou em organelas celulares (Zeng, Morgenstern, & Nyström, 2014b; Zeng & Zhang, 2012). Avaliações recentes mostraram que uma nanoestrutura de DOX (dendrímeros lineares hiper-ramificados conjugados à doxorubicina) atravessa a membrana celular de células MCF-7/ADR (carcinoma mamário humano resistente) por vias endocíticas ativas, como macropinocitose e via de clatrina, e se acumulam mais intensamente em lisossomo, retículo endoplasmático e mitocôndria do que a DOX livre (Zeng et al., 2014b). Isto é importante, pois as células MCF-7/ADR super-expressam a enzima glutationa-S-transferase microssomal 1 (MGST1), responsável pela biotransformação e eliminação de agentes citotóxicos das células, sendo que os principais sítios de expressão da MGST1 são a mitocôndria e o retículo endoplasmático (Ranandersson & Depierre, 1984). Sendo assim, foi mostrado que a nanoestrutura contendo a DOX reduziu a expressão da enzima, muito provavelmente por ser mais hábil em se acumular na mitocôndria e retículo endoplasmático do que a DOX livre (Zeng et al., 2014b).

Neste trabalho, foi observado que o Pol-DOX foi o tratamento mais interiorizado pelas células 4T1 nos tempos estudados. A literatura sugere que certas nanoestruturas poliméricas

são rapidamente reconhecidas por células tumorais, levando ao aumento da interiorização celular (Sun, Wu, Peng, Liu, & Gong, 2015). No caso do polímero PVM/MA, o aumento da interiorização pode ser devido à ligação de moléculas da superfície celular por meio de ligação de hidrogênio ou ligações iônicas envolvendo os grupos carboxilato do polímero, como discutido previamente. Além de que nesta estrutura – Pol-DOX – grupamentos carboxilatos estão mais disponíveis para interação com a membrana das células do que nas nanocápsulas, pois em Pol-DOX nanopartículas são obtidas no primeiro dia de preparação, após isso o polímero se estende, desestabilizando a estrutura. Estudos relatam que nanopartículas de PVM/MA interagem com a membrana celular de células do trato gastrointestinal, favorecendo a maior adesão destas na mucosa intestinal, e assim são mais bem interiorizadas do que fármacos livres (Arbós et al., 2002; K. Yoncheva, Guembe, Campanero, & Irache, 2007; Krassimira Yoncheva, Gómez, Campanero, Gamazo, & Irache, 2005). Nos tempos de 1 e 3 horas de exposição, a NCS-DOX foi mais interiorizada do que a DOX, um evento que provavelmente está ligado à adesão do PVM/MA à superfície celular, já que este polímero compõe o invólucro das nanocápsulas, de maneira que deve efetuar o contato desta nanoestrutura com a célula.

Os mecanismos de endocitose por meio dos quais em princípio a NCS-DOX poderia ser interiorizada também foram investigados. Inibidores de vias de endocitose foram usados para o estudo de qual via poderia estar envolvida na interiorização da NCS-DOX. A amilorida e a citocalasina D inibem a via da macropinositose; a nistatina e a filipina inibem as vias de endocitose mediadas por cavéolas (caveolina) (Zeng & Zhang, 2012); e a azida sódica inibe todo o tipo de transporte dependente direta ou indiretamente de ATP (Cao et al., 2014; Sato et al., 2009). Neste trabalho, a nistatina inibiu a interiorização dos três compostos (NCS-DOX, Pol-DOX e DOX). Ou seja, este resultado sugere que a via mediada por cavéolas está envolvida na endocitose destes três compostos. O mesmo efeito foi observado para a exposição ao inibidor azida sódica, indicando que a interiorização de NCS-DOX, Pol-DOX e DOX é, ao menos parcialmente, dependente de ATP (a via das cavéolas, por exemplo, depende de ATP). A inibição da macropinositose pela citocalasina reduziu somente a interiorização da DOX. Anteriormente foi relatado na literatura que micelas de sulfobetaína conjugadas à DOX, de tamanho por volta de 130 nm e com carga negativa (-36 mV), foram endocitadas pelas vias mediadas por clatrina, cavéola e macropinositose, sendo que a via mediada por cavéola foi a principal via de interiorização destas micelas em célula Hela (Cao et al., 2014). Outros estudos mostraram que dendrímeros lineares hiper-ramificados

conjugados à DOX tiveram sua endocitose inibida por amilorida e citocalasina D, responsáveis pela inibição da endocitose mediada por clatrina e macropinocitose, respectivamente, o que é esperado para este tipo de estrutura, ao contrário da DOX livre que se difunde através da membrana plasmática (Zeng, Morgenstern, & Nyström, 2014a).

Uma vez endocitado, um fármaco pode se concentrar em determinado(s) compartimento(s) celular(es), fato de muita relevância no seu mecanismo de ação. Muitos fármacos agem em organelas específicas, e a eficiente interação do fármaco com seu sítio de ação intracelular é pré-requisito para sua ação farmacológica. Neste contexto, se um fármaco é preferencialmente direcionado para uma organela específica que contém seu sítio de ação, pode ocorrer o aumento de sua eficácia e a redução da incidência de efeitos adversos. Sistemas de entrega de fármacos, como nanoestruturas, podem direcionar fármacos para organelas específicas (Maity & Stepensky, 2015). NCS-DOX e Pol-DOX se concentraram preferencialmente nas mitocôndrias, enquanto a DOX livre foi observada preferencialmente no núcleo de células 4T1 após 6 horas de exposição. Este resultado sugere que o polímero PVM/MA, presente tanto na NCS-DOX quanto no Pol-DOX, é capaz de alterar a localização intracelular da DOX.

Já foi descrito na literatura que a DOX livre se acumula preferencialmente no núcleo de células MCF-7 (carcinoma de mama humano) após 6 horas de exposição, enquanto que dendrímeros lineares hiper-ramificados conjugados à DOX apresentaram afinidade específica para algumas organelas desta célula, como a mitocôndria, envolvida em mecanismos de resistência a fármacos (Ranandersson & Depierre, 1984; Vakili, Abyaneh, Molavi, Lai, & Lavasanifar, 2014; Zeng et al., 2014a). A DOX livre se acumula preferencialmente no núcleo de células cancerosas e induz efeitos indiretos na mitocôndria (Chamberlain, Tulumello, & Kelley, 2013; Vakili et al., 2014). Os mecanismos da DOX, como inibição da topoisomerase II, dano ao DNA nuclear e indução de estresse oxidativo, podem afetar funções na mitocôndria (Chamberlain et al., 2013; Vakili et al., 2014) Ainda, isoformas da topoisomerase II estão presentes em ambos os compartimentos, núcleo e mitocôndria (Chamberlain et al., 2013). Um estudo mostrou que a DOX conjugada a peptídeos que penetram preferencialmente na mitocôndria mudaram a localização sub-celular da DOX, do núcleo para a mitocôndria, em células de câncer de ovário humano resistentes à DOX (A2780ADR) (Chamberlain et al., 2013). Neste estudo foi observado que a estrutura testada, DOX conjugada a peptídeos, apresentou habilidade de superar a resistência causada por bombas de efluxo (glicoproteína P

– PgP). Os autores sugeriram que esta estrutura pode ter provocado a inibição da PgP, ou que a estrutura é suficientemente diferente da DOX e assim não seria mais um substrato para a PgP. Ainda, a nanoestrutura pode ter se tornado indisponível para as bombas de efluxo uma vez que se encontram localizadas na mitocôndria. Ainda naquele estudo, os autores concluíram que a estratégia de mudar a localização subcelular da DOX para mitocôndria foi efetiva em superar a resistência das células testadas (Chamberlain et al., 2013). Esta mudança na distribuição intracelular indica que nanoestruturas são capazes de facilitar a entrega de fármacos a compartimentos celulares específicos (V. P. Torchilin, 2007), podendo apresentar vantagem quando se pretende bloquear um mecanismo específico, como os de resistência a múltiplos fármacos (Zeng et al., 2014a), ou mesmo agir contra uma célula cancerosa por mecanismos diferentes dos apresentados pelo fármaco livre.

Na sequência dos experimentos de investigação de mecanismos de ação da NCS-DOX, foram realizadas análises *in vitro* de fragmentação de DNA, exposição de fosfatidilserina e alteração no potencial de membrana mitocondrial. Os resultados sugerem que todos os tratamentos testados neste trabalho, i.e., NCS-DOX, Pol-DOX e DOX, causam danos celulares capazes de ativar o mecanismo de apoptose (Chen et al., 2001; Li, Ma, & Chen, 2016). NCS-DOX, Pol-DOX e DOX causaram a exposição de fosfatidilserina na face externa da membrana celular, indicativo de apoptose. A fragmentação de DNA e a alteração do potencial de membrana mitocondrial foram mais intensas quando as células foram tratadas com NCS-DOX. Estudos anteriores mostraram que a combinação de compostos selênicos com outros agentes anticâncer (exemplo: paclitaxel) favorece o desencadeamento de mecanismos pró-apoptóticos e inibição da proliferação celular (Qi et al., 2012). A fragmentação de DNA causada pela DOX é principalmente decorrente da indução de apoptose (Mizutani, Tada-Oikawa, Hiraku, Kojima, & Kawanishi, 2005).

Também foi possível observar que o tratamento com NCS-DOX aumentou a produção de EROs de maneira dependente do tempo de tratamento. Este resultado apresenta a evidência de que os tratamentos NCS-DOX e Pol-DOX são capazes de aumentar os níveis de EROs primeiramente, ou seja, mais rapidamente do que a DOX livre. A indução do aumento da produção de EROs pela NCS-DOX também pode ser decorrente do sinergismo ou efeito aditivo do selol com a DOX, já que ambos são conhecidos por induzirem este evento (Piotr Suchocki et al., 2010). Estudo em células de leucemia humana (HL-60) mostrou que a DOX tem a capacidade de gerar EROs, evento que precede os danos ao DNA e o aumento do

potencial de membrana mitocondrial desencadeando apoptose. De fato, a principal via apoptótica de agentes anticâncer envolve a perda da integridade da membrana mitocondrial, e EROs podem provocar este fenômeno (Mizutani et al., 2005). Para os experimentos para análise do potencial de membrana mitocondrial e espécies reativas de oxigênio o peróxido de hidrogênio foi utilizado como controle positivo, pois este causa estresse oxidativo nas células e por consequência perda do potencial de membrana mitocondrial (Zhao et al., 2015).

Já é bem relatado que o uso da DOX pode levar a cardiomiopatia irreversível e por consequência falência cardíaca (Park et al., 2009). A DOX causa diminuição na fração de ejeção ventricular e prejudica a contratilidade dos miocárdios, efeitos que podem estar relacionados à vacuolização do citoplasma e produção de espécies reativas de oxigênio nos cardiomiócitos (Mitry & Edwards, 2016). Neste contexto, a eficácia anticâncer da NCS-DOX foi também avaliada em ensaios *in vivo*. Células 4T1 foram utilizadas para induzir adenocarcinoma mamário em camundongos. O modelo utilizado gerou tumor em 100% dos animais. Este modelo de câncer de mama murino é comumente utilizado para investigação da ação de nanopartículas de doxorubicina (She et al., 2013). Após os processos de indução tumoral e de tratamento com as diferentes formulações, não foi observada perda de massa corporal estatisticamente significativa para nenhum dos grupos estudados até o momento de eutanásia. A ocorrência de tumor foi evidenciada pelo crescimento de massa tumoral na região da indução tumoral (flanco direito dos camundongos). Sete dias após o inóculo das células, já era possível observar visualmente a massa tumoral, já que esses tumores se desenvolvem superficialmente.

A NCS-DOX não foi mais eficaz que a DOX para reduzir o tamanho do tumor. No último dia de análise clínica (dia 21), o tamanho dos tumores dos grupos tratados foi cerca de sete vezes menor que o tamanho dos tumores do grupo controle. Isto indica que NCS-DOX, DOX e NCS apresentaram o mesmo potencial anticâncer. Um estudo realizado por Park e colaboradores mostrou que o Doxil[®], DOX livre e nanopartículas de polietilenoglicol conjugadas à DOX controlaram o tamanho tumoral, induzido em camundongos BALB/c utilizando células de linfoma (A20) implantadas na região subcutânea do flanco esquerdo, também na mesma intensidade. Neste mesmo estudo também foi avaliado o potencial cardiotoxico destes tratamentos, através de eletrocardiograma, níveis de CPK e avaliações histológicas do tecido cardíaco (Park et al., 2009). Estas análises foram realizadas 2 semanas após a administração da última dose dos tratamentos, para avaliar se os efeitos cardiotoxicos

eram persistentes. Foi constatado que o tratamento com DOX livre provocou diminuição na fração de ejeção do ventrículo esquerdo. DOX livre e Doxil[®] aumentaram significativamente a atividade da CPK no soro ($p < 0,05$). Nenhum desses efeitos foi observado para as nanopartículas de polietilenoglicol conjugadas à DOX, e não houve significativas alterações histopatológicas para nenhum dos tratamentos, o que pode estar relacionado ao tempo de estudo (Park et al., 2009).

Apesar de ter a mesma eficácia *in vivo*, a NCS-DOX foi significativamente menos cardiotoxica que a DOX livre. O grupo de camundongos tratados com NCS-DOX apresentou os menores níveis séricos de CK-MB, enzima que, em níveis elevados no sangue, indica muito provavelmente danos ao tecido cardíaco (Park et al., 2009). Os níveis de CK-MB do grupo controle foram usados como referência. Este resultado pode estar relacionado ao fato de que determinados sistemas nanoestruturados de entrega de fármacos se acumulam no tecido tumoral devido ao efeito EPR, o qual se deve à arquitetura defeituosa da vascularização tumoral, que permite a acumulação de nanopartículas no espaço intersticial do tumor e menor entrega do fármaco a tecidos saudáveis (Maity & Stepensky, 2015; Parhi et al., 2012; V. P. Torchilin, 2007; M. Wang & Thanou, 2010).

Na sequência, foi investigado se a NCS-DOX provoca a menor acumulação de DOX no coração dos camundongos tratados. Através de análises de fluorescência *ex vivo*, foi observado que NCS-DOX e DOX apresentaram padrões de biodistribuição semelhantes em 2, 4 e 8 horas após a administração por via endovenosa para os órgãos fígado, baço, rins, pulmão e coração. Porém, em relação à DOX livre, a NCS-DOX apresentou maior acúmulo no tumor após 8 horas de administração. Os tecidos hepático e tumoral apresentaram o maior acúmulo de DOX em ambos os tratamentos. Um estudo da biodistribuição de nanopartículas de polietilenoglicol conjugadas à DOX e DOX livre, realizado pela extração da DOX de órgãos e análise em espectrofotômetro após 1 hora de administração dos tratamentos, mostrou que a DOX livre apresentou maior acúmulo no fígado do que as nanopartículas, e igual concentração no coração (Park et al., 2009). Pelos resultados obtidos, não foi possível verificar o mecanismo pelo qual a NCS-DOX é menos cardiotoxica que a DOX livre. Provavelmente, o aumento do número de animais nos mesmos experimentos aqui descritos poderia auxiliar a demonstrar possíveis diferenças sutis na biodistribuição de NCS-DOX e DOX no coração. Além disso, experimentos adicionais, tais como a dosagem cromatográfica

de DOX nos órgãos, e a investigação a nível celular dos mecanismos de cardiotoxicidade da DOX e NCS-DOX poderiam auxiliar neste estudo.

8. CONCLUSÃO

Os resultados apresentados neste trabalho permitiram concluir que:

1. As nanocápsulas de selol com invólucro de PVM/MA conjugado à DOX – NCS-DOX – são estáveis e monodispersas.
2. NCS-DOX apresentou-se mais citotóxica contra células 4T1 que a DOX na concentração de 1 µg de DOX/mL.
3. NCS-DOX é mais interiorizada por células 4T1 do que DOX livre após 1 e 3 horas de exposição.
4. NCS-DOX é capaz de gerar maior porcentagem de fragmentação de DNA em 48 horas de exposição do que DOX livre.
5. A NCS-DOX induz exposição de fosfatidilserina, apresentando assim atividade pró-apoptótica.
6. A NCS-DOX altera a morfologia celular (4T1 e NIH-3T3) assim como DOX livre.
7. NCS-DOX, em 48 horas de tratamento, causa maior despolarização da membrana mitocondrial em relação à DOX.
8. NCS-DOX, em 3 e 24 horas de tratamento, induz maior produção de EROs em relação ao tratamento com DOX.
9. NCS-DOX e Pol-DOX se concentram mais nas mitocôndrias, enquanto a DOX se acumula mais no núcleo de células 4T1.
10. NCS-DOX reduz o crescimento tumoral na mesma intensidade da DOX livre.
11. NCS-DOX é menos cardiotoxicidade, pois não aumenta a atividade da enzima CK-MB no sangue, diferentemente da DOX livre.
12. NCS-DOX apresenta maior acúmulo no tumor após 8 horas de administração do que DOX livre.

Os resultados deste trabalho sugerem que as nanocápsulas de selol com invólucro de PVM/MA conjugado à doxorubicina – NCS-DOX – mantêm os efeitos citotóxicos contra o adenocarcinoma mamário 4T1 *in vivo*, reduzem a cardiotoxicidade da DOX e aumenta concentração de DOX na região do tumor. Além disso, os resultados sugerem que o

mecanismo de ação da DOX no nível celular pode ter sido alterado pela sua associação ao PVM/MA.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- A., K., S.K., Y., & S.C., Y. (2010). Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 75(1), 1–18. <http://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2009.09.001>
- ANVISA. (2003). Agência Nacional de Vigilância Sanitária. *Resolução RE n 899, 29 de maio de 2003*, 1–15.
- Arbós, P., Wirth, M., Arangoa, M. ., Gabor, F., & Irache, J. . (2002). Gantrez® AN as a new polymer for the preparation of ligand–nanoparticle conjugates. *Journal of Controlled Release*, 83(3), 321–330. [http://doi.org/10.1016/S0168-3659\(02\)00015-9](http://doi.org/10.1016/S0168-3659(02)00015-9)
- Aubry, J., Ganachaud, F., Addad, J. C., & Cabane, B. (2009). Nanoprecipitation of Polymethylmethacrylate by Solvent Shifting:1. Boundaries. *Society*, (14), 1970–1979. <http://doi.org/10.1021/la803000e>
- Bagheri, L., Madadlou, A., Yarmand, M., & Mousavi, M. E. (2013). Nanoencapsulation of date palm pit extract in whey protein particles generated via desolvation method. *Food Research International*, 51(2), 866–871. <http://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.01.058>
- Benival, D. M., & Devarajan, P. V. (2012). Lipomer of doxorubicin hydrochloride for enhanced oral bioavailability. *International Journal of Pharmaceutics*, 423(2), 554–561. <http://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2011.11.035>
- Bertazzoli, C., Chieli, T., Ferni, G., Ricevuti, G., & Solcia, E. (1972). Chronic toxicity of adriamycin: a new antineoplastic antibiotic. *Toxicology and applied pharmacology*, 21(3), 287–301.
- Blanco, E., & Ferrari, M. (2014). Emerging nanotherapeutic strategies in breast cancer. *The Breast*, 23(1), 10–18. <http://doi.org/10.1016/j.breast.2013.10.006>
- Bourdeanu, L., & Liu, E. A. (2015). Systemic Treatment for Breast Cancer: Chemotherapy and Biotherapy Agents. *Seminars in Oncology Nursing*, 31(2), 156–162. <http://doi.org/10.1016/j.soncn.2015.02.003>
- Brannon-Peppas, L., & Blanchette, J. O. (2012). Nanoparticle and targeted systems for cancer therapy. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 64(SUPPL.), 206–212.

<http://doi.org/10.1016/j.addr.2012.09.033>

- Byrne, J. D., Betancourt, T., & Brannon-Peppas, L. (2008). Active targeting schemes for nanoparticle systems in cancer therapeutics. *Advanced Drug Delivery Reviews*, *60*(15), 1615–1626. <http://doi.org/10.1016/j.addr.2008.08.005>
- Cai, S., Thati, S., Bagby, T. R., Diab, H. M., Davies, N. M., Cohen, M. S., & Forrest M. Laird, M. L. (2010). Localized doxorubicin chemotherapy with a biopolymeric nanocarrier improves survival and reduces toxicity in xenografts of human breast cancer. *Journal of Controlled Release*, *146*(2), 212–218. <http://doi.org/10.1016/j.jconrel.2010.04.006>
- Cao, J., Xie, X., Lu, A., He, B., Chen, Y., Gu, Z., & Luo, X. (2014). Cellular internalization of doxorubicin loaded star-shaped micelles with hydrophilic zwitterionic sulfobetaine segments. *Biomaterials*, *35*(15), 4517–4524. <http://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2014.01.067>
- Chamberlain, G. R., Tulumello, D. V., & Kelley, S. O. (2013). Targeted delivery of doxorubicin to mitochondria. *ACS Chemical Biology*, *8*(7), 1389–1395. <http://doi.org/10.1021/cb400095v>
- Chen, Y., Sun, R., Han, W., Zhang, Y., Song, Q., Di, C., & Ma, D. (2001). Nuclear translocation of PDCD5 (TFAR19): an early signal for apoptosis?, *509*, 191–196.
- Conway, M. A., Madrigal-estebas, L., Mcclean, S., Brayden, D. J., & Mills, K. H. G. (2001). Protection against Bordetella pertussis infection following parenteral or oral immunization with antigens entrapped in biodegradable particles: effect of formulation and route of immunization on induction of Th1 and Th2 cells, *19*, 1940–1950.
- de Souza, L. R., Muehlmann, L. A., Dos Santos, M. S. C., Ganassin, R., Simón-Vázquez, R., Joanitti, G. A., ... Bão, S. N. (2014). PVM/MA-shelled selol nanocapsules promote cell cycle arrest in A549 lung adenocarcinoma cells. *Journal of nanobiotechnology*, *12*, 32. <http://doi.org/10.1186/s12951-014-0032-x>
- Drake, E. N. (2006). Cancer chemoprevention: Selenium as a prooxidant, not an antioxidant. *Medical Hypotheses*, *67*(2), 318–322. <http://doi.org/10.1016/j.mehy.2006.01.058>
- Gampenrieder, S. P., Rinnerthaler, G., & Greil, R. (2013). Neoadjuvant Chemotherapy and

Targeted Therapy in Breast Cancer : Past , Present , and Future, 2013.

- Gaumet, M., Vargas, A., Gurny, R., & Delie, F. (2008). Nanoparticles for drug delivery: The need for precision in reporting particle size parameters. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 69(1), 1–9. <http://doi.org/10.1016/j.ejpb.2007.08.001>
- Gewirtz, D. A. (1999). A critical evaluation of the mechanisms of action proposed for the antitumor effects of the anthracycline antibiotics adriamycin and daunorubicin. *Biochemical Pharmacology*, 57(7), 727–741. [http://doi.org/10.1016/S0006-2952\(98\)00307-4](http://doi.org/10.1016/S0006-2952(98)00307-4)
- Granados-Principal, S., El-Azem, N., Pamplona, R., Ramirez-Tortosa, C., Pulido-Moran, M., Vera-Ramirez, L., Ramirez-Tortosa, M. (2014). Hydroxytyrosol ameliorates oxidative stress and mitochondrial dysfunction in doxorubicin-induced cardiotoxicity in rats with breast cancer. *Biochemical Pharmacology*, 90(1), 25–33. <http://doi.org/10.1016/j.bcp.2014.04.001>
- Guhagarkar, S. A., Gaikwad, R. V, Samad, A., Malshe, V. C., & Devarajan, P. V. (2010). Polyethylene sebacate-doxorubicin nanoparticles for hepatic targeting. *International journal of pharmaceutics*, 401(1-2), 113–22. <http://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2010.09.012>
- Guhagarkar, S. A., Majee, S. B., Samad, A., & Devarajan, P. V. (2011). Evaluation of pullulan-functionalized doxorubicin nanoparticles for asialoglycoprotein receptor-mediated uptake in Hep G2 cell line. *Cancer Nanotechnology*, 2(1-6), 49–55. <http://doi.org/10.1007/s12645-011-0012-x>
- Hill, J., Lawrence, J., Saba, C., Turek, M., Feldhaeusser, B., Coutermarsh-Ott, S., ... Gogal, R. (2014). In vitro efficacy of doxorubicin and etoposide against a feline injection site sarcoma cell line. *Research in veterinary science*, 97(2), 348–356. <http://doi.org/10.1016/j.rvsc.2014.07.006>
- Honary, S., & Zahir, F. (2013). Effect of Zeta Potential on the Properties of Nano - Drug Delivery Systems - A Review (Part 2). *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 12(2), 265 – 273. <http://doi.org/10.4314/tjpr.v12i2.19>
- INCA. (2014). *Estimativa Incidência de câncer no Brasil. Estimativa | 2014 Incidência de*

Câncer no Brasil (Vol. 1). <http://doi.org/978-85-7318-194-4>

INCA. (2016). Estimativa | 2016 Incidência de Câncer no Brasil.

Johnston, S. R. D. (2011). The role of chemotherapy and targeted agents in patients with metastatic breast cancer. *Eur. J. Cancer*, *47 Suppl 3*, S38–47. [http://doi.org/10.1016/S0959-8049\(11\)70145-9](http://doi.org/10.1016/S0959-8049(11)70145-9)

Kaminskas, L. M., Mcleod, V. M., Kelly, B. D., Sberna, G., Boyd, B. J., Williamson, M., ... Porter, C. J. H. (2012). A comparison of changes to doxorubicin pharmacokinetics , antitumor activity , and toxicity mediated by PEGylated dendrimer and PEGylated liposome drug delivery systems. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, *8*(1), 103–111. <http://doi.org/10.1016/j.nano.2011.05.013>

Kulbacka, J., Daczewska, M., Dubinska-Magiera, M., Choromanska, A., Rembialkowska, N., Surowiak, P., ... Saczko, J. (2014). Doxorubicin delivery enhanced by electroporation to gastrointestinal adenocarcinoma cells with P-gp overexpression. *Bioelectrochemistry*, *100*, 96–104. <http://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2014.03.013>

Li, G., Ma, D., & Chen, Y. (2016). Biochimica et Biophysica Acta Cellular functions of programmed cell death 5, *1863*, 572–580. <http://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2015.12.021>

Liang, L., Huang, D., Wang, H., Li, H., Xu, S., Chang, Y., ... Xu, W. (2015). In situ surface-enhanced raman scattering spectroscopy exploring molecular changes of drug-treated cancer cell nucleus. *Analytical Chemistry*, *87*(4), 2504–2510. <http://doi.org/10.1021/ac504550w>

Lin, C. T., & Chern, C. S. (2015). Modeling the role of polymeric costabilizers in retarding Ostwald ripening involved in styrene miniemulsions. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, *56*, 34–41. <http://doi.org/10.1016/j.jtice.2015.04.021>

Lince, F., Bolognesi, S., Stella, B., Marchisio, D. L., & Dosio, F. (2011). Preparation of polymer nanoparticles loaded with doxorubicin for controlled drug delivery. *Chemical Engineering Research and Design*, *89*(11), 2410–2419. <http://doi.org/10.1016/j.cherd.2011.03.010>

Maity, A. R., & Stepensky, D. (2015). Delivery of drugs to intracellular organelles using drug delivery systems: Analysis of research trends and targeting efficiencies. *International*

Journal of Pharmaceutics, 496(2), 268–274.
<http://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2015.10.053>

- Malinowska, E., Krzyczkowski, W., Herold, F., Łapienis, G., Ślusarczyk, J., Suchocki, P., ... Turło, J. (2009). Biosynthesis of selenium-containing polysaccharides with antioxidant activity in liquid culture of *Herichium erinaceum*. *Enzyme and Microbial Technology*, 44(5), 334–343. <http://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2008.12.003>
- Minotti, G., Menna, P., Salvatorelli, E., Cairo, G., & Gianni, L. (2004). Anthracyclines : Molecular Advances and Pharmacologic Developments in Antitumor Activity and Cardiotoxicity, 56(2), 185–229. <http://doi.org/10.1124/pr.56.2.6.185>
- Mirza, A. Z., & Shamshad, H. (2011). Preparation and characterization of doxorubicin functionalized gold nanoparticles. *European journal of medicinal chemistry*, 46(5), 1857–60. <http://doi.org/10.1016/j.ejmech.2011.02.048>
- Mitra, S., Gaur, U., Ghosh, P. C., & Maitra, a. N. (2001). Tumour Targeted Delivery of Encapsulated Dextran-Doxorubicin Conjugate Using Chitosan Nanoparticles as Aarrier. *Journal of Controlled Release*, 74(1-3), 317–323. [http://doi.org/10.1016/S0168-3659\(01\)00342-X](http://doi.org/10.1016/S0168-3659(01)00342-X)
- Mitry, M. A., & Edwards, J. G. (2016). Doxorubicin induced heart failure: Phenotype and molecular mechanisms. *IJC Heart and Vasculature*, 10, 17–24. <http://doi.org/10.1016/j.ijcha.2015.11.004>
- Mizutani, H., Tada-Oikawa, S., Hiraku, Y., Kojima, M., & Kawanishi, S. (2005). Mechanism of apoptosis induced by doxorubicin through the generation of hydrogen peroxide. *Life Sciences*, 76(13), 1439–1453. <http://doi.org/10.1016/j.lfs.2004.05.040>
- Mohamed, R. H., Karam, R. A., Hagrass, H. A., Amer, M. G., & Abd El-Haleem, M. R. (2015). Anti-apoptotic effect of spermatogonial stem cells on doxorubicin-induced testicular toxicity in rats. *Gene*, 561(1), 107–114. <http://doi.org/10.1016/j.gene.2015.02.015>
- Moraes, M. C. S., de Andrade, A. Q., Carvalho, H., Guecheva, T., Agnoletto, M. H., Henriques, J. A. P., ... Menck, C. F. M. (2012). Both XPA and DNA polymerase eta are necessary for the repair of doxorubicin-induced DNA lesions. *Cancer Letters*, 314(1), 108–118. <http://doi.org/10.1016/j.canlet.2011.09.019>

- Mora-Huertas, C. E., Fessi, H., & Elaissari, A. (2010). Polymer-based nanocapsules for drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 385(1-2), 113–142. <http://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2009.10.018>
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods*, 65(1-2), 55–63. [http://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](http://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4)
- Murawa, P., Murawa, D., Adamczyk, B., & Połom, K. (2014). Breast cancer: Actual methods of treatment and future trends. *Reports of practical oncology and radiotherapy : journal of Greatpoland Cancer Center in Poznań and Polish Society of Radiation Oncology*, 19(3), 165–72. <http://doi.org/10.1016/j.rpor.2013.12.003>
- National Cancer Institute. (2015). Recuperado de <http://www.cancer.gov/cancertopics/types/breast>
- Parhi, P., Mohanty, C., & Sahoo, S. K. (2012). Nanotechnology-based combinational drug delivery: An emerging approach for cancer therapy. *Drug Discovery Today*, 17(17-18), 1044–1052. <http://doi.org/10.1016/j.drudis.2012.05.010>
- Park, J., Fong, P. M., Lu, J., Russell, K. S., Booth, C. J., Saltzman, W. M., & Fahmy, T. M. (2009). PEGylated PLGA nanoparticles for the improved delivery of doxorubicin. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 5(4), 410–418. <http://doi.org/10.1016/j.nano.2009.02.002>
- Paszko, E., Ehrhardt, C., Senge, M. O., Kelleher, D. P., & Reynolds, J. V. (2011). Nanodrug applications in photodynamic therapy. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 8(1), 14–29. <http://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2010.12.001>
- Perche, F., Patel, N. R., & Torchilin, V. P. (2012). Accumulation and toxicity of antibody-targeted doxorubicin-loaded PEG-PE micelles in ovarian cancer cell spheroid model. *Journal of Controlled Release*, 164(1), 95–102. <http://doi.org/10.1016/j.jconrel.2012.09.003>
- Pinto Reis, C., Neufeld, R. J., Ribeiro, A. J., & Veiga, F. (2006). Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 2(1), 8–21. <http://doi.org/10.1016/j.nano.2005.12.003>

- Piwoński, I., Spilarewicz-Stanek, K., Kisielewska, A., Kądzioła, K., Cichomski, M., & Ginter, J. (2016). Examination of Ostwald ripening in the photocatalytic growth of silver nanoparticles on titanium dioxide coatings. *Applied Surface Science*. <http://doi.org/10.1016/j.apsusc.2016.01.131>
- Pretz, C., Hauser, A., Hause, G., Kramer, A., & M??der, K. (2010). Application of atomic force microscopy and ultrasonic resonator technology on nanoscale: Distinction of nanoemulsions from nanocapsules. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 39(1-3), 141–151. <http://doi.org/10.1016/j.ejps.2009.11.009>
- Primeau, A. J., Rendon, A., & Hedley, D. (2005). The Distribution of the Anticancer Drug Doxorubicin in Relation to Blood Vessels in Solid Tumors Cancer Therapy : Preclinical Blood Vessels in Solid T, 31(24), 8782–8788. <http://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-05-1664>
- Qi, Y., Fu, X., Xiong, Z., Zhang, H., Hill, S. M., Rowan, B. G., & Dong, Y. (2012). Methylseleninic acid enhances paclitaxel efficacy for the treatment of triple-negative breast cancer. *PLoS ONE*, 7(2). <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0031539>
- Ranandersson, G., & Depierre, J. (1984). THE DISTRIBUTION OF MICROSOMAL GLUTATHIONE TRANSFERASE AMONG DIFFERENT ORGANELLES, DIFFERENT ORGANS, AND DIFFERENT ORGANISMS. *Biochemical Pharmacology*, Vol 33, n°22, p. 3609-3614.
- Rawat, M., Singh, D., Saraf, S., & Saraf, S. (2006). Nanocarriers: promising vehicle for bioactive drugs. *Biological & pharmaceutical bulletin*, 29(9), 1790–1798. <http://doi.org/10.1248/bpb.29.1790>
- ROSE, P. G. (2005). Pegylated Liposomal Doxorubicin: Optimizing the Dosing Schedule in Ovarian Cancer. *The Oncologist*, 205–214.
- Saldías, C., Leiva, Á., Bonardd, S., Quezada, C., Saldías, S., Pino, M., & Radic, D. (2015). A facile one-step synthesis of noble metal nanoparticles in DMSO using poly (ethylene glycol) -poly (ε -caprolactone) block copolymers. *REACT*, 96, 78–88. <http://doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2015.09.010>
- Sato, K., Nagai, J., Mitsui, N., Ryoko Yumoto, & Takano, M. (2009). Effects of endocytosis inhibitors on internalization of human IgG by Caco-2 human intestinal epithelial cells.

Life Sciences, 85(23-26), 800–807. <http://doi.org/10.1016/j.lfs.2009.10.012>

- Senchenkov, a, Litvak, D. a, & Cabot, M. C. (2001). Targeting ceramide metabolism--a strategy for overcoming drug resistance. *Journal of the National Cancer Institute*, 93(5), 347–357. <http://doi.org/10.1093/jnci/93.5.347>
- She, W., Li, N., Luo, K., Guo, C., Wang, G., Geng, Y., & Gu, Z. (2013). Biomaterials Dendronized heparin À doxorubicin conjugate based nanoparticle as pH-responsive drug delivery system for cancer therapy. *Biomaterials*, 34(9), 2252–2264. <http://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.12.017>
- Siegel, R., Naishadham, D., Jemal, A., Ma, J., Zou, Z., & Jemal, A. (2014). Cancer statistics, 2014. *CA: a cancer journal for clinicians*. <http://doi.org/10.3322/caac.21208>
- Silva, H. D., Cerqueira, M. ??ngelo, & Vicente, A. A. (2012). Nanoemulsions for Food Applications: Development and Characterization. *Food and Bioprocess Technology*, 5(3), 854–867. <http://doi.org/10.1007/s11947-011-0683-7>
- Singh, R., & Lillard, J. W. (2009). Nanoparticle-based targeted drug delivery. *Experimental and Molecular Pathology*, 86(3), 215–223. <http://doi.org/10.1016/j.yexmp.2008.12.004>
- Sinha, K., Pal, P. B., & Sil, P. C. (2014). Cadmium (Cd²⁺) exposure differentially elicits both cell proliferation and cell death related responses in SK-RC-45. *Toxicology in Vitro*, 28(2), 307–318. <http://doi.org/10.1016/j.tiv.2013.11.011>
- Suchocki, P., Jakoniuk, D., & Fitak, B. a. (2003). Specific spectrophotometric method with trifluoroacetic acid for the determination of selenium(IV) in selenitetriglycerides. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 32(4-5), 1029–1036. [http://doi.org/10.1016/S0731-7085\(03\)00205-X](http://doi.org/10.1016/S0731-7085(03)00205-X)
- Suchocki, P., Misiewicz, I., Skupinska, K., Waclawek, K., Fijalek, Z., & Kasprzycka-Guttman, T. (2007). The activity of Selol in multidrug-resistant and sensitive human leukemia cells. *Oncology reports*, 18(4), 893–9.
- Suchocki, P., Misiewicz-Krzemińska, I., Skupińska, K., Niedźwiecka, K., Lubelska, K., Fijalek, Z., & Kasprzycka-Guttman, T. (2010). Selenitetriglycerides affect CYP1A1 and QR activity by involvement of reactive oxygen species and Nrf2 transcription factor. *Pharmacological reports: PR*, 62(2), 352–61. <http://doi.org/10.1016/S1734->

1140(10)70275-9

- Sun, L., Wu, Q., Peng, F., Liu, L., & Gong, C. (2015). Strategies of polymeric nanoparticles for enhanced internalization in cancer therapy. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 135, 56–72. <http://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2015.07.013>
- Thorn, Caroline; Oshiro, Connie; Marsh, Sharon; Hernandez-Boussard, Tina; McLeod, Howard; Klein, Teri; Altman, R. (2012). Doxorubicin pathways: pharmacodynamics and adverse effects. *Pharmacogenet Genomics*, 21(7), 440–446. <http://doi.org/10.1097/FPC.0b013e32833ffb56>. Doxorubicin
- Tian, J., Doi, H., Saar, M., Santos, J., Li, X., Peehl, D. M., & Knox, S. J. (2013). Radioprotection and cell cycle arrest of intestinal epithelial cells by darinaparsin, a tumor radiosensitizer. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*, 87(5), 1179–1185. <http://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2013.08.051>
- Torchilin, V. (2009). Multifunctional and stimuli-sensitive pharmaceutical nanocarriers. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics: official journal of Arbeitsgemeinschaft für Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V*, 71(3), 431–44. <http://doi.org/10.1016/j.ejpb.2008.09.026>
- Torchilin, V. P. (2007). Targeted Pharmaceutical Nanocarriers for Cancer Therapy and Imaging, 9(2), 128–147.
- Vakili, M. R., Abyaneh, H. S., Molavi, O., Lai, R., & Lavasanifar, A. (2014). Mitochondrial delivery of doxorubicin via triphenylphosphine modification for overcoming drug resistance in MDA-MB-435 / DOX cells Mitochondrial delivery of doxorubicin via triphenylphosphine modification for overcoming drug resistance in MDA-MB-435 / DOX.
- Videira, M., Reis, R. L., & Brito, M. A. (2014). Deconstructing breast cancer cell biology and the mechanisms of multidrug resistance. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*, 1846(2), 312–325. <http://doi.org/10.1016/j.bbcan.2014.07.011>
- Wang, M., & Thanou, M. (2010). Targeting nanoparticles to cancer. *Pharmacological Research*, 62(2), 90–99. <http://doi.org/10.1016/j.phrs.2010.03.005>
- Wang, X., Wang, X. L., Chen, H. L., Wu, D., Chen, J. X., Wang, X. X., ... Jiang, W. (2014).

- Ghrelin inhibits doxorubicin cardiotoxicity by inhibiting excessive autophagy through AMPK and p38-MAPK. *Biochemical Pharmacology*, 88(3), 334–350. <http://doi.org/10.1016/j.bcp.2014.01.040>
- Xi, L., Zhu, S.-G., Das, A., Chen, Q., Durrant, D., Hobbs, D. C., ... Kukreja, R. C. (2012). Dietary inorganic nitrate alleviates doxorubicin cardiotoxicity: Mechanisms and implications. *Nitric Oxide*, 26(4), 274–284. <http://doi.org/10.1016/j.niox.2012.03.006>
- Xiang, T., & Anderson, B. D. (2006). Liposomal drug transport : A molecular perspective from molecular dynamics simulations in lipid bilayers ☆, 58, 1357–1378. <http://doi.org/10.1016/j.addr.2006.09.002>
- Xie, L., Beyer, S., Vogel, V., Wacker, M. G., & Mantele, W. (2015). Assessing the drug release from nanoparticles: Overcoming the shortcomings of dialysis by using novel optical techniques and a mathematical model. *International Journal of Pharmaceutics*, 488(1-2), 108–119. <http://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2015.03.080>
- Yang, F., Teves, S. S., Kemp, C. J., & Henikoff, S. (2014). Doxorubicin, DNA torsion, and chromatin dynamics. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*, 1845(1), 84–89. <http://doi.org/10.1016/j.bbcan.2013.12.002>
- Yoncheva, K., Gómez, S., Campanero, M. A., Gamazo, C., & Irache, J. M. (2005). Bioadhesive properties of pegylated nanoparticles. *Expert opinion on drug delivery*, 2(2), 205–18. <http://doi.org/10.1517/17425247.2.2.205>
- Yoncheva, K., Guembe, L., Campanero, M. A., & Irache, J. M. (2007). Evaluation of bioadhesive potential and intestinal transport of pegylated poly(anhydride) nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics*, 334(1-2), 156–165. <http://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2006.10.016>
- Yoncheva, K., Lizarraga, E., & Irache, J. M. (2005). Pegylated nanoparticles based on poly(methyl vinyl ether-co-maleic anhydride): preparation and evaluation of their bioadhesive properties. *European journal of pharmaceutical sciences : official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences*, 24(5), 411–9. <http://doi.org/10.1016/j.ejps.2004.12.002>
- Yoshitomi, T., Ozaki, Y., Thangavel, S., & Nagasaki, Y. (2013). Redox nanoparticle

therapeutics to cancer - Increase in therapeutic effect of doxorubicin, suppressing its adverse effect. *Journal of Controlled Release*, 172(1), 137–143. <http://doi.org/10.1016/j.jconrel.2013.08.011>

Yuan, F., Dellian, M., Fukumura, D., Leunig, M., Berk, D. A., Torchilin, V. P., & Jain, R. K. (1995). Vascular Permeability in a Human Tumor Xenograft: Molecular Size Dependence and Cutoff Size. *Journal of Cellular Biochemistry*, 57(4), 3752–3757.

Zeng, X., Morgenstern, R., & Nyström, A. M. (2014a). Biomaterials Nanoparticle-directed sub-cellular localization of doxorubicin and the sensitization breast cancer cells by circumventing GST-Mediated drug resistance. *Biomaterials*, 35(4), 1227–1239. <http://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.10.042>





Zeng, X., Morgenstern, R., & Nyström, A. M. (2014b). Nanoparticle-directed sub-cellular localization of doxorubicin and the sensitization breast cancer cells by circumventing GST-Mediated drug resistance. *Biomaterials*, 35(4), 1227–1239. <http://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.10.042>

Zeng, X., & Zhang, Y. (2012). Endocytic Uptake and Intracellular Trafficking of Bis-MPA-Based Hyperbranched Copolymer Micelles in Breast Cancer Cells.

Zhao, Y. R., Qu, W., Liu, W. Y., Hong, H., Feng, F., Chen, H., & Xie, N. (2015). YGS40, an active fraction of Yi-Gan San, reduces hydrogen peroxide-induced apoptosis in PC12 cells. *Chinese Journal of Natural Medicines*, 13(6), 438–444. [http://doi.org/10.1016/S1875-5364\(15\)30037-6](http://doi.org/10.1016/S1875-5364(15)30037-6)

10. ANEXOS

10.1 Parecer do comitê de ética animal

 <p>Universidade de Brasília Instituto de Ciências Biológicas Comissão de Ética no Uso Animal</p>	<p>Brasília, 2 de dezembro de 2015.</p>		<p>DECLARAÇÃO</p>	<p>Declaramos que o projeto intitulado "NANOCÁPSULAS DE SELOL COM INVÓLUCRO DE POLI(METIL VINIL-ÉTER CO-ANIDRIDO MALÉICO) CONTENDO DOXORRUBICINA: DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DE SUA ATIVIDADE ANTICÂNCER E CARDIOTOXICIDADE.", UnBDoC n.º 139625/2015, sob responsabilidade do Professor Luis Alexandre Muehlmann foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) da Universidade de Brasília. Este projeto foi aprovado para utilização de <i>Mus musculus</i>: 90. A presente aprovação é válida pelo período de 1/1/2016 a 28/2/2016.</p>		<p> Prof. Dra. Paula Diniz Galera Coordenadora da CEUA</p>	<p>*Este documento se restringe à avaliação ética do projeto supracitado e não substitui outras licenças e permissões que porventura se façam necessárias.</p>
---	---	---	--------------------------	---	--	--	--